การติดเชื้อ Microsporidiaในคน

Microsporidia Infection in Humans

สมจินตนา ทั่วทิพย์[1]

Somjintana Tourtip[1]

Received: 18 October 2015; Accepted: 27 February 2016

บทคัดย่อ

การติดเชื้อ Microsporidia ในผู้ป่วยที่ทั้งติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ HIV ในประเทศไทยมีแนวโน้มสูงขึ้นอีกทั้งการติดเชื้อนี้ยังพบได้ตั้งแต่วัยเด็กจนถึงวัยสูงอายุ แต่จากข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ Microsporidia มีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทบทวนวรรณกรรมเพื่อรวบรวมองค์ความรู้ที่มีอยู่ทั้งในประเทศและต่างประเทศเกี่ยวกับการติดเชื้อ Microsporidia ให้เป็นปัจจุบันยิ่งขึ้น เพื่อนำมาใช้ประกอบแนวทางการป้องกันและรักษา การติดเชื้อ Microsporidia ในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า Microsporidia เป็นเชื้อปรสิตแบบฉวยโอกาสที่พบได้ในผู้ป่วย HIV โดยมีโครงสร้างสำคัญของสปอร์คือ polar tube ที่ใช้ฉีด sporoplasm เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านใหม่ โดยทั่วไปจะพบหลายสายพันธ์ของ microsporidia ในสัตว์ต่างๆ ที่ติดเชื้อโรคชนิดนี้ แต่ในคนที่มีรายงานว่าก่อโรคอยู่ 4 สายพันธุ์คือ *Enterocytozoon*, *Nosema*, *Pleistophora* และ *Encephalittozoon* การวินิจฉัยแยกโรคที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อนี้คือ microsporidiosis ในคน ใช้ข้อมูลทั้งสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อ microsporidia

คำสำคัญ: Microsporidia, Microsporidiosis, transmission

Abstract

The proportion of microsporidial infections in patients with or without being HIV positive in Thailand tends to increase over time. The microsporidial infection can occur in both children and adults. Despite greater recognition of effect of the microsporodial infection to public health issues, there is still limited knowledge with respect to this infection in Thailand. The purpose of this study was to review the literature describing human microsporodial infection in varied aspects. The study findings revealed that the microsporidia was the opportunistic intracellular parasite in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). One of the main characteristics of this parasite was that it produced spores containing the polar tube which injected its sporoplasm into the new host cells. The Microsporidia was the most common infected disease among several animal species but some generas were recognized in human disease (microsporidiosis). To date, however, only four generas (*Enterocytozoon, Nosema, Pleistophora and Encephalittozoon*) have been reported in humans. Morphology and molecular biology are the main techniques for diagnosis the microsporidiosis in human.

Keywords: Microsporidia, Microsporidiosis, transmission

บทนำ

Microsporidia (Phylum *Microspora*) เป็นปรสิตที่พบได้ในทั้งสัตว์ที่มีและที่ไม่มีกระดูกสันหลัง และมีมากกว่า 100 สปีชี่ร์ เป็นสาเหตุของการก่อโรคในคนได้ในลักษณะของ opportunistic infection ซึ่งพบได้มากในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) ดังนั้นจึงทำให้เกิดการศึกษาอย่างกว้างขวางทั้งลักษณะสัณฐานวิทยาและโครงสร้างทางชีวโมเลกุลของเชื้อ microsporidia สิ่งสำคัญของการติดเชื้อจากปรสิตชนิดนี้คือ ความสามารถในการส่งผ่านสารพันธุกรรม (nuclear materials) ของ microsporidia เข้าสู่เซลล์สิ่งมีชีวิต

[1] *อาจารย์, คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44150, E-mail: stourtip@gmail.com*

[1] *Lecturer, Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, E-mail: stourtip@gmail.com*

ได้หลายชนิด เช่น เข้าสู่กบ กระต่าย สุนัข และลิง[1-3] เนื่องจากเป็นปรสิตที่มีขนาดเล็ก รูปร่างวงรี มีสปอร์ที่มีลักษณะซับซ้อน และสามารถส่งผ่านสารพันธุกรรมที่อยู่ใน sporoplasm เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host) ได้ microsporidia จึงเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคในสัตว์และคนที่ได้รับเชื้อนี้เข้าไป[1] การติดเชื้อชนิดนี้ในคนเรียกว่า microsporidiosis

ในประเทศไทยมีรายงานจากการติดเชื้อ *E. culiculi* ในเซลล์เยื่อบุตาจากรายงานของ Matris และคณะในปี พ.ศ. 2548[4] โดยรวบรวมข้อมูลการตรวจพบเชื้อจากอุจจาระผู้ป่วย AIDS ระหว่าง ปี พ.ศ. 2541-2545 ซึ่งพบเพียง 10 ราย ในปี พ.ศ. 2549 มีรายงานการติดเชื้อ *E. bieuneusi* ในเยื่อบุทางเดินอาหารจาก โดยการตรวจ PCR เพื่อวินิจฉัยโรคนี้โดย Leelayoova และคณะ[5] ได้รายงาน Gen Bank accession number AY945808 และ AY945809 ในปี พ.ศ. 2555 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อปรสิตนี้ร่วมกับอาการกล้ามเนื้ออักเสบที่รายงานในประเทศไทยมีเพียง 12 ราย[6] ข้อมูลการตรวจวินิจฉัยพบว่า Matos และคณะ[7] ได้รายงานการย้อมเนื้อเยื่อ ตรวจสอบซ้ำด้วย TEM หรือ PCR และยังมีการตรวจทั้งการย้อมเนื้อเยื่อและ PCR ในเด็กและผู้ใหญ่ที่มาด้วยอาการอุจจาระเหลวทั้งที่ติดเชื้อ/ไม่ติดเชื้อ HIV พบว่าการวินิจฉัยแม่นยำเพิ่มขึ้น

อย่างไรก็ตามข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค microsporidiosis ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างครอบคลุม การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการรวบรวมข้อมูลในด้าน สัณฐานวิทยา วิธีการแพร่เชื้อ การจัดจำแนก การถ่ายทอดสู่คน พยาธิสรีรวิทยา การตรวจวินิจฉัยโรค จากข้อมูลนำมาสรุปและใช้ในเป็นพื้นฐานในการศึกษาต่อไป

สัณฐานวิทยา (Morphology) โดยทั่วไปสปอร์ของ microsporidia มีขนาดเล็ก รูปร่างรี บางช่วงชีวิตอาศัยอยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน สปอร์ที่ก่อโรคในคนมีขนาดประมาณ 2-7x1.5-5 ไมโครเมตร[1] ในระยะ proliferative stage จะมีขนาดเพิ่มขึ้น และพบว่ามีหลายนิวเคลียส สปอร์สามารถย้อมติดสีได้โดยใช้ Hematoxilin and Eosin (H&E) หรือ histochemical stains อื่นๆ เช่น Gram' positive และ Acid fast stains มีรายงานพบว่ามีการติดเชื้อ *Enterocytozoon cuniculi* ในเยื่อบุตาของผู้ป่วย AIDS ของประเทศไทยจำนวน 10[10-12] โดยใช้การตรวจด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างของ microsporidia เพื่อแยกแต่ละสปีชี่ร์ให้ชัดเจน จึงขอสรุปโครงสร้างแต่ละช่วงชีวิตของปรสิตชนิดนี้เป็นดังต่อไปนี้ คือ

Polar filament หรือ polar tube ของ microsporidia มีลักษณะเป็นท่อกลมขดเป็นวง[1, 9] และเป็นโครงสร้างสำคัญที่อยู่ภายในสปอร์ จำนวนขดที่พบจะเป็นตัวกำหนดความแตกต่างของแต่ละสปีชี่ร์ polarfilament เป็นโครงสร้างที่เริ่มจากฐานที่เรียกว่า (anchoring disc หรือ polar sac) ซึ่งอยู่ด้านบนของสปอร์ polar filament นี้ยื่นลงมาพันรอบนิวเคลียสทางด้านล่างของสปอร์ ในช่วงการติดเชื้อ polar filament จะมีหน้าที่ในการนำ sporoplasm และ นิวเคลียสออกจาก mature spores ไปสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยไม่ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน และมักจะเรียกลักษณะขณะที่ยื่นออกมานอกสปอร์ว่า polar tube ขนาดที่พบโดยประมาณ คือ 0.1-0.15x50-100 ไมโครเมตร[5]

Posterior vacuole เป็นช่องว่างที่สร้างมาจาก golgi vesicle เป็นโครงสร้างที่เกิดในระยะ mature spore หลังจากที่มีการสร้าง polar filament หน้าที่ของ posterior vacuole ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน

Spore wall หรือผนังของสปอร์ จะมีโปรตีนเคลือบอยู่ 2 ชั้น เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน พบว่ามีความหนาไม่เท่ากัน ด้านในหุ้มด้วย chitin ด้านนอกหุ้มด้วย (glycol) protein[13] ด้วยโครงสร้างนี้จึงพบมีสปอร์ของบางสปีชี่ร์ของ microsporidia ที่สามารถทนสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้นานถึง 10 ปีมีการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยนำสปอร์ของ *Encephalitozoon cuniculi* ใส่ลงใน phosphate buffer saline ที่อุณหภูมิ 37°C และพบว่าสามารถมีชีวิตได้นาน 9 วัน หรือ นานถึง 6 เดือนหากเก็บในที่อุณหภูมิ-70°C[14] แต่หากนำมาใส่ในน้ำที่อุณหภูมิสูง 60°C นาน 5 นาที จะทำให้ผลของการติดเชื้อลดลง[15] (Figure 1)

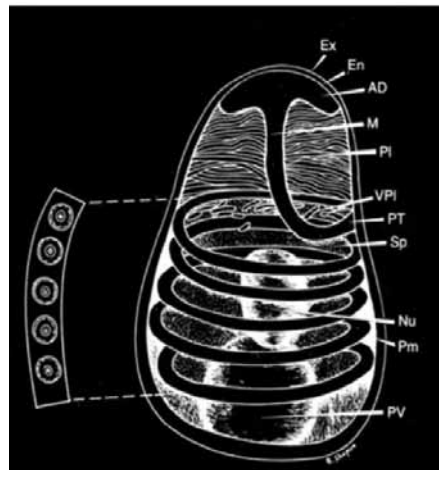

Figure 1 Morphology of the microsporidia size 1 - 10 µm: electron dense exospore (Ex), electron lucent endospore (En), plasma membrane (Pm), sporoplasm (Sp), nucleus (Nu), posterior vacuole (PV), anchoring disc (AD), manubrium or straight portion (M), coils (PT), lamellar polaroplast (PI), vesicular polaroplast (VPI). (Modified from Franzen C. 2005.)

วิธีการแพร่เชื้อ (Transmission) การแพร่เชื้อเกิดจากการส่งผ่านสารพันธุกรรมของ microsporidia ด้วย polar tube ที่ยื่นออกไปนอกสปอร์และเข้าไปสู่ เซลล์เจ้าบ้านทำให้ sporoplasm ถูกนำเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านด้วยการ endocytosis และยังพบกระบวนการหลบหลีกการต่อต้านของเซลล์เจ้าบ้านด้วยกลไก phago-/endo-/lysosome[16] ซึ่งเป็นวิวัฒนาการของ microsporidia ในแต่ละสปีชี่ร์ ด้วย ใน *Encephalitozoon* spp. การแพร่เชื้อเกิดจากการเจาะทะลุผนังเซลล์ ใน *Encephalitozoon hellem* การแพร่เชื้อใช้กระบวนการแทรกเข้าไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ไฟโบรบลาสท์ของปอดวัว[17] ใน *Encephalitozoon intestinalis* การแพร่เชื้อใช้ polar tube แทรกผ่านไปใน plasma membrane ของ macrophage[18] หรือเซลล์อื่นด้วยการกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis โดยที่ sporoplasm และเซลล์เจ้าบ้านทำให้เกิดช่องว่างที่เรียกว่า membrane-derived space ขึ้น[19] การแพร่เชื้อที่ผ่านทางรกพบได้ในกลุ่มสัตว์กินเนื้อมากกว่าสัตว์กัดแทะ ขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการตั้งครรภ์และความรุนแรงของเชื้อ (Figure 2)

Lift cycle ปรสิตชนิดนี้มีวงจรชีวิตที่ค่อนข้างซับซ้อน เริ่มจากระยะที่ 1 germination ซึ่งเป็นระยะที่สปอร์ได้รับสัญญาณให้เกิดการปล่อย polar tube ระยะที่ 2 merogony เป็นการเพิ่มจำนวนของ microsporidia ในเซลล์เจ้าบ้านซึ่งพบว่า microsporidia ชนิดที่มีนิวเคลียสเดียวเช่น *Encephalitozoon* spp. หรือชนิดที่มีหลายนิวเคลียส เช่น *Nosema* spp. สามารถพบสปอร์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นนี้ได้ในนิวเคลียสหรือไซโตพลาสมของเซลล์เจ้าบ้าน หาก microsporidia ได้รับสารอาหารจากเซลล์เจ้าบ้านอย่างสมบูรณ์ก็จะเกิดการแพร่เชื้อเข้าสู่เซลล์อื่นๆ ต่อไปได้ ระยะที่ 3 sporogony เป็นระยะที่มีการสร้างสปอร์ใหม่และมีการพัฒนาจนสมบูรณ์ และสามารถแพร่เชื้อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้เช่นกัน[13]

Germination เป็นระยะที่สปอร์ของ microsporidia ส่งผ่านสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านและพัฒนาต่อไปโดยผ่านกระบวนการ merogony และ sporogony ซึ่งมีแคลเซียมเป็นสารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมลาลิตี้ในสปอร์ ส่งผลต่อการปล่อย polar tube ออกมา[16] โดยแรงที่เกิดขึ้นนี้สัมพันธ์กับจำนวนขดของ polafilament ด้วย

Merogony เมื่อ sporoplasm เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านจะเรียกว่า meronts ซึ่งมีการแบ่งตัวและรวมกันเป็นกลุ่มด้วยผนังเซลล์ในไซโตพลาสม ผ่านกระบวนการ binary หรือ multiple fission ต่อมามีการแบ่งตัวของนิวเคลียสแบบซ้ำๆ (karyokinesis) ก่อนที่จะเกิดการแบ่งเซลล์ (cytokinesis) ทำให้เกิดลักษณะที่สังเกตเห็นง่ายคือ มีหลายนิวเคลียสและถูกห้อหุ้มด้วยเยื่อบุ (plasma membrane) สภาวะเช่นนี้พบได้ในกลุ่ม *Enterocytozoon bieneusi*[21] หรือเป็นกลุ่ม microsporidia ที่มีลักษณะต่อกันคล้ายริบบิ้นใน *Septata intestinalis*[18]

Sporogony เกิดขึ้นจากกการที่ meront พัฒนาไปเป็น sporont ลักษณะที่พบคือ มีรูปร่างไม่แน่นอน ขอบหนาตัวขึ้น โดย meront จะใช้กระบวนการเจริญเติบโตและรวมตัวของนิวเคลียสเริ่มเห็นโครงสร้างคล้ายสปอร์ ที่เรียกว่า sporoblast และมีการพัฒนาต่อไปจนเกิดสปอร์ที่สมบูรณ์ (mature spore) ที่มีขอบหนาขึ้น[9] แยกออกมาเป็นสปอร์ที่ชัดเจนพร้อมที่จะออกสู่สิ่งแวดล้อมต่อไป

Host-parasite interface ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์เจ้าบ้านและ microsporidia ขึ้นอยู่กับสกุลของแต่ละ microsporidia เช่น *E. bienusi* เจริญในไซโตพลาสมของเซลล์เจ้าบ้านเท่านั้น[21] ส่วน sporogony ของทั้ง *Enterocytozoon* และ *Septata* spp. จะเกิด parasitophorous vacuole ที่ถูกกั้นไว้ด้วยเยื่อหุ้มของเซลล์เจ้าบ้าน[22-23] นอกจากนั้นยังพบว่า *Pleistophora* sp. เจริญในไซโตพลาสมของเซลล์เจ้าบ้านโดยมี sporophorous vesicle ที่หนาตัวขึ้นจากการที่ปรสิตใช้เยื่อหุ้มของ เซลล์เจ้าบ้านมาหุ้มเอง[24]

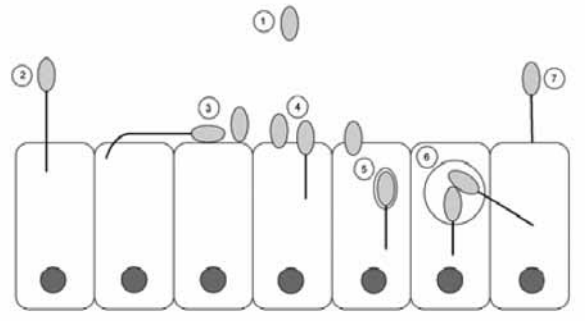

Figure 2 Hypothetical concepts of cell invasion of microsporidia. (Modified from Vivarès and Méténier. 2001.)

การจัดจำแนกสายพันธุ์ (Taxonomy) ในการจัด phylogenetic tree ของ microsporidia นั้นต้องใช้ข้อมูลจากหลากหลายเทคนิคในห้องปฏิบัติการ เช่น โครงสร้างของสปอร์ทั้งภายนอกและภายใน การย้อมพิเศษ การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (LM) กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) รวมทั้งการใช้ polymerase chain reaction (PCR) และการหาลำดับเบสเปรียบเทียบข้อมูลใน GenBank[7] ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของ microsporidia ได้ดังนี้

Enterocytozoon spp.

Enterocytozoon bieneusi Desports และคณะ[25] ได้รายงานการตรวจพบในเซลล์บุลำไส้เล็กในผู้ป่วย AIDS ที่มีอาการท้องร่วงร่วมด้วยและพบ microsporidia ชนิดนี้ในอวัยวะของระบบทางเดินอาหาร เช่น ในถุงน้ำดี ท่อน้ำดี ตับ[26] ท่อในตับอ่อน ในระบบทางเดินหายใจ เช่น หลอดลมและในเยื่อบุโพรงจมูก[27]

Enterocytozoon salmonis มีการพบการติดเชื้อ microsporidia ชนิดนี้ในปลาเซลมอน[25] และพบวงจรชีวิตหลังจากติดเชื้อชนิดนี้โดยตรงในไซโตพลาสมของเซลล์เจ้าบ้าน โดยไม่มีการสร้าง sporoplasm vesicle หรือ panspiroblastic membrane และไม่พบการแบ่งตัวของนิวเคลียสเป็นคู่ (diplokaya) ในทุกช่วงของพัฒนาการ แต่พบว่ามีหลายนิวเคลียสที่ต่อกันเป็นสายในช่วงแรกของการเกิด plasmodium และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ไม่เกิน 6 ไมโครเมตร เมื่อศึกษาด้วย TEM พบว่า microsporidia ชนิดนี้มีความเข้มของแสงที่แตกต่างกัน ซึ่งใช้เป็นส่วนช่วยในการแยกสกุลด้วยส่วนที่ทึบแสงด้านบนจะพัฒนาไปเป็นแผ่นที่เรียกว่า anchoring disc ซึ่งต่อมาจะพบ sporoblast พัฒนาใน plasmodium ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและยังคงพบเยื่อหุ้ม (plasmalema) ในระยะ plasmodialsporont และมีท่อยื่นออกมา เรียกว่า polar filament โดยที่โครงสร้างนี้จะพันรอบนิวเคลียส เมื่อพัฒนาต่อเป็น mature spore พบว่าจำนวนขดของ polar tube จะมากขึ้นและอัดแน่นในสปอร์ทำให้เกิดโครงสร้างเฉพาะที่สังเกตได้ คือ สปอร์มีรูปร่างรีขนาด 0.7-0.98x1.08-1.64 ไมโครเมตร มีเปลือกหุ้ม 2 ชั้นและมี polar filament ขด 5-7 รอบ การศึกษาโครงสร้างของสปอร์ในแนวตัดขวางจะพบว่ามี polar tube เรียงเป็น 2 แถว โดยมีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง[21]

Encephalitozoon spp.

Encephalitozoon cuniculi มีรายงานการแพร่เชื้อนี้ในกระต่ายเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1922[29] จึงได้รับการตั้งชื่อว่า *Encephalitozoon cuniculi* โดย Levaditi, Nicolau, Schoen ต่อมาในปี ค.ศ. 1923[30-31] สัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมพบการแพร่เชื้อปรสิตชนิดนี้ใน macrophage เซลล์บุผิว เซลล์บุหลอดเลือด เซลล์บุท่อไต เนื้อเยื่อสมอง

Encephalitozoon hellem มีรายงานใน ค.ศ. 1991 ว่าเชื้อปรสิตนี้มีการแพร่เชื้อได้ในเซลล์บุผิวของตาขาว เปลือกตา จมูก รวมถึงเนื้อเยื่อสมอง ไต ของผู้ป่วย AIDS[32]

Encephalitozoon cuniculli พบการแพร่เชื้อปรสิตนี้ในผู้ป่วยเด็ก 2 ราย ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ AIDS[33] แต่ในรายที่พบการแพร่เชื้อในเนื้อเยื่อตับ[34] ร่วมกับการติดเชื้อในช่องท้อง[35] จะเป็นกลุ่มคนไข้ที่มีความสัมพันธ์กับ AIDS

วงจรชีวิตของ *Encephalitozoon* spp. เนื่องจากปรสิตนี้มีวงจรชีวิตในเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้มีการใช้กระบวนการกินเยื่อหุ้มเซลล์ของเจ้าบ้านเพื่อทำให้เกิด parasitophorous vacuole (Figure 3) พบว่า meront มีการแบ่งนิวเคลียสแบบ binary fission อยู่ชิดด้านเยื่อหุ้มที่ติดกับช่องว่าง ทำให้รูปร่างของ meront พบได้ทั้งเป็นวงรีหรือเป็นวงกลม ขนาดประมาณ 1-3x2-3 ไมโครเมตร ขั้นตอนการสร้างสปอร์ เกิดจาก sporont ถูกแบ่งตัวตรงกลางของ parasitophosous vacuole ได้เป็น 2 sporoblasts และพัฒนาต่อไปจนได้สปอร์ที่สมบูรณ์ พบว่าขนาดสปอร์ของ *E. hellem* ประมาณ 1.0-1.5x2.0-2.5 ไมโครเมตร polar tube ขดอยู่ภายในสปอร์มี 5-7 รอบ

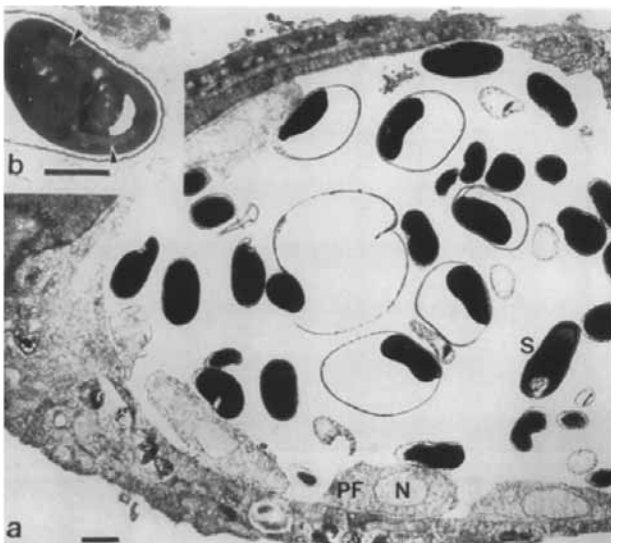

Figure 3 The electron micrograph of the mature spore in the infected fibroblast in the HIV patient. Nucleus(N), proliferative forms (PF),Bar = 1 mm. (Modified from Weber R, et al.1994.)

Sepata intestinalis การแพร่เชื้อปรสิตนี้มีรายงานครั้งแรกโดย Calli และคณะ (1993)[22, 36] ตรวจพบเชื้อปรสิตนี้ในเซลล์บุผิวของลำไส้ และ macrophage ที่แทรกในชั้น lamina propria ในลำไส้ของผู้ป่วย AIDS ต่อมามีรายงานในผู้ป่วย AIDS ที่มีภาวะท้องร่วงอย่างรุนแรง[36-38] ซึ่งตรวจพบการติดเชื้อปรสิตนี้ได้ในเซลล์บุผิวของทางเดินน้ำดี หลอดลม จมูก และไต[22, 37- 38]

S. intestinalis มีสัณฐานวิทยาและพัฒนาการของการติดเชื้อคล้ายกับ *E. encephalitozoon* spp.[22] พบว่าช่วงที่เป็น meront เชื้อปรสิตนี้จะแบ่งเซลล์ในไซโตพลาสมของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้ความยาวของ meront เพิ่มมากขึ้น ต่อมาจะมีช่องว่างมาคั้นระหว่างนิวเคลียส แต่ต่างกับ *S. intestinalis* ที่

มีการพัฒนาเยื่อหุ้มที่มากั้นแต่ละนิวเคลียสจนเป็น เกิดผนังกั้น (septum) จึงเป็นที่มาของการตั้งชื่อ *septata* การเกิด mature spore จะพบว่ามีขนาดเล็กเพียง 1.2x2 ไมโครเมตรและมี polar tube ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มม. X 1.2 ไมโครเมตรซึ่งพันเป็นขด 4-7 รอบ (Figure 4)

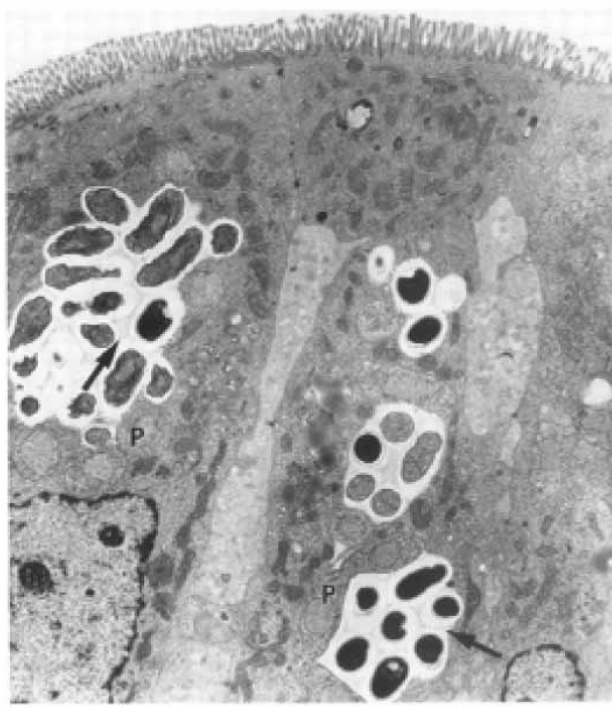

Figure 4 The electron micrograph of the spore of the *S. intestinalis*. Proliferative forms (P) Magnification, X7,260. (Modified from Weber R, et al.1994)

Pleistophora sp. ปรสิตนี้พบได้ในแมลง ในสัตว์มีกระดูกสันหลังโดยพบมากที่สุดในปลา[39] ในคนพบการแพร่เชื้อของปรสิตนี้ในเซลล์กล้ามเนื้อของผู้ป่วย AIDS ร่วมกับการอักเสบของกล้ามเนื้อ[27, 40] พบว่าการแพร่เชื้อปรสิตนี้เกิดขึ้นในไซโตพลาสมของเซลล์เจ้าบ้านจะมีลักษณะพิเศษคือ ปรสิตจะสร้างถุงน้ำมาเชื่อมกับเซลล์เจ้าบ้านทำให้ผนังหนาตัวขึ้น ถุงน้ำที่เกิดขึ้นเรียกว่า sporophorous vesicle การแบ่งตัวของนิวเคลียสตลอดวงจรชีวิตจะไม่พบเป็นคู่ ในช่วง merogony จะพบการแบ่งตัวของนิวเคลียสเรียงต่อกันไปมากมาย ทำให้เกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า multinucleate plasmodia เมื่อเข้าสู่ sporogony การเกิดสปอร์พบว่ามีความสัมพันธ์กับจำนวนนิวเคลียสภายใน plasmodium พบว่าขนาดของสปอร์ประมาณ 2.8x3.2-3.4 ไมโครเมตร ท่อของ polar tube มีจำนวนขดอยู่ภายในสปอร์ 9-12 รอบ

Nosema spp. เป็น *Microsporidian* spp. พบว่าเป็นปรสิตที่ได้รับการตั้งชื่อเป็นชนิดแรก[39] การแพร่เชื้อของปรสิตชนิดนี้ พบว่าแพร่เชื้อโดยตรงเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ในช่วง meront นิวเคลียสมีการแบ่งตัวเป็นคู่[16,41] การติดเชื้อปรสิตชนิด *Nosema* spp. ในคนมีรายงานเพียง 1 ราย จากการชันสูตรศพของเด็กที่ไม่มีต่อมไทมัส (athymic child)[42] โดย Margileth และคณะในปี ค.ศ. 1973 ซึ่งการตรวจผลชิ้นเนื้อพบเพียง sporoblast และ mature spore ที่มีขนาด 2.0-2.5x4.1-4.5 ไมโครเมตร มีท่อ polar tube ขดเป็นวงในสปอร์จำนวน 11 รอบ และได้ตั้งชื่อปรสิตนี้ว่า *Nosema connori* (Figure 5)

Figure 5 The electron micrograph of the *Nosema connori*. (X30,000) (Modified from http://emedicine.medscape.com/article/221631-overview)

Microsporidium ในการศึกษาที่ผ่านมา การจัดจำแนกปรสิตนี้ใช้ลักษณะเฉพาะของวงจรชีวิตในเซลล์เจ้าบ้าน โครงสร้างภายในสปอร์ รวมทั้งการแพร่เชื้อในสิ่งมีชีวิตต่างๆ แต่ยังคงมีกลุ่มปรสิตนี้ที่ไม่สามารถจัดกลุ่มตามอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ตามที่กล่าวมาได้อาจเนื่องจากข้อมูลของวงจรชีวิตสัณฐานวิทยา ชีวโมเลกุลจากฐานข้อมูลของ GenBank อย่างเช่น *Microsporidium ceylonensis* (ในผู้ป่วย corneal ulcer)[41], *Microsporidium africanum* (ในผู้ป่วย corneal stroma) จึงจัดให้อยู่ในกลุ่มของ microsporidium

ระบาดวิทยา (Epidermiology) พบข้อมูลการติดเชื้อ microsporidia ในคนมากขึ้นแต่ยังไม่สามารถอธิบายกลไกและวิธีการถ่ายทอดจากสัตว์สู่คนได้ครบถ้วน พบว่ารายงานครั้งแรกพบในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง HIV-Microsporidiosis

ดังนั้นการระบาดที่เกิดขึ้นในคนจึงแบ่งได้เป็น กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และกลุ่มที่ 2 ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (CD4 < 100 cells/microL)[46] ณ ปัจจุบัน การศึกษาระบาดวิทยาในคนพบว่ามีอัตราการเพิ่มขึ้นของภาวะแทรกซ้อนในการเกิดภาวะถ่ายอุจจาระเหลวหรือสูญเสียน้ำเป็นร้อยละ 7-50[47-55] และอัตราความเสี่ยงจากการติดเชื้อจากสัตว์ปีกเพิ่มเป็นร้อยละ 3 จากการรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ HIV จำนวน 2652 คนในเปรู[56] นอกจากนั้นยังพบรายงานจากผู้ป่วย 106 คน พบว่ามีถึงร้อยละ 15 จากการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งในกรณีดังกล่าวอาจพบและไม่พบผู้ป่วยมีภาวะถ่ายอุจจาระเหลวร่วมด้วย[57]

การติดเชื้อ microsporidia ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อ HIV เช่นในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่ปลูกถ่ายเนื้อเยื่อไขกระดูก ไต พบผู้ป่วยมีอาการถ่ายอุจจาระเหลวเรื้อรังภายหลังจำนวน 47 ราย และผู้ป่วยจำนวน 17 ราย ที่ตรวจ PCR ในระบบทางเดินอาหารพบเชื้อ *E. bieneusi*[58] ทั้งนี้ยังไม่พบกลไกการก่อโรคในคนจากการที่ mature spore แทรกเข้ามาก่อโรคในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งพบว่าวงจรชีวิตของ microsporidia บางส่วนอยู่ในสัตว์ ทำให้เป็นที่น่าสังเกตว่าการติดเชื้อนี้อาจมีปัจจัยของสปีชี่ร์ของ microsporidia มีส่วนสำคัญในการติดเชื้อดังกล่าวด้วย[59] ทำให้การวินิจฉัยการติดเชื้อนี้ต้องใช้ทั้งสัณฐานวิทยา ระยะต่างๆ ของปรสิตที่พบในเซลล์เจ้าบ้าน ช่วงที่การระบาดของเชื้อ รวมทั้งความสามารถในการตอบสนองต่อต้านเชื้อของเซลล์เจ้าบ้านด้วย มีการทดลองครั้งแรกโดยใช้ *E. cuniculi* ที่เลี้ยงในหนู นำซีรั่มมาตรวจสอบพบเอนติบอดี้ต่อเชื้อนี้[60-61]

การถ่ายทอดเชื้อสู่คน การติดเชื้อของ *Microsporidia* spp. ในคน ยังไม่พบกลไกและโฮสกักเก็บเชื้อ (reservoir host) และโฮสต์ตัวกลาง (intermeditated host) ที่ชัดเจน มีรายงานการติดเชื้อในคนของ *Enterocytosoon* sp. ซึ่งตรวจพบเชื้อในอุจจาระ ปัสสาวะ สารคัดหลั่งจากทางเดินหายใจ ส่วนมากในสัตว์จะพบการติดเชื้อของ *Encephalitozoon* sp. ซึ่งมีรายงานการติดเชื้อจาก *E. cuniculi* จากสัตว์มาสู่คน[32, 60-61] *N. algerae* มีวงจรชีวิตในยุง ในการทดลองพบสปอร์แต่ไม่สามารถถ่ายทอดสู่หนูขาวได้[62] ยังไม่พบรายงานการติดเชื้อมาสู่คนได้แม้จะพบสปอร์ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ที่กล่าวมา[63]

มีความเป็นไปได้ว่าการถ่ายทอดของเชื้อเข้าสู่คนจะเกิดจากการได้รับเข้าสู่ร่างกายโดยตรงจากการได้รับประทานอาหารที่มีอุจจาระปนเปื้อน[37] การร่วมเพศ[64] ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและทวารหนักได้ เช่น *Enterocytozoon* sp. จากผลของระบาดวิทยาในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (กบ)[65] สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (สุนัข ลิง)[66-67] พบการถ่ายทอดของ *Encephalitozoon hellem* จากแม่สู่ลูกทางรกได้[67-68]

พยาธิวิทยาสรีรวิทยา (Pathophysiology) การศึกษาพยาธิวิทยาของ sporidiosis ในคนทำได้ในวงจำกัด เนื่องจากตรวจพบไม่ครบวงจรชีวิตของ microsporidia อีกทั้งยังพบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องในโรงพยาบาล ทำให้การตรวจหาเชื้อจากสิ่งส่งตรวจที่เกิดความผิดปกติของระบบต่างๆ ของผู้ป่วยเป็นไปได้ยาก ดังนั้นการตรวจพบเชื้อจากสารคัดหลั่ง เสมหะ น้ำปัสสาวะ และอุจจาระ ทำให้การอธิบายพยาธิสรีรวิทยาของโรคยังไม่ครบถ้วน แต่สามารถอธิบายการติดเชื้อแยกตามสกุลและระบบต่างๆ ของร่างกายได้ดังนี้

1. ระบบทางเดินอาหารเกิดจากการติดเชื้อของ *Enterocytozoon bieneusi* เชื้อนี้พบการกระจายของเชื้อในเซลล์บุผิวของลำไส้และทางเดินน้ำดี เริ่มเข้าสู่เซลล์ทางด้านบนของเซลล์ ทำลายเซลล์อย่างรุนแรง ทำลายโกเบล็ทเซลล์ (goblet cell) เกิดภาวะเซลล์ฝ่อ (atrophy) และเชื่อมติดกัน ทำให้เกิดโรคลำไส้ (enteropathy) ในผู้ป่วย AIDS (AIDS enteropathy)[69] นอกจากนั้นยังพบการติดเชื้อเซลล์บุผิวที่ทางเดินหายใจ เซลล์ท่อของตับอ่อน เซลล์ตับ ไม่พบว่ามีการทำลายเซลล์ แต่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์บริเวณที่มีการอักเสบ ต่อมาจะพบการตีบของท่อทางเดินน้ำดี การวินิจฉัยทางจุลกายวิภาค (Histological study) พบว่า *E. bieneusi* อยู่ในเนื้อเยื่อยึดต่อใต้เยื่อบุผิว (lamina propria)[70]

2. ระบบทางเดินอาหาร เกิดจากการติดเชื้อและแพร่กระจายของ *S. intestinalis* พบการอักเสบของลำไส้เล็ก ร่างกายมีปฏิกิริยาตอบสนองในขณะที่เชื้อเข้าสู่เซลล์บุผิว มีความสัมพันธ์กับมาโครฟาจเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cell) เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) ใน lamina propria ยังพบความสัมพันธ์ของมาโครฟาจกับการติดเชื้อในไต ทางเดินหายใจส่วนล่าง ท่อทางเดินน้ำดี Histological study พบการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อต่อการอักเสบเรื้อรังของท่อไต (granulomatous tubelointerstitialnephrits) โดยมีเซลล์เม็ดเลือดขาวมารวมตัวกัน เช่น มาโครฟาจลิมโฟไซต์พลาสมาเซลล์และเซลล์ยักษ์แบบแลงฮานส์ (Langhan-type multinucleated giant cell)

3. การแพร่กระจายของเชื้อ *Encephalitozoon* spp. จากสัตว์ (encephalitozoonosis) โดยปกติแล้วขนาดที่เล็กของสปอร์ทำให้เกิดการติดต่อในสัตว์โดยพบที่เซลล์บุระบบทางเดินอาหารต่อมาพบในระบบประสาทส่วนกลางในหนู ส่วนในคนพบว่า *Encephalitozoon hellem* ไม่พบการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร แต่พบในเซลล์บุตา ทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะ กลไกการติดเชื้อยังไม่สามารถอธิบายได้ แต่มีรายงานผลชิ้นเนื้อของผู้ป่วย AIDS เชื่อว่าเกิดจากการได้รับเชื้อทางระบบทางเดินหายใจ[71] และยังเป็นเส้นทางการแพร่เชื้อต่อไป

ของสปอร์ด้วย พบการติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนต้นและแพร่เข้าสู่กระแสเลือดและกระจายไปยังไต มีการกระจายของเชื้อทำให้เกิด interstitial nephritis พบทั้ง มาโครฟาจ และพลาสมาเซลล์ ในบริเวณที่เกิดเนื้อเยื่อเน่าตาย

ส่วนในตับของผู้ป่วย HIV มีสปอร์ของเชื้อในเซลล์ตับ[31] และยังพบเนื้อเน่าตายแบบ granulomatous necrosis ร่วมด้วย

แม้ว่าจะพบเชื้อ *Enterocytozoon bieneusi, Encephalitozoon hellem* และ *S. intestinalis* ในระบบทางเดินหายใจ จากการเก็บสารคัดหลั่งด้วยการทำ bronchoaveolar lavage เมื่อทำการทดลองในกระต่ายโดยการฉีดสปอร์เข้าไปในจมูกโดยตรง ยังไม่สามารถสรุปการติดเชื้อโดยตรงได้จากการทดลองนี้ แต่มีรายงานเพียงพบว่ามีการติดเชื้อรอบสองในระบบทางเดินอาหารเป็นที่น่าสังเกตว่า การติดเชื้อ *Encephalitozoon* ในสัตว์น่าจะมาจากผ่านการมีเพศสัมพันธ์ทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินอาหารส่วนปลาย[72]

4. การติดเชื้อของ *Nosema* พบรายงานในผู้ป่วยเด็ก อายุ 4 เดือน จากผลการตรวจชิ้นเนื้อพบการติดเชื้อในทุกอวัยวะ ยกเว้นตับอ่อน[42]โดยพบมากที่กล้ามเนื้อกระบังลม ต่อมากระจายของเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดแล้วแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ

5. กล้ามเนื้ออักเสบ (Myositis) พบ Microsporidia ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อเป็นกลุ่มของสปอร์ในกล้ามเนื้อปลาคือ *Pleistophora* sp. มีรายงานการติดเชื้อในผู้ป่วย AIDS 2 ราย พบเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่มตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ลิมโฟไซต์พลาสมาเซลล์ฮีสติโอไซต์รอบๆ กล้ามเนื้อที่มีการอักเสบ[24, 43] ยังไม่พบการรับเชื้อจากภายนอก

6. ตาอักเสบ (Ocular infection) เป็นการติดเชื้อที่พบได้บ่อยของโรคนี้ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง และในผู้ป่วยที่พบ *Nosema* sp.เป็นเชื้อที่ติดต่อและมีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยที่มีตาอักเสบแบบ keratitis และ corneal ulcer พบสปอร์ในมาโครฟาจแทรกในชั้นแก้วตา ร่วมกับมีเซลล์เม็ดเลือดขาว mononuclear monocyte และ neutrophil[14, 43]

การตรวจวินิจฉัยโรค

ในการวินิจฉัยที่นิยมคือการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแสงและอิเล็กตรอนสัณฐานวิทยาของแต่ละช่วงพัฒนา sporogony, merogony ขนาด รูปร่างของสปอร์ในแต่ละ Microsporidia spp. ที่แตกต่างกัน นำมาซึ่งการวินิจฉัยแยกเชื้อในเนื้อเยื่อต่างๆ ของผู้ป่วย เทคนิคนี้พัฒนามากในการตรวจหาเชื้อในอุจจาระ[67] ด้วยการย้อม Giemsa, trichrome[73], H&E, chromotrope นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง (Figure 6)

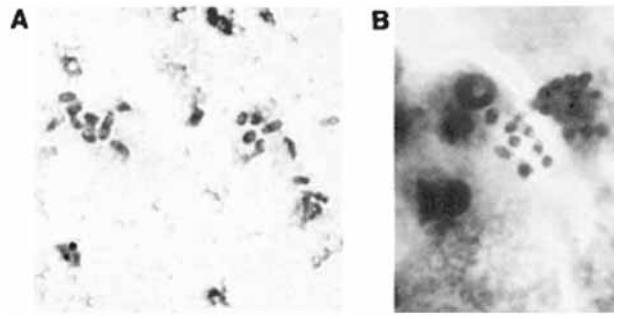

Figure 6 The light micrograph of the specific stain (Ryan-Blue modified trichrome) of the microsporidial spores. (A) The spores from the feces, (B) The spores from the intestinal epithelium (Modified from Garcia SL. 2002.)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ใช้ในการแยก microsporidia แต่ละสปีชี่ร์ จากขนาดและรูปร่างของสปอร์และศึกษาภายในโดยการนับจำนวนขดของ polar filament รอบเป็นแบบเดี่ยวหรือคู่ เนื่องจากต้องใช้เวลาในการเตรียมเนื้อเยื่อ ขนาดของเนื้อเยื่อที่เล็ก (1x1 มิลิเมตร) ปริมาณของเชื้อในสิ่งส่งตรวจ ความชำนาญในการแยกประเภท ทำให้การวินิจฉัยแยกโรคได้ช้า (Figure 7)

Enterocytozoon spp. สามารถมีการตอบสนองต่อระบบภูมคุ้มกันของร่างกายจะใช้การตรวจหาเอนติบอดี้ในซีรั่ม ส่วน *Nosema* sp. และ *Encephalitozoon* sp. สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ จากข้อมูลของ GenBank ทำให้สามารถใช้ PCR ในการตรวจหาเชื้อนี้ได้ และพัฒนา probe ทำ immunohistochemistry ในการตรวจวินิจฉัยได้แม่นยำยิ่งขึ้น

Figure 7 The electron micrograph of the *Encephalitozoon intestinalis* in the small intestine. (Modified from Garcia SL. 2002.)

ในปี ค.ศ. 2011 มีการตรวจในผู้ป่วย keratitis จำนวน 30 ราย โดยใช้เทคนิค PCR นำ primers ตรวจหาเชื้อ microsporidia spp. (*Vittaforma corneae*) ได้ PCR product 1200 bp พบเชื้อนี้จำนวน 10 ราย[74] จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณน้อย รวดเร็ว และผู้ป่วยจำนวนมาก

บทสรุป

การติดเชื้อ microsporidia ในคนมีรายงานในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และผู้ป่วยมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องเป็นส่วนมาก กลไกการกระจายของเชื้อเข้าสู่คนยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัด มักจะเป็นการติดเชื้ออย่างรุนแรงในระบบทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ ทางเดินหายใจ และตา แม้ว่าจะมีการทดลองนำสปอร์ของเชื้อสปีชี่ร์ต่าง ๆ มาฉีดเข้าโดยตรงกับสัตว์ทดลอง แต่ยังไม่สามารถยืนยันการติดต่อสู่คนได้อย่างชัดเจน พบการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ โดยรอบเนื้อเยื่อที่เน่าตาย ซึ่งเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยในแต่ละอวัยวะที่ถูกรุกราน การศึกษาจากเนื้อเยื่อวิทยาตลอดจนการตรวจพิเศษต่าง ๆ จึงพัฒนาเพื่อให้ทันต่อการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้น Microsporidiosis ในคน นอกจากจะคำนึงถึงการซักประวัติการติดเชื้อ HIV การตรวจร่างกายยังต้องใช้การเก็บสารคัดหลั่ง และเนื้อเยื่อ ของผู้ป่วยเพื่อทำการตรวจวินิจฉัยโดยใช้การย้อมพิเศษเพื่อตรวจหาสปอร์ เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาและการสกัดสารพันธุกรรมของ microsporidia ที่ก่อโรคเพื่อใช้การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ที่มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัย Microsporidiosis ในผู้ป่วยต่อไป จากการพบทวนวรรณกรรมยังพบความยากลำบากในการวินิจฉัยโรคนี้จากการตรวจด้วยเทคนิคต่าง ๆ ที่กล่าวมา จึงควรมีการศึกษาสารพันธุกรรมของเชื้อนี้ในสัตว์และในคนเพื่อให้เกิดการรายงานเข้าไปใน GenBank accession number ทำให้การตรวจวินิจฉัยได้เร็วขึ้นและแม่นยำมากยิ่งขึ้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Canning EU, Lom J. The microsporidia of vertebrates. Academic Press, Inc., New York. 1986.
2. Shadduck JA, Pakes SP.Spontaneous disease of laboratory animals which interfere with biomedical research: Enterocytozoonosis and toxoplasmosis. Am J Pathol 1971;64:657-674.
3. Siebold HR, Fessell EN. Intestinal microsporidiosis in *Callicebusmoloch*. Lam AnimSci 1973:23:115-118.
4. Mathis A., Weber R, Deplazes, P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* 2005;18(3):423-445.
5. Leelayoova S, Subrungruang I, Rangsin R, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Worapong J, Naaglor T, Mungthin M. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* genotype A in a Thai orphanage. Am J Trop Med Hyg 2005;73:104-107.
6. Suankratay C, Thiansukhon E, Nilaratanakul V, Putaporntip C, Jongwutiwes S. Disseminated Infection Caused by Novel Species of Microsporidium, Thailand. Emerg Infect Dis. 2012;18(2):302–304.
7. Matos O, Lobo ML, Xiao L. Epidermiology of *Enterocytozoon bieneusi* infection in humans. J Parasitol Res 2012;2012: 1-19.
8. Sprague V, Becnel JJ, Hazard EI. Taxonomy of phylum Microspora. Crit Rev Microbiol 1992;18: 285-395.
9. Weidner EZ. Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. Parasitenkd 1972;40:227-242.
10. De Groote MA, Visvesvara G, Wilson ML, Pieniazek NJ, Slemenda SB, DaSilva AJ, Leitch GJ, Bryan RT, Reves R. PCR and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. J Infect Dis 1995;171:1375–1378.
11. Tosoni A, Nebuloni M, Ferri A, Bonetto S, Antinori S, Scaglia M, Xiao L, Moura H, Visvesvara GS, Vago L, Costanzi G. Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi*III(dogtype) in an Italian AIDS patient: a retrospective study. Mod Pathol 2002; 15:577–583.
12. Fayer R. Infectivity of microsporidia spores stored in seawater at environmental temperatures. J Parasitol 2004;90:654–657.
13. Canning EU, Lom J, Dykova I. The *Microsporidia* of vertebrates. Academe Press. New York 1986.
14. Shadduck JA, Polley MB. Some factors influencing the *in vitro* infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi*. J Protozool 1978;25:491-496.
15. Koudela B, Kučerová Š, Hudcovic T. Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. Folia Parasitol 1999;46:171-174.

16. Franzen C. How do microsporidia invade cells? Folia Parasitol Rev 2005;52:36–40.
17. Bigliardi E, Saxxhi L. Cell biology and invasion of the microsporidia. Microbes Infect 2001;3:373–379.
18. Magaud A, Achbarou A, Desportes LI. Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. J EukaryotMicrobiol 1997;44:81S.
19. Foucault C, Drancourt M. Actin mediates *Encephalito zoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2. MicrobPathog 2000;28:51–58.
20. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. ClinMicrobiol Rev 1994;7(4): 426-461.
21. Cali A, Owen RL. Intracellular development of *Enterocyto zoon*, a unique microsporidian found in the intestine of AIDS patients. J Protozool 1990;37:145-155.
22. Cali A, Kotler DP, Orenstein JM. *Septata intestinalis* n.g., n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. J Protozool 1993;40:101-112.
23. Canning EU. Microsporidia.. In Kreier JP, Baker JR, editors. Parasitic protozoa. 2nded. New York: Academic Press; 1993. vol. 6. P. 299-385.
24. Chup GL, Alroy J, Adelman LS, Breen JC, Skolnilk PR. Myositis due to *Pleistophora* (microsporidia) in a patient with AIDS. Clin Infect Dis 1993;16:15-21.
25. Desportes IY, Le C, Galian A, Bernard F, Cochand-Priollet B, Lavergne A, Ravisse P, Modigliani R. Occurrence of a new microsporidian, *Enterocytozoon bieneusi*n.g., n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. J Protozool 1985;32:250-254.
26. Pol S, Romana C, Richard S, Carnot F, Dumont JL, Bouche H, Pialoux G, Stern M, Pays JF, Berthelot P. *Enterocytozoon bieneusi* infection in acquired immunodeficiency syndrome-related sclerosing cholangitis. Gastroenterology 1992;102:1778-1781.
27. Hartskeerl RA, Schuitema ARJ, Gool TV, Terpstra J. Genetic evidence for the occurrence of extra-intestinal *Enterocytozoon bieneusi* infections. Nucleic Acids Res 1993;21:4150.
28. Chilmonczyk S, Cox WT, Hedrick RP. *Enterocyto-zoon salmonis*n.sp.: an intranuclear Microsporidium from salmonid fish. J Protozool 1991;31:264-269.
29. Wright JH, Craighead EM. Infectious motor paralysis in young rabbits. J Exp Med 1922;36:135-140.
30. Levaditi C, Nicolau S, Schoen R. L'agentetiologique de l'encephaliteepizootique du lapin *(Encephalitozoon cuniculi)*. CR SocBiol Paris 1923;89:984-986.
31. Weiser J. On the taxonomic position of the genus *Encephalitozoon* Levaditi, Nicolau&Schoen, 1923 (Protozoa, *Microsporidia*). Parasitol 1964;54:749-751.
32. Didier ES, Didier PJ, Friedberg DN, Stenson SM, Orenstein JM, Yee RW, Tio F0, Davis RM, Voss-brinck C, Millichamp N, Shadduck JA. Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n.sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. J Infect Dis 1991;163:617-621.
33. Matsubayashi H, Koike T, Hagiwara S. A case of *Enterocytozoon*-like body infection in man. Arch Pathol 1959;67:181-187.
34. Terada S, Reddy KR, Jeffers LJ, Cali A, Schiff ER. Microsporidian hepatitis in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1987;107:61-62.
35. Zender HO, Arrigoni E, Eckert J, Kapanci Y. A case of *Encephalitozoon cuniculi* peritonitis in a patient with AIDS. Am. J ClinPathol 1989;92:352-356.
36. Cali A, Orenstein JM, Kotler DP, Owen RL. A comparison of two microsporidian parasites in enterocytes of AIDS patients with chronic diarrhea. J Protozool 1991;38:S96-S98.
37. Orenstein JM, Dieterich DT, Kotler DP. Systemic dissemination by a newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS. AIDS 1992;6:1143-1150.
38. Orenstein JM, Tenner M, Cali A, Kotler DP. A micro-sporidian previously undescribed in humans, infecting enterocytes and macrophages, and associated with diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient. Hum Pathol 1992;23:722-728.
39. Canning, EU, Hollister WS. Microsporidia of mammals-widespread pathogens or opportunistic curiosities? Parasitol Today 1987;3:267-273.
40. Ledford DK, Overman MD, Gonzalo A, Cali A, Mester W, Lockey RF. Microsporidiosis myositis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1985;102:628-630.

41. Ashton N, Wirasinha PA. Encephalitozoonosis (Nosematosis) of the cornea. Br J Ophthalmol 1973;57:669-674.
42. Margileth AM, Strano AJ, Chandra R, Neafie R, Blum M, McCully RM. Disseminated nosematosis in an immunologically compromised infant. Arch Pathol 1973;95:145-150.
43. Pinnolis M, Egbert PR, Font RL, Winter FC. Nosematosis of the cornea. Arch Ophthalmol 1981;99:1044-1047.
44. Canning EU, Hollister WS. Human infections with microsporidia. Rev Med Microbiol 1992;3:35-42.
45. Didier ES, Shadduck JA, Didier PJ, Millichamp N, Vossbrinclk DR. Studies on ocular microsporidia. J Protozool 1991;38:635-638.
46. Leder K, Weller PF. Microsporidiosis. Uptodate. Dec 17, 2014.
47. Kotler DP, Orenstein JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. AM J Gastroenterol 1994;89;1998.
48. EeftinckSchattenkerk JK, van Gool T, vanKetel RJ, Bartelsman JF, Kuiken CL, Terpstra WJ, Reiss P. Clinical significance of small-intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals. Lancet 1991;337:895.
49. Kotler DP, Francisco A, Clayton F, et al. Small intestinal injury and parasitic diseses in AIDS. Ann Intern Med 1990;113:444.
50. Conteas CN, Berlin OG,Lariviere MJ, Pandhymas SS, Speck CE, Porschen R, Nakaya T. Examination of the prevalence and seasonal variation of intestinal microsporidiosis in the stools of persons with chronic diarrhea and human immunodeficiency virus infection. Am J Trop Med Hyg 1998;58:559.
51. Framm SR, Soave R, Agents of diarrhea. Med Clin North AM 1997;81:427.
52. Wuhib T, Silva TM, Newman RD, Garcia LS, Pereira ML, Chaves CS, Wahlquist SP, Bryan RT, Guerrwnt RL, Sousa de Q. Cryptosporidial infections in human immunodeficiency virus-infection patients in northeastern Brazil. J Infect Dis 1994;170:494.
53. Drobniewski F,Kelly P, Carew A, Ngwenya B, Luo N, Pankhurst C, Farthing M. Human microsporidiosis in African AIDS patients with chronic diarrhea. J Infect Dis 1995;171:515.
54. Van Gool T, Luderhoff E, Nathoo KJ, Kiire CF, Dankert J, Mason PR. High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* infections among HIV-positive individuals with persistent diarrhea in Harare, Zimbabwe. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995;89:478.
55. Sobottka I, Schwartz DA, Schottelius J, Viscesvara GS, Pieniazek NJ, Schmetz C, Nock NP, Laufs R, Albrecht H. Prevalence and clinical significance of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with and without diarrhea in Germany: a prospective coprodiagnosis study. Clin Infect Dis 1998;26:475.
56. Bern C, Kawai V, Vargas D, Rabke-Verani J, Williamson J, Chavez-Valdez R, Xiao L, Sulaiman I, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Cama V, Moura H, Secor WE, Visvesvara G, Gilman GH. The epidermiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima, Peru. J Infect Dis 2005;191:1658.
57. Rabeneck L, Gyorkey F, Genta RM, Gyorkey P, Foote LW, Risser JM. The role of Microsporidia in the pathogenesis of HIV-related chronic diarrhea. Ann Intern Med 1993;119:895.
58. Lores B, López-Miragaya I, Arias C, Fenoy S, Torres J, del Aguila C. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain. Clin Infect Dis 2002;34:918.
59. Weiss LM, Cali A, Levee E, Lapplace D, Tanowitz H, Simon D, Wittner M. Diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection by Western blot and the use of cross-reactive antigens for the possible detection of microsporidiosisi in humans. Am J Trop Med Hyg 1992;47:456-462.
60. Didier PJ,. Didier ES, Orenstein JM, Shadduck JA. Fine structure of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, in culture. J Protozool 1991; 38:502-507.
61. Visvesvara GS, Leitch GJ, Moura H, Wallace S, Weber R, Bryan RT. Culture, electron microscopy, and immunoblot studies on a microsporidian parasite

isolated from the urine of a patient with AIDS. J Protozool 1991;38:S105-S111.

62. Undeen AH, Alger NE. Infection of the white mouse by a mosquito parasite. ExpParasitol 1976;40:86-88.
63. Avery SW, Undeen AH. The isolation of microsporidia and other pathogens from concentrated ditch water. J Am Mosq Control Assoc 1987;3:54-58.
64. Schwartz DA, Visvesvara GS, Weber R, Bryan RT. Male genital tract microsporidiosis and AIDS: prostatic abscess due to *Encephalitozoon hellem*. J Eukaryot Microbiol, in press.
65. Mohn SF, Nordstoga K, Dishington IW. Experimental encephalitozoonosis in the blue fox. Clinical, serological and pathological examination of vixens after oral and intrauterine inoculation. Acta Vet Scand 1982;23:490-502.
66. Nordstoga K. Nosematosis in the blue fox. North Vet Med 1972;24:21-24.
67. Zeman DH, Baskin GB. Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiris ciureus*). Vet Pathol 1985;22:24-31.
68. Hunt RD, King NW, Foster HL. Encephalitozoonosis: evidence for vertical transmission. J Infect Dis 1972;126:221-224.
69. Ullrich R, Zeitz M, Heise W, L'age M, Hoifken G, Riecken E0. Small intestinal structure and function in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV): evidence for HIV-induced enteropathy. Ann Intern Med 1989;111:15-21.
70. Schwartz DA, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS, Weber R, Bryan RT. Enteroinvasive *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) infection in a patient with AIDS. Submitted for publication.
71. Schwartz DA, Bryan RT, Hewan-Lowe K0, Visvesvara GS, Weber R, Cali A, Angritt P. Disseminated microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) and acquired immunodeficiency syndrome. Arch Pathol Lab Med 1992;116:660-668.
72. Wicher V, Baughn RE, Fuentealba C, Shadduck JA, Abbruscato F, Wicher K. Enteric infection with an obligate intracellular parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in an experimental model. Infect Immun 1991;59:2225-2231.
73. Garcia SL. Minireview Laboratory Identification of the Microsporidia J Clinical Microbiol 2002;40(6):1892–1901
74. Reddy AK, Balne PK, Gaje K, Garg P. PCR for the diagnosis and species identification of microsporidia in patients with keratitis. ClinMicrobiol Infect 2011;17: 476–478.
75. http://emedicine.medscape.com/article/221631-overview