

МИКРОСПОРИДИИ – АГЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БОРЬБЫ ПРОТИВ КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ

А.М. Насиров, Н.Э. Ибрагимова, Ф.Г. Рзаев*

Лаборатория паразитологии, Институт Зоологии НАН Азербайджана, Баку, Азербайджан

MICROSPORIDIA – BIOLOGICAL CONTROL AGENTS AGAINST BLOOD-SUCKING MOSQUITOES

A.M. Nasirov, N.E. Ibrahimova, F.H. Rzayev (Laboratory of Parasitology, Institute of Zoology of ANAS, Baku, Azerbaijan)

Резюме. В лабораторных условиях была опробована микроспоридия *Amblyospora opacita* Kudo, 1922 в качестве агента биологической борьбы с переносчиками возбудителей многих опасных инфекционных и инвазионных заболеваний - кровососущих комаров (*Aedes caspius* Pallas, 1771). Изучено влияние микроспоридиоза на смертность, рост, период развития, линьку и пол личинок. Установлено, что приготовленный титр суспензии $1,1 \times 10^5$ спор/ml более эффективна (до 90,7%) против личинок кровососущих комаров.

Abstract. Microsporidia *Amblyospora opacita* Kudo, 1922 was tested in laboratory conditions as an agent of biological control of vectors of pathogens of many dangerous infectious and invasive diseases - blood-sucking mosquitoes (*Aedes caspius* Pallas, 1771). The effect of microsporidiosis on mortality, growth, developmental period, molting and sex of larvae was studied. It was found that the prepared suspension titer of 1.1×10^5 spores / ml is more effective (up to 90.7%) against the larvae of blood-sucking mosquitoes.

Ключевые слова: *Amblyospora opacita*, *Aedes caspius*, суспензия, влияние на рост, вес, линьку, пол

Keywords: *Amblyospora opacita*, *Aedes caspius*, suspension, impact on growth, weight, molting, sex

* Рзаев Фуад Гусейнали оглу, лаборатория Паразитологии, Институт Зоологии НАН Азербайджана, AZ1004, ул. А.Аббасаде, 1128/504, Баку, Азербайджан, e-mail: fuad.zi@mail.ru

Received: 17 September 2020; **Accepted:** 23 November 2020; **Published:** 20 December 2020.

1. Введение

Вместе с тем, что комары влияют на значительное снижение мясомолочной продуктивности, в летние месяцы причиняют неудобства в труде и отдыхе людей, эти насекомые являются переносчиками возбудителей многих опасных инфекционных и инвазионных заболеваний (Kunicha, 2007; Manafov *et al.*, 2017). В водоемах, где распространены личинки комаров в борьбе с ними используют химические препараты, содержащие хлор, фтор и др. вещества, что отрицательно влияет на другие живые организмы, приводит к их гибели, и как следствие - загрязнению водоемов (Alirzaev, 1989). В результате нарушается целостность, годами сформировавшейся экосистемы.

В настоящее время Всемирная Организация Здравоохранения рекомендует применять биологические методы в борьбе с комарами - переносчиками возбудителей различных инфекционных и инвазионных заболеваний. В связи с

этим, в настоящее время важность внедрения и применения биологических методов борьбы с кровососущими комарами, имеет большое практическое значение. Одно из основных мест в биологической борьбе с кровососущими комарами занимают микроспоридии. Они препятствуют широкому распространению комаров в естественных условиях.

Микроспоридии – внутриклеточные, облигатные паразиты, встречаются в организмах всех систематических групп, в том числе и природных популяциях кровососущих комаров. В местах массового размножения кровососущих комаров, созданные микроспоридиями эпизоотии, приводят к погашению возникших очагов (Alimov, 2007).

Кроме того, уже доказано, что у зараженных микроспоридиями комаров задерживается развитие малярийного плазмодия (Antony *et al.*, 1972; Ward & Savage, 1972, Koella *et al.*, 2009). Большинство известных видов микроспоридии встречаются, у насекомых, в том числе и представителей семейства Culicidae, к которому относятся и кровососущие комары. С тех пор, как началось применение метода электронной микроскопии, была установлена уникальная структура спор, выявлены отличные от других систематических групп, признаки, что позволило выделить микроспоридии в отдельный тип (Sprague, 1997; Adl *et al.*, 2019).

Различными исследователями изучены видовой состав, экология, молекулярная филогения микроспоридий кровососущих комаров (Issi, 1986; Wittner & Weiss, 1999; Voronin, 1999; Simakova, 2013; Seyed-Mohammad *et al.*, 2016). В Азербайджанской Республике у 4 видов кровососущих комаров выявлено 10 видов микроспоридий (Alikhanov, 1972, 1986).

Принимая во внимание вышесказанное, нами была поставлена цель - выявить видовой состав микроспоридий, паразитирующих в личинках кровососущих комаров в водоемах Азербайджана Северо-Восточной береговой части Среднего Каспия и Абшерона, и определить возможность применения микроспоридий в биологической борьбе с кровососущими комарами.

2. Материалы и методы исследования

Личинки комаров (более 8000 особей) были собраны в течение 2017-2020 гг. в прибрежных водоемах и озерах Абшерона (Забрат-Маштага-Кюрдаханы и пр.) и Северо-Восточной части Среднего Каспия (Худат-Хачмаз-Набрань). Личинки комаров различных стадий развития (II, III и IV) зафиксированы в 70%-ном растворе спирта или смеси Буэна, с указанием даты и места сбора на каждом образце, доставлены в лабораторию, где проведено видовое определение (Gunchevich *et al.*, 1970). Окрашивание проводили по Романовскому-Гимза (Voronin & Issi, 1974). Гистологическое исследование проводили по срезам, толщиной 5-6 мкм, полученным из парафиновых блоков с помощью микротом (MC-7, Россия). Окрашивание проводили с использованием гематоксилин-эозина или азуром. Гистологические препараты приготовлены по общепринятым методам (Volkova & Yelechkiy, 1972). Видовое определение микроспоридий проводили по различным признакам (стадия развития, размножение, локализация в теле хозяина, морфология спор и др.) с помощью определителей. (Khaliulin, 1972, 1973, 1982; Issi, 1986; Alimov, 2007; Krylov, 1996).

Для заражения здоровых личинок комаров микроспоридиями в лабораторных условиях использовали богатую спорами суспензию. Метод приготовления данной суспензии таков: были собраны личинки кровососущих

комаров, по внешним признакам хорошо отличимых и покрытых большим числом белых пятен, их доставили в лабораторию. Эти личинки измельчали в фарфоровой чашке, куда добавляли физиологический раствор (0,85 % NaCl). Полученную жидкость затем пропускали через фильтр. Полученную суспензию центрифугировали 2000 об/мин в течение 15 минут до выпадения осадка, раствор сливали, добавляли дистиллированную воду, смешивали, хранили в холодильной камере при температуре 0-5⁰С. Необходимо отметить, что при указанной температуре споры сохраняют жизнеспособность в течение 3-х лет, тогда как при температуре 22-25⁰С – до 2-3 месяцев (Voronin & Issi, 1974).

В эксперименте против личинок кровососущих комаров *Aedes caspius* (Pallas, 1771) использовали суспензии микроспоридий *Amblyospora opacita* (Kudo, 1922) слабого $1,1 \times 10^3$ спор/мл; среднего- $1,1 \times 10^4$ спор/мл; сильного - $1,1 \times 10^5$ спор/мл титра.

Личинок комаров содержали в лаборатории (Институт Зоологии НАНА) при 20-26° в воде, взятой из природного водоема. В качестве корма применяли смесь суспензии опилок в дистиллированной воде (15 г опилок на 250 мл воды) с добавлением дрожжей (0.04 г) и инфузорий, разводимых в лаборатории при комнатной температуре в банке с санным настоем. Эксперимент проводили в 3-х сериях (дополнительно контрольная группа) и в 3-х повторностях. В каждом эксперименте использовали по 150 не зараженных личинок. После заражения разными дозами суспензий микроспоридий каждый день личинки считывались.

Для определения сухой массы личинок комаров после их фиксации в растворе Буэна и 70%-ном спирте, выкладывали на фильтровальную бумагу с целью обезвоживания, затем полностью высушивали в сушильной камере.

Для определения видов микроспоридий использовался, в том числе и метод электронной микроскопии. Материал для этого фиксировался иммерсионной смесью 2,5% раствора глютаральдегида, 2,5% раствора параформальдегида и 0,1% раствора пикриновой кислоты на фосфатном буфере (pH=7,4). Последующая постфиксация проводилась в 1% растворе четырехоксида осмия и в 1,5% растворе феррицианида калия на 0,1М фосфатном буфере (pH=7,4). Дальнейшая обработка материала - обезвоживание и заливка в Аралдит и Эпон-812 проводилась по общепринятой методике (Куо, 2007). Получение полу- и ультратонких срезов было произведено на ультрамикротоме EM UC7 (Leica, Germany). Полутонкие срезы (1-2 мкм) окрашивались метиленовым синим, азуром II, фуксином и изучались под световым микроскопом Primo Star (Zeiss, Germany) (D'Amico, 2005). Изображения были сфотографированы цифровой фотокамерой EOS D-650 (Canon, Japan). Ультратонкие срезы (50-70 нм) окрашивались 2% насыщенным водным раствором уранилацетата, затем 0,4% раствором чистого цитрата свинца на 0,1М растворе NaOH. Просмотр и фотографирование окрашенных ультратонких срезов производилось на электронном микроскопе JEM-1400 (JOEL, Japan) при ускоряющем напряжении 80-120 кв.

3. Полученные результаты и их обсуждение

За период исследования в течение 2017-2020 гг. в северо-восточной части Азербайджана паразитологическими, гистологическими методами и методом электронной микроскопии были исследованы личинки двух видов кровососущих комаров (*Aedes caspius* Pallas, 1771 и *Culex pipiens pipiens* Linnaeus, 1758) и лишь у представителей одного вида *Aedes caspius* (Pallas, 1771) в жировой ткани был

выявлен 1 вид микроспоридий (*Amblyospora opacita* Kudo, 1922). Зараженность личинок составляла 1,47% (июнь – 1,1%, июль – 0,9%, август – 2,4%). Для достижения поставленной цели в Институте зоологии НАНА была поставлена серия экспериментов, результаты которых обобщены и представлены ниже под соответствующими подзаголовками.

Влияние микроспориоза на смертность личинок. При слабой степени заражения микроспоридами ($1,1 \times 10^3$ спор/мл титр суспензия), у вновь вышедших из яиц личинок отмечалось, приобретение беловатого цвета небольшой части тела. Наблюдался рост личинок. 42% личинок погибли (Таблица 1).

При средней степени заражения личинок комаров микроспоридами ($1,1 \times 10^5$ спор/мл титр суспензия) наблюдалось их интенсивное вздутие и уменьшение числа особей, перешедших в следующую стадию. Из 150 особей, участвующих в эксперименте, 86 погибли (57,3%).

При сильной степени заражения, у вновь вышедших из яиц личинок комаров микроспоридами ($1,1 \times 10^4$ спор/мл титр суспензия), до стадии куколки практически все особи погибли (90,7%) (Таблица 1). У погибших особей отчетливо различались признаки микроспориоза. Зараженные на этой стадии личинки не живут больше 8-12 дней.

Таблица 1. Смертность (особи, %) личинок комаров (вышедшие из яиц личинки I возраста) при заражении микроспоридами различного титра

Степень заражения	Число особей (шт.)	Погибшие личинки	
		Число особей	%
Слабая	150	63	42
Средняя	150	86	57,3
Сильная	150	136	90,7
Контрольная группа	150	25	16,7

При заражении в лабораторных условиях личинок кровососущих комаров II возраста, суспензией микроспоридий различных титров, были получены иные результаты (Таблица 2). Так, при слабой степени заражении микроспоридами личинок комаров II возраста патоморфологические изменения в организме хозяина, в отличие, от выше приведенных данных в соответствующих титрах, несколько менее выражены. Однако, если при слабом заражении смертность составила - 32%, то при средней степени заражения она составила- 45,3% (Таблица 2). При сильной степени заражения отмечалось увеличение размеров тела особей и вздутие сегментов. Число погибших особей составило 122 (81,3%).

При сравнительном анализе данных приведенных в таблицах 1 и 2, можно заметить, что смертельное действие микроспоридий более выражено на личинках комаров I возраста, чем на личинках II- го возраста.

При слабой степени заражения микроспоридами личинок кровососущих комаров III возраста процент смертности был относительно (в сравнении с личинками I и II возраста) низким и составил 26% (Таблица 3).

При заражении личинок комаров суспензиями среднего и сильного титра в лабораторных условиях, патоморфологические изменения усиливались, а процент смертности составил, соответственно 38,7% и 70,7% (Таблица 3).

Таблица 2. Смертность (особи, %) личинок комаров (вышедшие из яиц личинки II возраста) при заражении микроспоридиями различного титра

Степень зараженности	Число особей (шт.)	Погибшие личинки	
		Число особей	%
Слабая	150	48	32
Средняя	150	68	45,3
Сильная	150	122	81,3
Контрольная группа	150	18	12

В результате проведенных экспериментов было установлено, что процент смертности зараженных микроспоридиями личинок комаров I возраста был выше, чем у личинок II и III возрастов. Следующий вывод, состоит в том, что смертельное действие на личинок оказывает суспензия сильного титра, соответственно она и более эффективна.

Таблица 3. Смертность (особи, %) личинок комаров (вышедшие из яиц личинки III возраста) при заражении микроспоридиями различного титра

Степень заражения	Число личинок (шт.)	Погибшие личинки	
		Число особей	%
Слабая	150	39	26
Средняя	150	58	38,7
Сильная	150	106	70,7
Контрольная группа	150	12	8

Влияние микроспоридий на рост и линьку личинок комаров. Были отмечены нарушения процессов роста, развития и линьки у личинок комаров зараженных микроспоридиями.

Влияние на вес. Интенсивно зараженные микроспоридиями личинки комаров, по внешним признакам отличаются от здоровых увеличенными размерами тела, в особенности, грудной и брюшной части. Однако, несмотря на увеличенные размеры тела, вызванные патоморфологические изменения в организме, приводят к снижению веса хозяина. По этой причине сухой вес здоровых личинок комаров (IV возраст) изменялся в пределах 1,1-1,4 мг (средний показатель 1,3 мг), сухой вес личинок зараженных микроспоридиями составил 0,7-0,9 мг (средний показатель 0,8 мг) (Таблица 4). В результате сухой вес зараженных микроспоридиями личинок, при сравнении со здоровыми личинками снизился на 38,5%.

Таблица 4. Сухая масса зараженных и незараженных личинок комаров (мг)

Сухая масса здоровых личинок (мг)			Сухая масса зараженных личинок (мг)		
Миним.	Макс.	Среднее	Миним.	Макс.	Среднее
1,1	1,4	1,3	0,7	0,9	0,8

Влияние микроспоридий на продолжительность стадии межличиночного периода. В лабораторных условиях сравнивали продолжительность стадий зараженных личинок комаров III, IV возраста и на стадии куколки с контрольной группой. Необходимо отметить, что если у здоровых личинок на продолжительность стадии от III до IV возраста составлял 2 дня, у личинок слабой степени зараженности микроспоридиями он составлял – 3 дня, переход же с IV возраста на стадию куколки у здоровых проходил за 3 дня, у личинок зараженных слабой степенью – 4 дня. Также наблюдали разницу в сроках вылета имаго из здоровых и зараженных куколок. Так, если у здоровых на вылет имаго уходило 3 дня, для особей, зараженных микроспоридиями слабой степенью требовалось 5 дней. Таким образом, продолжительность стадии здоровых личинок от III возраста до имаго проходило за 8 дней, тогда как у особей слабой степени зараженности микроспоридиями этот период занимал 12 дней.

При сильной степени заражения личинок III возраста микроспоридиями выход имаго не наблюдался. Личинки комаров погибали либо на IV возрасте, либо на стадии образования куколок. Также следует отметить, что, хотя личинки погибли, не став куколками, они прожили IV стадию дольше, чем здоровые (1-2 дня). Вероятно, это связано в необходимым временем для завершения цикла развития паразита в организме хозяина. В целом следует отметить, что личинки комаров на III и IV стадиях, которые были заражены микроспоридиями с высокой интенсивностью, проживали на несколько дней дольше, чем здоровые на тех же стадиях, но погибали не переходя на стадию куколки.

При анализе полученных результатов выяснилось, что длительность развития стадий личинок комаров под действием микроспоридий несколько увеличивается по сравнению со здоровыми личинками. При сильной степени заражения личинки погибают в том же возрасте, когда и произошло заражение. При слабой степени заражения длительность всех стадий развития превышает норму.

Увеличение продолжительности развития различных стадий личинок комаров позволяет микроспоридиям полностью завершить свое развитие в организме хозяина и способствовать заражению следующих поколений комаров.

Влияние микроспориоза на изменение соотношение полов (самка, самец) у личинок комаров. Как известно из литературных данных при заражении животных простейшими паразитами ход заболевания и патоморфологические изменения, вызванные им, у самцов и самок различаются (Alikhanov, 1973). Учитывая вышеизложенное, у собранных в природных водоемах личинок комаров IV возраста в лабораторных условиях проводили наблюдения за их окукливанием, выходом имаго и соотношением полов. Сравнение проводили между здоровыми личинками и зараженными слабой степенью микроспоридиями. В опытах у комаров из контрольной группы соотношение полов у взрослых особей, вышедших из куколок, было почти равным 1:1 (Таблица 5). У личинок, зараженных слабой степенью микроспоридиями, наблюдали иную картину. Было установлено, что, в основном, микроспоридиями заражаются самцы, и соответственно смертность среди них выше. В результате среди взрослых особей преобладали самки (Таблица 5). Иными словами, при экспериментальном исследовании среди зараженных личинок слабой степенью микроспоридиями половое соотношение было, приблизительно, 4:1.

Таблица 5. Соотношение полов личинок комаров при заражении микроспоридиями различного титра

Степень заражения	Число особей (шт.)	Из них вылетело имаго		
		Число особей	Самок	Самцов
Слабая	150	105	84	21
Средняя	150	92	74	18
Сильная	150	52	41	11
Контрольная группа	150	132	68	64

Этот процесс также был отмечен и другими исследователями. Так, при изучении влияния микроспоридий кровососущих комаров рода *Amblyospora* отмечалась гибель среди самцов и редкие случаи гибели самок (Kellen *et al.*, 1965). Кроме того, такое явление указывается в работах Ш.Г.Алиханова (1972). Этот процесс с биологической точки зрения закономерен и обоснован, так как, уменьшает потенциальное снижение численности популяции комаров может рассматриваться как компенсаторный механизм, направленный на сохранение видовых популяций хозяев, поскольку даже малое число самцов может быть достаточно для восстановления численности популяции.

4. Заключение

1. В лабораторных условиях проведено испытание микроспоридии *Amblyospora opacita* (Kudo, 1922) - агента биологической борьбы против кровососущих комаров (*Aedes caspius* Pallas, 1771), переносчиков возбудителей многих инфекционных и инвазионных заболеваний.

2. Было установлено, что процент смертности у личинок комаров I возраста составил 42-90,7%, что выше, чем у личинок II и III возраста (32-81,3%, 26-70,7% соответственно).

3. Сухая масса личинок комаров зараженных микроспоридиями в среднем ниже, чем у здоровых особей на 38,5%.

4. Если здоровым личинкам комаров III возраста до выхода взрослой особи необходимо 8 дней, то при слабой степени заражения микроспоридиями это время составило 12 дней.

5. При слабой степени заражения микроспоридиями половое соотношение было 4:1. Самцы подвергались заражению в большей степени.

6. В биологической борьбе с кровососущими комарами большую эффективность (до 90,7%) оказывает приготовленная суспензия из микроспоридий высокого титра ($1,1 \times 10^5$ спор/мл).

Литература

- Adl, S.M., Bass, D., Lane, Ch.E. et al. (2019). Revision to the Classification, nomenclature, and diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4-119.
- Alikhanov, Sh.G. (1972). Infection with microsporidia *Thelohania* in natural populations of the mosquito *Aedes caspius caspius* in Azerbaijan. *Parasitology*, 6(4), 381-384 (in Russian).
- Alikhanov, Sh.G. (1973). Changes in the sex ratio of mosquitoes *Aedes caspius caspius* at the infection of their natural populations with microsporidians. *Parasitology*, 7(2), 175-179 (in Russian).

- Alikhanov, Sh.G. (1986). Microsporidia of Daphnia and Cyclops from artificial reservoirs of the Greater Caucasus within the Azerbaijan. *Parasites and Diseases of Aquatic Invertebrates*. Moscow, 7-8 (in Russian).
- Alimov, A.F. (2007). *Protista. Guide to Zoology*. Nauka, 1144 p. (In Russian).
- Alirzayev, G.U. (1989). Environmental substantiation of the integration of measures to combat mass species of blood-sucking mosquitoes (on the example of the territory of the Absheron peninsula and Baku): PhD thesis, Baku, 178 p. (in Russian).
- Anthony, D.W., Savage, K.E., Weidhaas, D.E. (1972). Nosematosis: its effect on *Anopheles albimanus* Weid. and a population model of its relation to malaria transmission. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 39, 428-433.
- D'Amico, F. (2005). A polychromatic staining method for epoxy embedded tissue: a new combination of methylene blue and basic fuchsine for light microscopy. *Biotech Histochem.*, 80(5-6), 207-10.
- Guchevich, A.V., Monchadskiy, A.S., Shtakelberg, A.A. (1970). *Fauna of the USSR. Diptera insects*. 384 p. (in Russian).
- Issi, I.V. (1986). Microsporidia. *Protozoology*, 10, 1-185 (in Russian).
- Manafov, A.A., Nasirov, A.M., Bunyatova, K.I., Quliyev, Sh.A., İbrahimova, N.E., Rzayev, F.H. (2017). Prospects for the study of microsporidia of blood-sucking mosquitoes in Azerbaijan. *Proceedings of the Institute of Zoology*, 35(1), 76-82 (in Azerbaijani).
- Kellen, W.R., Lipa, J.J. (1960). *Thelohania californica* sp. n., a microsporidian parasite of *Culex tarasalis* Cog. *J. Insect. Pathol.*, 2(1), 1-12.
- Khaliulin, G.L. (1972). Fauna of microsporidia of the Mari ASSR. *Scientific notes of KVI*, 112, 166-172 (in Russian).
- Khaliulin, G.L. (1973). Microsporidiosis of the larvae of blood-sucking mosquitoes in the Middle Volga region. *Parasitology*, 7(4), 370-373 (in Russian).
- Khaliulin, G.L. (1982). Influence of the seasons of the year on the incidence of microsporidiosis in larvae of blood-sucking mosquitoes. *1st Republic. scientific.conf.*, Kanev, 254-255 (in Russian).
- Koella, J., Lorenz, L., Bargielowski, I. (2009). Microsporidians as evolution-proof agents of malaria control? *Advances in Parasitology*, 68, 315-327.
- Krylov, M.V. (1996). *Key to parasitic protozoa*. St. Petersburg, 603 p. (in Russian).
- Kunicha, T.N. (2007). On the classification of clinical forms of tularemia. *Materials of the III Congress of Doctors and Pharmacists of Kazakhstan "Competitive Kazakhstan - a healthy nation"*, Astana, 152-153 (in Russian).
- Kuo, J. (2007). *Electron Microscopy: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press, 2007, 625 p.
- Seyed-Mohammad, O., Seyedeh-Fatemeh, M., Kourosh, M. (2016). Microsporidium Infecting *Anopheles Supepictus* (Diptera: Culicidae) Larvae. *J Arthropod-Borne Dis.*, 10(3), 413-420.
- Simakova, A.V. (2013). Microsporidia (Microsporidia) of blood-sucking mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Western Siberia (species composition, ecology, molecular phylogeny): PhD thesis, Tomsk, 370 p. (in Russian).
- Sprague, V. (1997). Systematics of the Microsporidia: annotated list of species. *Comparative Pathobiology*, 2, 1-510.
- Volkova, O.V., Yelechkiy, Yu.K. (1971). *Basics of Histology with Histological Technique*. Moscow, Medicine, 272 p. (in Russian).
- Voronin, V.I. (1999). Microsporidia of freshwater invertebrates and fishes of Russia (fauna, taxonomy and biology): PhD thesis, 247 p. (in Russian).
- Voronin, V.I., Issi, I.V. (1974). About methods of working with microsporidia. *Parasitology*, 3(8), 272-273 (in Russian).
- Ward, R.A., Savage, K.E. (1972). Effect of microsporidian parasites upon anopheline mosquitoes and malarial infection. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 39, 434-438.
- Wittner, M., Weiss, L. (1999). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, 553 p.