

**Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**



Diplomová práce

Věková specifita kryptosporidií infikujících prasata

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.**

Vypracovala: **Bc. Martina Jeníková**

České Budějovice 2010

Jeníková M., 2010: Věková specifita kryptosporidií infikujících prasata. [Age specificity of *Cryptosporidium* spp. infecting pigs]. 51 pp., University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, Czech Republic.

Annotation:

Two species of *Cryptosporidium* are routinely found in pigs: *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes currently relies on molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) or gene sequencing. However their applications are limited in identification of mixed infections. To overcome this problem, novel species specific primers were developed in this study. A total of 457 pig fecal samples were collected and examined using microscopy and molecular tools including PCR-RFLP, species or genus specific nested PCR and sequencing. Of these, 12.8 % were microscopically positive for oocysts presence and 36.5 % using molecular methods. While PCR-RFLP with genus specific primers revealed 1 case of *C. suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II mixed infection only, nested PCR with species specific primers identified 41 cases of mixed infections. Our results showed that *C. suis* is infectious for all age categories of pigs and *Cryptosporidium* pig genotype II has been found in animals older than 6 weeks of age. Morphometric analysis proved oocyst size difference between both pig specific *Cryptosporidium* spp. Histological examination revealed that *Cryptosporidium* pig genotype II infects epithelia of both small and large intestine.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a rad školitele.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30. dubna 2010

Martina Jeníková

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Laboratoře veterinární a lékařské protistologie, jmenovitě RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. a RNDr. Daně Květoňové za pomoc při práci v laboratoři a přátelskou atmosféru. Děkuji také zaměstnancům prasečí farmy v Kozlovicích za vstřícnost, poskytnuté informace a materiál a Petru Pinkovi za každotýdenní odvoz na farmu. Rovněž chci poděkovat za podporu své rodině.

OBSAH

1. CÍLE PRÁCE	6
2. ÚVOD	7
2.1. Systematické řazení kryptosporidií	7
2.2. Vývojový cyklus	8
2.3. Lokalizace kryptosporidií	9
3. ZDROJ INFEKCE	9
3.1. Kryptosporidióza jako zoonóza	10
4. KRYPTOSPORIDIE A KRYPTOSPORIDIÓZA PRASAT	10
4.1. Druhy a genotypy kryptosporidií infikujících prasata	11
4.1.1. <i>Cryptosporidium suis</i>	12
4.1.2. <i>Cryptosporidium</i> pig genotype II	12
4.1.3. <i>Cryptosporidium parvum</i>	13
4.1.4. <i>Cryptosporidium muris</i>	13
4.1.5. <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	14
4.1.6. <i>Cryptosporidium hominis</i>	14
4.2. Prevalence a průběh kryptosporidiových infekcí u prasat	15
4.3. Smíšené infekce	15
5. MATERIÁL A METODY	17
5.1. Materiál	17
5.1.1. Charakteristika sledovaných chovů	17
5.2. Detekce oocyst kryptosporidií v trusu	17
5.2.1. Barvení oocyst kryptosporidií (Miláček a Vítovec 1985)	17
5.2.2. <i>Cryptosporidium</i> imunofluorescenční test	18
5.3. Kvantifikace intenzity infekce (Kvác a kol. 2007)	19
5.4. Sledování průběhu infekce	19
5.5. Purifikace oocyst	19
5.5.1. Sacharózový gradient (Arrowood a Sterling 1987)	20
5.5.2. Cesium chloridový gradient (Arrowood a Donaldson 1996)	20
5.6. Morfologická analýza oocyst	21
5.7. Histopatologické vyšetření	21
5.8. Molekulární analýza	22
5.8.1. Izolace DNA	22
5.8.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	22
5.9. Genotypizace	23
5.9.1. PCR-RFLP	24
5.9.2. Druhově specifické primery	24
5.9.2.1. Ověření specifity navržených <i>C. suis</i> a <i>Cryptosporidium</i> pig genotype II specifických primerů	26
5.10. Gelová elektroforéza	27
5.11. Sekvenování	28
6. VÝSLEDKY	29
6.1. Prevalence kryptosporidií	29
6.1.1. Prevalence na základě mikroskopického vyšetření	29
6.1.2. Prevalence na základě molekulární analýzy	30
6.1.2.1. PCR-RFLP	30
6.1.2.2. Druhově specifické primery	31
6.2. Sledování průběhu kryptosporidiových infekcí	32
6.3. Intenzita infekce	33

6.4. Testování specifity a senzitivity druhově specifických primerů.....	33
6.5. Morfologická anylýza oocyst.....	36
6.6. Histopatologické vyšetření.....	37
7. DISKUZE	38
8. ZÁVĚR	41
9. CITOVANÁ LITERATURA	42

1. CÍLE PRÁCE

- Kriticky zpracovat literární rešerši k tématu.
- Popsat morfologii exogenních vývojových stádií kryptosporidií infikujících prasata.
- Studovat věkovou specifitu prasečích kryptosporidií.
- Popsat lokalizaci vývojového cyklu *Cryptosporidium* pig genotype II v přirozeném hostiteli.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

2. ÚVOD

Kryptosporidie jsou jednobuněční, kosmopolitně rozšíření paraziti se širokou hostitelskou specifikou zahrnující ryby (Hoover a kol. 1981), obojživelníky a plazy (Levine 1980; Jirků a kol. 2008), ptáky (Slavin 1955) a savce včetně člověka (Meisel a kol. 1976; Nime a kol. 1976). Některé druhy infikují celou řadu hostitelů (*C. parvum*), zatímco jiné jsou specializované na určitou skupinu hostitelů jako jsou například hlodavci (*C. muris*). Existují i druhy mající pouze jednoho hostitele (*C. wrairi*). Kryptosporidie napadají především epiteliální buňky gastrointestinálního nebo respiračního traktu. Onemocnění způsobené těmito parazity se nazývá kryptosporidióza a řadí se mezi oportunní infekce a zoonózy. Patogenita rodu *Cryptosporidium* se liší podle jednotlivých druhů a souvisí s věkem a imunitním systémem hostitele. Infikovaní jedinci vykazují široké spektrum klinických příznaků. Nejčastěji se kryptosporidióza projevuje jako průjemové onemocnění spojené s dehydratací a úbytkem hmotnosti (Xiao a kol. 2004). Tito parazitické prvoci představují riziko především pro imunosuprimované, ale i imunokompetentní hostitele. U imunosuprimovaných pacientů mají protozoální infekce těžší průběh (Canning 1990).

Poprvé byly kryptosporidie popsány E. E. Tyzzerem v roce 1907, který našel tyto prvoky ve sliznici žaludku laboratorních myší (*Mus musculus*) a pojmenoval je *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). Později v roce 1912 tentýž autor popsal nový druh kryptosporidie s lokalizací v tenkém střevě myši a nazval ho *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912).

2.1. Systematické řazení kryptosporidií

Rod *Cryptosporidium* je řazen do kmene Apikomplexa. Původně byly kryptosporidie řazeny mezi kokcidie, především díky morfologické podobnosti těchto organismů a vývojovému cyklu, který probíhá v gastrointestinálním traktu hostitele stejně jako u rodů *Eimeria*, *Isospora* a *Cyclospora* (Fayer a kol. 1997; Chacín-Bonilla 2007). Na základě molekulární analýzy malé ribozomální podjednotky však byla zjištěna jejich bližší příbuznost ke gregarinám (Carreno a kol. 1999). Taxonomie toho rodu a pojmenování jednotlivých druhů se v současné době stále mění s přibývajícím množstvím informací z molekulárních analýz. V současné době je uznáno 20 platných druhů

kryptosporidií, které byly rozlišeny na základě molekulárních rozdílů, morfologie oocyst, lokalizace vývojového cyklu a hostitelské specifiky (tabulka 1). Také je popsáno množství genotypů, které budou v budoucnu pravděpodobně potvrzeny jako samostatné druhy (Xiao a kol. 2004; Chacín-Bonilla 2007).

Tabulka 1. Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium* (Fayer 2010)

Druh	Hostitel	Lokalizace	Autor
<i>C. muris</i>	hlodavci	žaludek	Tyzzler 1907
<i>C. parvum</i>	myši	střevo	Tyzzler 1912
<i>C. meleagridis</i>	ptáci	střevo	Slavin 1955
<i>C. wrairi</i>	morče	střevo	Vetterling a kol. 1971
<i>C. felis</i>	kočka	střevo	Iseki 1979
<i>C. serpentis</i>	plazi	žaludek	Levine 1980
<i>C. baileyi</i>	drůbež	bursa fabricii	Current a kol. 1986
<i>C. varanii</i>	plazi	žaludek	Pavlásek a kol. 1995
<i>C. galli</i>	ptáci	žaludek	Pavlásek 1999
<i>C. andersoni</i>	skot	žaludek	Lindsay a kol. 2000
<i>C. canis</i>	pes	střevo	Fayer a kol. 2001
<i>C. molnari</i>	ryby	žaludek	Alvarez-Pellitero a Sitja-Bobadilla 2002
<i>C. hominis</i>	člověk	střevo	Morgan-Ryan a kol. 2002
<i>C. suis</i>	prase	střevo	Ryan a kol. 2004
<i>C. scophthalmi</i>	platýs	střevo	Alvarez-Pellitero a kol. 2004
<i>C. bovis</i>	skot	neznámá	Fayer a kol. 2005
<i>C. fayeri</i>	klokan	neznámá	Ryan a kol. 2008
<i>C. ryanae</i>	skot	neznámá	Fayer a kol. 2008
<i>C. macropodum</i>	klokan	neznámá	Power a Ryan 2008
<i>C. fragile</i>	obojživelníci	žaludek	Jirků a kol. 2008

2.2. Vývojový cyklus

Předpokládá se, že vývojový cyklus rodu *Cryptosporidium* probíhá stejně u všech zástupců, nebo může probíhat s menšími odlišnostmi (Current a kol. 1986).

Životní cyklus kryptosporidií je monoxenní a je rozdělen do čtyř hlavních fází -excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie. Excystací oocysty v gastrointestinálním či dýchacím traktu hostitele dochází k uvolnění sporozoitů, kteří napadají epiteliální buňky. Všechna další vývojová stádia jsou uložena epicelulárně (Valigurová a kol. 2008). Sporozoiti se přemění na jednojaderné trofozoity. Jádro trofozoita se rozdělí a dochází k nepohlavnímu rozmnožování (merogonii), jehož výsledkem je vznik merontů. U většiny kryptosporidií existují dva typy merontů, kteří se liší počtem jader, u *C. baileyi* vznikají tři typy merontů (Current a kol. 1986). Meront

typu I má šest až osm jader a vytváří šest až osm merozoitů. Merozoiti z merontu typu I napadají další epiteliální buňky a množí se nepohlavním dělením. Z merozoitu typu I následně vzniká meront typu II, který má čtyři jádra a vytváří čtyři merozoity. Merozoiti z meronta typu II napadají nové hostitelské buňky, v nichž se transformují na pohlavní stádia a dochází u nich k pohlavnímu rozmnožování (gamogonie), při něm vznikají gamonty: samčí mikrogamonty a samičí makrogamonty. Z mikrogamontu se uvolňují pohyblivé mikrogamety, které oplodní makrogamety vzniklé z makrogamontů a dochází k formování zygoty. Vzniklá zygota prochází sporogonií, v níž se formují čtyři sporozoiti (Fayer a Ungar 1986). Výsledkem sporogonie je zralá oocysta. U střevních kryptosporidií mohou vznikat dva typy oocyst: silnostěnné a tenkostěnné. Silnostěnné oocysty (přibližně 80 %) jsou vylučovány z těla výkaly, popřípadě respiračními sekrety a slouží k přenášení infekce mezi hostiteli. Tenkostěnné oocysty (přibližně 20 %) nejsou vylučovány ven z těla, excystují v hostiteli a dochází k takzvané autoinfekci (Current a Reese 1986).

2.3. Lokalizace kryptosporidií

Ve většině případů probíhají kryptosporidiové infekce v gastrointestinálním traktu, mohou však také probíhat v dýchacím traktu (Goodstein a kol. 1989; Moore a Frenkel 1991), v játrech (Kahn a kol. 1987) či žlučníku (Hinnant a kol. 1989). Kryptosporidie lze dle lokalizace rozdělit na dvě skupiny, žaludeční a střevní. Žaludeční kryptosporidie mají afinitu ke sliznici žaludku hostitele, oocysty mají oválný tvar a jsou větší (Morgan a kol. 1999a). Střevní kryptosporidie mají afinitu ke sliznici střeva hostitele, oocysty mají kulatý tvar a jsou menší než oocysty žaludečních kryptosporidií (Xiao a kol. 2004).

3. ZDROJ INFEKCE

K přenosu kryptosporidií z hostitele na hostitele dochází fekálně-orální cestou. Existuje několik možností přenosu infekce: přímý kontakt s nakaženou osobou (člověk-člověk) nebo zvířetem (zvíře-člověk), kontaminovanou vodou nebo potravou (Gait a kol. 2008; Cacció 2005). Nejčastějším zdrojem nákazy je voda, především díky vysoké životaschopnosti a odolnosti oocyst k vlivům vnějšího prostředí (Domenéch-Sánchez a kol. 2008). Ke kontaminaci vody nebo potravy dochází výkaly, které obsahují silnostěnné oocysty.

Význam jednotlivých cest přenosu kryptosporidií není v epidemiologii kryptosporidiózy zcela jasný především proto, že tradiční diagnostické metody nejsou schopné rozlišit jednotlivé zdroje parazitů a provádění epidemiologických vyšetření je finančně nákladné. Nicméně v posledních deseti letech byly vyvinuty různé molekulárně-biologické techniky k detekování a rozlišení jednotlivých druhů/genotypů a subtypů kryptosporidií. Tyto techniky jsou nyní hojně využívány v epidemiologických studiích a mohou významně přispět k porozumění přenosu kryptosporidiózy u lidí a zvířat (Xiao 2010).

3.1. Kryptosporidióza jako zoonóza

Paraziti rodu *Cryptosporidium* běžně infikují člověka, domácí a divoká zvířata. Vzhledem k vnímavosti člověka k celé řadě druhů a genotypů kryptosporidií je kryptosporidióza považována za zoonotické onemocnění, nicméně role hospodářských a domácích zvířat v přenosu infekce na člověka není zcela jasná, především díky morfologické podobnosti oocyst mezi pro člověka nepatogenními a patogenními druhy a omezeným využíváním moderních molekulárně-biologických diagnostických metod při určování jednotlivých druhů/genotypů a subtypů kryptosporidií v lékařské praxi (Xiao a Ryan 2004; Cacció 2005; Xiao a Feng 2008).

Paraziti rodu *Cryptosporidium* představují významné zdravotní riziko jak pro člověka, tak pro hospodářská zvířata (Fayer a kol. 1997). U imunokompetentních jedinců způsobují vodnatý průjem, který po čase odezní. U oslabených jedinců jsou příznaky daleko závažnější a v některých případech mohou být díky chronickému průjmu i život ohrožující (Cacció 2005; Chen a kol. 2005). Celosvětově jsou tyto prvoci zodpovědní za většinu parazitárních gastrointestinálních infekcí (Doganci a kol. 2002). V posledních dvou desetiletích se zvyšuje počet zaznamenaných infekcí v rozvojových zemích (Craun a kol. 2005). Kryptosporidie jako patogeny přenášené vodou, mohou přežívat mimo hostitele i několik měsíců, přičemž oocysty zůstávají po celou dobu plně infekční.

4. KRYPTOSPORIDIE A KRYPTOSPORIDIÓZA PRASAT

Chov prasat má v České republice a v řadě států Evropské unie dlouholetou tradici a patří k významným agrárním odvětvím. Jedním ze základních problémů úspěšného chovu prasat jsou parazitární infekce. Původci parazitárních onemocnění mohou

výrazně ovlivnit zdravotní stav zvířat a tím ovlivnit parametry užitkovosti. Kryptosporidie patří do skupiny parazitů, kteří jsou v tomto ohledu intenzivně sledovány a byly popsány jako přímá příčina různých respiračních a gastrointestinálních onemocnění hospodářských a volně žijících zvířat, ale i člověka (Fayer a Ungar 1986; Xiao a Fayer 2008; Xiao 2009).

Poprvé byly kryptosporidiové infekce u prasat popsány v USA v roce 1977 (Bergeland 1977; Kennedy a kol. 1977), od té doby byla kryptosporidíóza vyskytující se u prasat popsána celosvětově u různých věkových kategorií (Koudela a kol. 1986; Mølbak a kol. 1994; Xiao a kol. 1994; Quílez a kol. 1996; Izumiyama a kol. 2001; Wieler a kol. 2001).

Z výsledků studií, v nichž byly sledovány různé věkové kategorie prasat vyplývá, že výskyt jednotlivých druhů kryptosporidií závisí na věku zvířat. Obecně platí vyšší výskyt přirozených kryptosporidiových infekcí u jedinců starších jednoho měsíce a mladších šesti měsíců (Xiao a kol. 1994; Vítovec a kol. 2006; Sanford 1983; 1987; Johnson a kol. 2008). Méně často se kryptosporidiové infekce vyskytují u selat mladších jednoho měsíce a dospělých jedinců (Quílez a kol. 1996; Guselle a kol. 2003; Maddox-Hyttel a kol. 2006; Vítovec a kol. 2006; Hammes a kol. 2007).

Vývojový cyklus všech uvedených druhů a genotypů kryptosporidií infikujících prasata probíhá v tenkém nebo tlustém střevě hostitele (Vítovec a Koudela 1987; Coates 1991; Reinoso a Becares 2008; Kirkoyun a kol. 2009), kromě druhu *C. muris*, který infikuje epitel žaludku hostitele (Tyzzer 1907).

4.1. Druhy a genotypy kryptosporidií infikujících prasata

Cryptosporidium parvum bylo dlouho považováno za jediný druh kryptosporidie způsobující prasečí kryptosporidíózu díky své nízké hostitelské specifitě a značné vnímavosti selat k experimentálním infekcím tímto druhem (Moon a Bemrick 1981; Tzipori a kol. 1982; Vítovec a Koudela 1992a). V roce 1998 byly popsány dva nové genotypy infikující prasata, *Cryptosporidium* pig genotype I (Morgan a kol. 1999b) a *Cryptosporidium* pig genotype II (Ryan a kol. 2003). Na základě molekulárních analýz a biologických vlastností byl genotyp I ustanoven jako samostatný druh a pojmenován *Cryptosporidium suis* (Ryan a kol. 2004).

Kromě výše zmíněných druhů a genotypů, které se u prasat vyskytují přirozeně, byla experimentálně prokázána vnímavost prasat k infekci *C. hominis* a *C. meleagridis*

(Akiyoshi a kol. 2003a, b). Také byly zaznamenány ojedinělé případy přirozených infekcí *C. muris* (Xiao a kol. 2006; Kváč a kol. 2009a), *C. mouse* genotypu I (Chen a Huang 2007) a *Cryptosporidium* sp. Eire w65.5 (Zintl a kol. 2007).

4.1.1. *Cryptosporidium suis*

Druh *Cryptosporidium suis* je v současné době nejčastěji popisovanou kryptosporidií prasat. Typickým hostitelem *C. suis* je prase, avšak experimentálně byla prokázána vnímavost telat k tomuto druhu kryptosporidie (Enemark a kol. 2003). Také byl popsán případ, kdy se tímto druhem nakazil člověk (Xiao a kol. 2002). Experimentálně bylo prokázáno, že pro myši není *C. suis* infekční (Morgan a kol. 1999b). Tento „prasečí“ druh byl poprvé identifikován v izolátech ze Švýcarska, západní Austrálie a Kanady (Morgan a kol. 1999b; Guselle a kol. 2003). Nejčastěji se tento druh kryptosporidie vyskytuje u selat (Kváč a kol. 2009a). Ačkoli byly zaznamenány klinické příznaky kryptosporidiózy vyvolané druhem *C. suis* u dvoudenních, experimentálně infikovaných selat (Enemark a kol. 2003) a u selat před odstavením (Mišič a kol. 2003), většina případů spontánních a experimentálních infekcí probíhala bezpříznakově (Guselle a kol. 2003; Vítovec a kol. 2006; Suárez-Luengas 2007). V žádném z experimentálních ani spontánních případů nebyly zjištěny makroskopické změny vnitřních orgánů (Enemark a kol. 2003).

Infekce druhem *C. suis* je lokalizována v tlustém střevě (zejména tračnicku), běžně se také vyskytuje v lymfoglandulárních komplexech v submukóze tlustého střeva (Guselle a kol. 2003; Vítovec a kol. 2006).

Velikost oocyst *C. suis* byla popsána jako morfologicky shodná s oocystami *C. parvum* ($4,6 \times 4,2 \mu\text{m}$) (Ryan a kol. 2004). Naopak Vítovec a kol. (2006) popsali velikost oocyst statisticky významně větší ($6,2 \times 5,5 \mu\text{m}$).

4.1.2. *Cryptosporidium pig* genotype II

Tento genotyp kryptosporidií prasat je poměrně málo prozkoumán. Byl izolován u sajících selat v Norsku, v prasečí kejďě z irských farem či v odpadní vodě v Austrálii (Ryan a kol. 2003; 2005; Xiao a kol. 2006; Hamnes a kol. 2007). *Cryptosporidium pig* genotype II je nalézán především u starších prasat - po odstavení (Kváč a kol. 2009a). Infekce způsobená tímto druhem kryptosporidie probíhá převážně bez klinických příznaků (Langkjaer a kol. 2007). O lokalizaci infekce v zažívacím traktu hostitele

zatím neexistují žádné údaje. Tvar a morfologie oocyst *Cryptosporidium* pig genotype II zatím nebyly popsány.

4.1.3. *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium parvum je nejrozšířenější druh kryptosporidie s nejnižší hostitelskou specifičtostí. Vnímavost jednotlivých hostitelů k tomuto druhu byla popsána experimentálně. Poprvé byl tento druh nalezen u myši (Tyzzer 1912). Pravděpodobně je infekční pro většinu savců, u kterých je také ve velké míře nalézán. Nejčastěji bývají infikováni tímto druhem přežvýkavci (de Graaf 1999). *Cryptosporidium parvum* je také zdrojem zoonotických infekcí člověka (Xiao a kol. 2004). Experimentálně byla potvrzena vnímavost prasat k tomuto druhu kryptosporidie (Tzipori a kol. 1981; Vítovec a Koudela 1992a), a ačkoli existuje řada studií zabývajících se výskytem *C. parvum* v chovech prasat (Xiao a kol. 1994; Quílez a kol. 1996; Olson a kol. 1997; Izumiyama a kol. 2001; Wieler a kol. 2001), přirozené infekce prasat touto kryptosporidií jsou vzácné (Morgan a kol. 1999b; Widmer a kol. 2004; Zintl a kol. 2007).

Primárně probíhá infekce *C. parvum* v distální části tenkého střeva a kolonu. Patologické změny v tenkém střevě jsou charakterizovány atrofií střevních klků, ztrátou epitelálních buněk a zánětem střevního epitelu (Thompson a kol. 2005).

Velikost oocyst je $5,0 \times 4,5 \mu\text{m}$ (Upton a Current 1985).

4.1.4. *Cryptosporidium muris*

Typickými hostiteli *Cryptosporidium muris* jsou hlodavci z čeledi myšovitých a křečkovitých. Experimentálně však bylo prokázáno, že izoláty z laboratorních myší jsou infekční i pro další zvířata jako jsou morčata, králíci, pískomilové, psi či jehňata (Fayer 1990). Přirozené infekce tímto druhem kryptosporidie byly popsány u damana (Fayer 1997), velblouda (Anderson 1991) a člověka (Fayer a kol. 1997). Známé jsou také infekce prasat, kdy byla popsána přítomnost *C. muris* v prasečí kejďe například na farmách v Irsku, Číně a jinde ve světě (Xiao a kol. 2006; Chen a Huang 2007; Zintl a kol. 2007; Kváč a kol. 2009a). Jedná se ovšem o nález z netříděného materiálu, který mohl být kontaminován trusem hlodavců, jež jsou přirozenými hostiteli. Nelze tedy jednoznačně určit, zda jde o přirozenou infekci či nikoliv.

Druh *C. muris* infikuje epitel žaludku a ve většině případů probíhá asymptomaticky (Iseki a kol. 1989), bez makroskopických změn na vnitřních orgánech. O patologii

a symptomech u prasat není nic známo. Stejně jako u přirozených hostitelů lze i u prasat předpokládat nízkou patogenitu a absenci klinických příznaků.

Oocysty jsou oválného tvaru a měří $8,4 \times 6,3 \mu\text{m}$ (Iseki 1986).

4.1.5. *Cryptosporidium meleagridis*

Poprvé byl tento druh popsán v roce 1955 (Slavin 1955). Typickými hostiteli jsou ptáci, především drůbež (Morgan a kol. 2001). Přirozené infekce se dále vyskytují u člověka. Je to třetí nejběžnější druh kryptosporidie nalézáný u člověka (Xiao a kol. 2001; Pedraza-Diaz a kol. 2000). Experimentálně byla prokázána vnímavost prasat k tomuto druhu (Akiyoshi a kol. 2003a). Přirozené infekce prasat tímto druhem doposud nebyly publikovány.

U ptáků se infekce *C. meleagridis* projevuje průjmem bez ztráty na hmotnosti a dalších vážnějších klinických příznaků (Tůmová a kol. 2002). U prasat byly pozorovány pouze slabší klinické příznaky - mírné průjmové onemocnění bez známek dehydratace. Patologické změny vznikají na sliznici infikovaných částí zažívacího traktu a jsou charakterizovány zkrácením mikrovilární vrstvy a nepravidelností epiteliálního povrchu (Akiyoshi a kol. 2003).

Infekce *C. meleagridis* je u ptáků i u experimentálně nakažených prasat lokalizována v tenkém střevě (Slavin 1985; Pereira a kol. 2002).

Oocysty mají kulatý tvar a jejich velikost je $4,5 \times 4,0 \mu\text{m}$ (Lindsay a kol. 1989).

4.1.6. *Cryptosporidium hominis*

Cryptosporidium hominis je druh specializovaný na člověka. Nejprve byl považován pouze za genotyp *C. parvum* a byl nazýván *C. parvum* human genotype. Na základě molekulárních a biologických rozdílů byl ustanoven jako nový druh a pojmenován *C. hominis* (Morgan-Ryan a kol. 2002). Tento druh kryptosporidie je považován za neinfekční pro myši, krysy, kočky, psy a dobytek (Peng a kol. 1997; Widmer 1998; Widmer a kol. 2000; Giles a kol. 2001; Morgan-Ryan a kol. 2002). Nicméně v současné době bylo *C. hominis* popsáno u duonga (Morgan a kol. 2000) a byla prokázána experimentální vnímavost prasat a jehňat k tomuto druhu kryptosporidie (Giles a kol. 2001; Ebeid a kol. 2003). Stejně jako v případě *C. meleagridis*, přirozená infekce u prasat druhem *C. hominis* doposud nebyla popsána. Infekce způsobená *C. hominis* má u prasat mnohem nižší intenzitu infekce, mírnější klinické příznaky a kratší prepatentní periodu než infekce druhem *C. parvum* (Xiao a kol. 2004). Nízká infekční dávka oocyst

(1-10 oocyst) vyvolala u prasat pouze minimální patologické změny. Byly pozorovány endogenní stádia na povrchu mikrokloků a sporadický zánět byl pozorován v ileu a tlustém střevě (Pereira a kol. 2002). Infekce probíhá v distální části tenkého střeva a v kolonu.

Oocysty *C. hominis* jsou morfologicky identické s *C. parvum* a jsou $5,4 \times 4,7 \mu\text{m}$ velké (Xiao a kol. 2004).

4.2. Prevalence a průběh kryptosporidiových infekcí u prasat

Výskyt kryptosporidiových infekcí u prasat je popisován ve všech věkových kategoriích s různou mírou prevalence, od 0 až 60 % (Quílez a kol. 1996; Izumiyama a kol. 2001; Epe a kol. 2004). Nejčastěji jsou infikována selata krátce před odstavením a po odstavení (Guselle a kol. 2003). Méně často je infekce nalézána u starších jedinců (Xiao a kol. 1994; Atwill a kol. 1997). Některé studie uvádějí úplnou absenci kryptosporidiosis ve starších věkových kategoriích (Quílez a kol. 1996). Výskyt jednotlivých druhů/genotypů kryptosporidií prasat je ovlivňován věkem jedince. Převažující druh/genotyp kryptosporidií je *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II. Přirozený výskyt *C. parvum* je u prasat popisován pouze vzácně (Zintl a kol. 2007), z čehož vyplývá, že všechna data popisující výskyt a prevalenci *C. parvum* v chovech prasat před rokem 2004, tedy před popisem *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II nejsou zcela jednoznačná, protože *C. parvum* se u prasat vyskytuje přirozeně jen ojediněle (Xiao 2010) a lze se tedy domnívat, že tyto infekce byly způsobeny jinými druhy kryptosporidií.

Ve většině případů probíhá kryptosporidiosis u nakažených prasat bezpříznakově nebo s mírnými příznaky, jako nespecifická kolitida (Higgins 1999). Klinické příznaky mohou mít však i vážnější průběh, jestliže se současně objeví koinfekce s jiným enteropatogenem, jako je například rotavirus (Enemark a kol. 2003).

4.3. Smíšené infekce

Smíšené kryptosporidiové infekce byly popsány u různých hostitelů. Mohou být způsobeny jednak dvěma druhy střevních kryptosporidií nebo kombinací infekcí střevních a žaludečních kryptosporidií. Například u člověka byly současně detekovány *C. hominis* a *C. meleagridis* (Gatei a kol. 2007). Experimentálně bylo prokázáno, že

průběh infekce žaludečních kryptosporidií nebyl ovlivněn předchozí nákazou střevními kryptosporidii a naopak (Kváč a kol. 2009c).

Jak již bylo řečeno, prasata jsou běžně infikována dvěma druhy kryptosporidií, *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II. Výsledky studií naznačují, že zvířata se mohou nakazit genotypem *Cryptosporidium* pig genotype II, přestože u nich probíhá infekce *C. suis*. Mohou tedy být infikována oběma druhy kryptosporidií současně, ačkoli oba druhy mají odlišnou věkovou specifitu (Kváč a kol. 2009a). Zatím nebyly provedeny žádné experimentální smíšené infekce prasat druhem *C. suis* s genotypem *Cryptosporidium* pig genotype II. Nebyla provedena ani infekce samostatným genotypem *Cryptosporidium* pig genotype II. Bez informací, které lze získat pouze z experimentálních infekcí, nelze posoudit význam vzájemného ovlivňování průběhu infekce a vliv na zdravotní stav zvířat.

5. MATERIÁL A METODY

5.1. Materiál

Odběry byly prováděny v pravidelných intervalech v letech 2009 a 2010 na prasečí farmě v Kozlovicích. Vzorky trusu byly odebírány po vykání zvířete z podlahy. Pro diagnostiku byly odebírány přibližně 3 g výkalů. Vzorky byly uloženy do plastových kelímků, označeny a skladovány při 4 °C bez fixace. Vyšetření bylo provedeno do 24 hodin po odběru.

5.1.1. Charakteristika sledovaných chovů

Na farmě v Kozlovicích bylo chováno 15 ks prasnic. Prasnice byly ustájeny ve skupinových kotcích s krměním do společných žlabů. Březí prasnice byly převáděny do individuálních kotců, kde se mohly volně pohybovat a asi 14 dní před porodem byly převedeny na porodnu. Jeden roh kotce byl přehrazen, zde měla selata doupě. V těchto kotcích byla selata spolu s prasnicí až do odstavení v 6. týdnu věku. Odstavená selata byla posléze umístěna do skupinových kotců s krměním do společných žlabů. Zvířata byla ustájena na betonové podlaze se slaměnou podestýlkou. Odklizení hnoje a krmění bylo prováděno 2× denně.

5.2. Detekce oocyst kryptosporidií v trusu

Všechny odebrané vzorky byly mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu.

5.2.1. Barvení oocyst kryptosporidií (Miláček a Vítovec 1985)

Zásobní roztoky:

- **Roztok anylin-karbol-methylvioleti**

0,6 g methylvioleti

1 ml anilinu

1 g fenolu

30 ml ethanolu

70 ml deionizované vody

- **2% roztok kyseliny sírové**
- **1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové**

Postup:

1. Tenký nátěr trusu na podložním skle fixovat methanolem v plameni (sklo ponořit do methanolu a po vyjmutí zapálit).
2. Barvit v roztoku methylvioleti 30 minut.
3. Opláchnout pod tekoucí vodou.
4. Diferencovat 2% kyselinou sírovou 2 minuty.
5. Opláchnout pod tekoucí vodou.
6. Dobarvit v roztoku tartrazinu 3-5minut.
7. Opláchnout slabým proudem tekoucí vody.

Oocysty se barví modrofialově na žlutém pozadí.

Preparáty byly prohlíženy světelným mikroskopem (Olympus BX 51) za použití imerzního oleje při zvětšení 1000×. Vždy byl prohlédnut celý preparát.

5.2.2. *Cryptosporidium* imunofluorescenční test

Tento přímý *in vitro* imunofluorescenční test slouží k detekci kryptosporidií z biologického materiálu. Fluorescenčně značená monoklonální myší protilátka se specificky váže na kryptosporidie ve vzorku a vzniká světle zelená fluorescence při vlnové délce 490 nm. Tento typ testu byl využit pro morfologickou analýzu oocyst.

Barvení bylo provedeno pomocí komerčního kitu Crypto Cel (50T, Medac, ČR).

Chemikálie:

Kit Crypto Cel (50T, Medac, ČR)

- **Crypto Cel reagent**
- **Mounting Fluid**
- **methanol, PBS**

Postup:

1. Na sklíčko kápnout 20 µl purifikovaných oocyst, rozetřít po sklíčku a nechat úplně zaschnout.
2. Fixovat 5 minut v methanolu a nechat zaschnout.
3. Na vzorek nakapat 5 µl Crypto Cel reagentu.
4. Inkubovat sklíčko ve vlhké komůrce 30 minut při 37 °C.
5. Omýt sklíčko v PBS a nechat zaschnout.
6. Na sklíčko kápnout 10 µl Mounting Fluid a přiložit krycí sklíčko.

Oocysty kryptosporidií mají světle zelenou fluorescenci.

Preparáty byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX 70) při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

5.3. Kvantifikace intenzity infekce (Kváč a kol. 2007)

Intenzita infekce byla zjišťována podle množství oocyst ve vzorku natřeném na sklíčku. Hmotnost trusu, která byla použita k pořízení nátěru, byla zjištěna rozdílem hmotností sklíčka s natřeným vzorkem trusu a hmotností čistého sklíčka. Intenzita infekce byla vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu.

Postup:

1. Vzorek trusu natřít na sklíčko a obarvit dle Miláčka a Vítovce (1985).
2. Prohlížet světelným mikroskopem (Olympus BX 51) při zvětšení 1000×.
3. U pozitivních vzorků spočítat počet oocyst v 30 zorných polích při vysoké intenzitě infekce, nebo na celém skle při nízké intenzitě infekce.
4. Ze zjištěných údajů (hmotnost trusu, počet zorných polí na sklíčku, počet oocyst na sklíčku) odhadnout intenzitu infekce a vyjádřit jako počet oocyst v gramu trusu (OPG).

5.4. Sledování průběhu infekce

Průběh infekce byl sledován na skupině devíti stejně starých jedinců od narození. Vzorky trusu byly sbírány pravidelně jednou týdně, od 1. týdne do 12. týdne věku. Všechny vzorky byly nabarveny dle Miláčka a Vítovce (1985), prohlédnuty světelným mikroskopem (Olympus BX 51) při zvětšení 1000×. Vyhodnoceny byly pomocí molekulární analýzy za použití druhově specifických primerů (viz níže).

5.5. Purifikace oocyst

Vzorek trusu byl rozmělněn s deionizovanou vodou v třecí misce, přefiltrován přes sítko (velikost ok 50 mesh) do 100 ml zkumavky a centrifugován při 1350 g po dobu 20 minut. Supernatant byl odsán a sediment obsahující oocysty kryptosporidií následně přečistěn na sacharózovém (Arrowood a Sterling 1987) a cesium-chloridovém gradientu (Arrowood a Donaldson 1996).

5.5.1. Sacharózový gradient (Arrowood a Sterling 1987)

Zásobní roztoky:

- **Sheaterův cukerný roztok**
 - 259 ml deionizované vody
 - 405 g cukru
 - 7,29 g fenolu
- **1% PBS TWEEN** (do 1 l PBS přidat 0,5 ml TWEEN 20)
- **Pracovní sheaterovy roztoky**
 - roztok A: 1+2 (1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly PBS TWEEN)
 - roztok B: 1+4 (1 díl Sheaterova roztoku + 4 díly PBS TWEEN)

Postup:

1. Vzorek trusu rozmíchat v deionizované vodě a přecedit přes sítko.
2. Sacharózové gradienty navrstvit následujícím způsobem: 30 ml roztoku A, 30 ml roztoku B a 15 ml suspenze oocyst.
3. Centrifugovat 30 minut při 1370 g.
4. Oocysty jsou koncentrovány mezi roztoky sacharózy. Odsát vrchní vrstvu, supernatant přenést do čisté zkumavky.
5. Objem doplnit deionizovanou vodou.
6. Centrifugovat 20 minut při 1370 g.
7. Odsát vodní vývěvou polovinu objemu, doplnit deionizovanou vodou a centrifugovat 30 minut při 1370 g. Tento krok opakovat ještě 1×.
8. Odsát všechnu supernatant.
9. Pelet s oocystami uchovávat při 4 °C.

5.5.2. Cesium chloridový gradient (Arrowood a Donaldson 1996)

Zásobní roztoky:

- **CsCl** cesium chloridový roztok (hustota 1,15 g/ml)
 - (21,07 g CsCl + 100 ml destilované vody)
- **PBS** (0,025 M PBS; pH 7,2)

Postup:

1. Oocysty přečištěné na sacharózovém gradientu centrifugovat 10 minut při 1450 g.
2. Sediment rozmíchat v PBS.

3. Do 2 ml zkumavky napipetovat 1ml CsCl a na něj navrstvit 0,5 ml suspenze oocyst v PBS.
4. Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g
5. Na rozhraní CsCl a PBS jsou koncentrovány oocysty
6. Odebrat prsteneček obsahující oocysty do čisté zkumavky, doředit PBS.
7. Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
8. Odebrat supernatant a pelet rozmíchat v PBS.
9. Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
10. Odebrat supernatant, pelet rozmíchat s přibližně 200 µl PBS.
11. Oocysty uchovávat při 4 °C v PBS.

5.6. Morfologická analýza oocyst

Pro morfologickou analýzu byly použity oocysty *C. parvum*, *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II purifikované pomocí sacharózového a následně cesium chloridového gradientu. Z každého izolátu bylo změřeno 100 oocyst. Oocysty byly vždy změřeny v nativním stavu (Nomarski kontrast) a ve fluorescenci. U každé oocysty byla změřena délka a šířka a byl vypočten index tvaru. Pro morfologickou analýzu byla použita digitální analýza obrazu, software M.I.S. QuickPHOTO Pro, fotoaparát Olympus Camedia C-5060WIDEZOOM, 5.1 pixelů a mikroskop Olympus IX 70. Variabilita ve velikosti oocyst byla statisticky vyhodnocena pomocí analýzy variance (ANOVA) ve statistickém programu Statistica, Realase 5.1. (Statsoft, Tulsa, OK, USA 1997).

5.7. Histopatologické vyšetření

Vytypovaná zvířata pozitivní na *Cryptosporidium* pig genotype II byla odkoupena a utracena. Bezprostředně po usmrcení byly odebrány části žaludku, tenkého, tlustého a slepého střeva (duodenum; přední, střední a zadní jejunum; ileum; cékum; vzestupný, příčný a sestupný tračník; rektum) a fixovány pro histologické vyšetření v 10% formaldehydu. Vzorky byly zpracovány standardní parafínovou metodou. Histologické řezy byly barveny hematoxylinem, Wolbachovou modifikací Giemsova barvení a specifickými monoklonálními protilátkami proti stěně oocyst.

5.8. Molekulární analýza

Všechny odebrané vzorky, mikroskopicky pozitivní i negativní, byly vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií pomocí nested PCR s rodově specifickými primery (5.8.2.) v kombinaci s metodou PCR-RFLP (5.9.1.) a nested PCR s druhově specifickými primery (5.9.2.).

5.8.1. Izolace DNA

Extrakce DNA z trusu byla prováděna pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitak).

Postup:

1. Do mikrozkušavek (Safe Lock Tube, 2,5 ml) přidat 200 mg trusu, 150 mg skleněných kuliček (\varnothing 0,5 mm, BioSpec Product Inc., USA)
2. Přidat 1,2 ml Lysis Buffer P a zvortexovat.
3. Dále provést rozbíjení oocyst pomocí homogenizátoru (FASTPREP[®] - 24 Instrument MP Biomedicals, Solon, OH, USA) 1 minutu rychlostí 5,5 m/s.
4. Další kroky byly provedeny dle návodu poskytnutého výrobcem. Získaná DNA byla uchovávána při -20 °C.

5.8.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Chemikálie:

- **deoxyribonukleosid trifosfáty** (200 μ M dNTP's, 10 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- **10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu** (Top-Bio, ČR)
- **Taq purple DNA polymeráza** (1 U/ μ l, Top-Bio, ČR)
- **PCR H₂O** (Top-Bio, ČR)
- **MgCl₂** (25 mM, Top-Bio, ČR)
- **bovinní sérový albumin** (BSA 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, ČR)
- **primery** (10 μ M, Geni Biotech, ČR)

Pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) byla použita metoda nested PCR dle protokolu Jiang a kol. (2005). Celkový objem jednotlivých reakčních směsí byl pro primární PCR reakci 20 μ l a pro sekundární PCR reakci 30 μ l (tabulka 2). Vzorky byly vizualizovány v 1,5% agarózovém gelu.

Primery

Primární – rodově specifické

- F 5'- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG -3'
- R 5'- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA -3'

Sekundární – rodově specifické

- F 5'- GGA AGG GTT GAT TTT ATT AGA TAA -3'
- R 5'- CTC ATA AGG TGC TAG AGG AGT A -3'

Tabulka 2. Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku.

Primární reakce		55 °C	Sekundární reakce		55 °C
H₂O	-----	11,30 µl	H₂O	-----	19,65 µl
MgCl₂	25 mM	1,20 µl	MgCl₂	25 mM	1,80 µl
10× buffer	-----	2,00 µl	10× buffer	-----	3,00 µl
dNTP	10 mM	0,40 µl	dNTP	10 mM	0,60 µl
forward	10 µM	0,40 µl	forward	10 µM	0,60 µl
reverse	10 µM	0,40 µl	reverse	10 µM	0,60 µl
BSA	10 mg/ml	0,80 µl	BSA	-----	-----
taq	1 U/ µl	0,50 µl	taq	1 U/ µl	0,75 µl
DNA	-----	3,00 µl	PCR produkt	-----	3,00 µl
celkem	-----	20 µl	celkem	-----	30 µl

Požadované úseky templátové DNA byly amplifikovány v termocycleru (Bioer, Krd, ČR). Po počáteční denaturaci 94 °C 3 minuty, bylo provedeno celkem 35 cyklů sestávajících z denaturace 94 °C po 45 s, annealingu 55 °C po 45 s a extenze 72 °C po 60 s, s finální extenzí 72 °C 7 minut. Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 3 µl primárního PCR produktu. Pomocí nested PCR byly amplifikovány ~ 830 bp dlouhé fragmenty.

5.9. Genotypizace

K rozlišení jednotlivých druhů/genotypů kryptosporidií byla použita metoda PCR-RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů) a druhově specifické primery.

5.9.1. PCR-RFLP

Sekundární PCR produkt SSU rRNA byl naštípán pomocí restrikčního enzymu *Ssp* I.

Chemikálie:

- **restrikční endonukleáza *Ssp* I** (10 U/ml, BioLabs® Inc., USA)
- **10× pufr *Ssp* I** (BioLabs® Inc., USA)
- **PCR H₂O** (Top-Bio, ČR)
- **sekundární PCR produkt**

Postup:

1. Celkový objem reakční směsi = 25 µl (tabulka 3)
2. Reakční směs inkubovat v termobloku při 37 °C 12 hodin.
3. Vzorčky vizualizovat v 2% agarózovém gelu.

Tabulka 3. Reakční směs pro RFLP pomocí restrikčního enzymu *Ssp* I

RFLP		
<i>Ssp</i> I	10 U/µl	0,5 µl
Buffer 10×	-----	2,5 µl
H ₂ O	-----	7 µl
PCR produkt	-----	15 µl
Celkem		25 µl

Cryptosporidium suis se štěpí restrikčním enzymem *Ssp* I na 3 fragmenty o velikosti 453 bp, 379 bp a 11 bp. *Cryptosporidium* pig genotype II se štěpí restrikčním enzymem *Ssp* I na 5 fragmentů o velikosti 413 bp, 268 bp 103 bp 32 bp a 19 bp. *Cryptosporidium parvum* se štěpí restrikčním enzymem *Ssp* I na 3 fragmentů o velikosti 449 bp, 254 bp a 111 bp.

5.9.2 Druhově specifické primery

Byly navrženy druhově specifické primery pro *Cryptosporidium suis* (reverse a forward) a druhově specifické primery pro *Cryptosporidium* pig genotype II (reverse a forward). S těmito primery byla provedena nested PCR pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku.

Chemikálie:

- **deoxyribonukleosid trifosfáty** (dNTP's, 10 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- **10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu** (Top-Bio, ČR)
- **Taq purple DNA polymeráza** (1 U/µl, Top-Bio, ČR)

- **PCR H₂O** (Top-Bio, ČR)
- **MgCl₂** (25 mM, Top-Bio, ČR)
- **bovinní sérový albumin** (BSA 10mg/ml, Sigma-Aldrich, ČR)
- **sekundární rodově specifické primery** (10 μM, Generi Biotech, ČR)
- **druhově specifické primery** (10 μM, Generi Biotech, ČR)

Celkový objem jednotlivých reakčních směsí byl pro primární i sekundární PCR reakci 20 μl. V primární reakci byly použity sekundární rodově specifické primery, zatímco v sekundární reakci primery druhově specifické (forward a reverse *C. suis*/*Cryptosporidium* pig genotype II).

Primery

Primární – rodově specifické

- F₂ 5' - GGA AGG GTT GAT TTT ATT AGA TAA -3'
- R₂ 5' - CTC ATA AGG TGC TAG AGG AGT A -3'

Sekundární – druhově specifické

- suis 3F 5' - CAT AAT AAC TTT ACG GAT CAC ATT TTT -3'
- suis R 5' - CTC AAA GTA AAA TTT CAT ATA CTA ATA AAA AT -3'
- pig genotype II 2F 5' - GCG GAT CAC GTT ATG TGA CAT -3'
- pig genotype II 2R 5' - TTC CAC ATA CTG TAA AGT AAT GTG -3'

Reakční směs byla amplifikována v termocycleru (Bioer, Krd, ČR). Po počáteční denaturaci 94 °C 3 minuty, bylo provedeno 35 cyklů sestávajících v primární reakci z denaturace 94 °C po 45 s, annealingu 55 °C po 45 s a extenze 72 °C po 60 s, s finální extenzí 72 °C 7 minut. Cykly pro sekundární reakci byly totožné kromě annealingu - 62 °C po 45 s. Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 2 μl primárního PCR produktu (tabulka 4).

Tabulka 4. Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku.

Primární reakce		55 °C	Sekundární reakce		62 °C
H₂O	-----	11,30 µl	H₂O	-----	12,30 µl
MgCl₂	25 mM	1,20 µl	MgCl₂	25 mM	1,20 µl
10× buffer	-----	2,00 µl	10× buffer	-----	2,00 µl
dNTP	10 mM	0,40 µl	dNTP	10 mM	0,40 µl
forward	10 µM	0,40 µl	forward	10 µM	0,40 µl
reverse	10 µM	0,40 µl	reverse	10 µM	0,40 µl
BSA	10 mg/ml	0,80 µl	BSA	10 mg/ml	0,80 µl
taq	1 U/ µl	0,50 µl	taq	1 U/ µl	0,50 µl
DNA	-----	3,00 µl	PCR produkt	-----	2,00 µl
celkem	-----	20 µl	celkem	-----	20 µl

5.9.2.1. Ověření specifity a senzitivity navržených *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II specifických primerů

Navržené specifické primery byly testovány pomocí nested PCR na nespecifické amplifikace. K testování byly použity následující genotypizované druhy kryptosporidií: *C. parvum*, *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. canis*, *C. suis*, *Cryptosporidium* pig genotype II, ferret genotype, chipmunk genotype I a mouse genotype I; navíc byl přidán vzorek, u kterého byla potvrzena smíšená infekce *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II. Testování bylo provedeno následujícím způsobem:

I. Deset výše uvedených druhů/genotypů kryptosporidií bylo amplifikováno standardní metodou nested PCR a naštipáno restrikcčním enzymem *Ssp* I. Stejně vzorky byly amplifikovány s druhově specifickými primery dle námi navrženého protokolu (kapitola 5.9.2.).

II. Byly smíchány 3 µl DNA *C. parvum* vyizolované z cca 3 000 000 oocyst s 3 µl DNA *C. suis* nebo *Cryptosporidium* pig genotype II získaných ze vzorků obsahujících 75× méně oocyst (cca 40 000). Byla provedena nested PCR jak s druhově, tak s rodově specifickými primery.

III. Specifita námi navržených primerů byla otestována na dvanácti náhodně vybraných vzorcích trusu obsahujících oocysty *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II. Pozitivní vzorky trusu byly náhodně vybrány z různých věkových kategorií zvířat - 2, 4, 8 a 12 týdnů stáří. Jednotlivé druhy a genotypy byly potvrzeny přímou sekvencí PCR produktu získaného pomocí rodově specifických primerů a RFLP a výsledky byly porovnány se sekvencemi PCR produktů získanými pomocí druhově specifických primerů.

5.10. Gelová elektroforéza

Velikost PCR fragmentů byla zjišťována gelovou elektroforézou. Na 1,5% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu (pro sekundární PCR reakce) nebo na 2% agarózovém gelu (pro RFLP reakce) byl výsledný produkt detekován a vizualizován pomocí UV transluminátoru (320 nm).

Chemikálie:

- **50× TAE pufr** (242 g tris báze; 457,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA)
- **agaróza** (Biotech, ČR)
- **ethidium-bromid** (Sigma-Aldrich, ČR)
- **100 bp DNA Ladder** (O'Gene Ruler™, Biogen, ČR)

Postup:

1. Smíchat agarózu s 1× TAE pufrém (pro 1% gel smíchat 0,4 g agarózy se 40 ml TAE pufru; pro 2% gel smíchat 0,8 g agarózy se 40 ml TAE).
2. Nechat agarózu rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou přibližně na teplotu 50 °C.
3. Přidat 3 µl ethidium-bromidu a promíchat.
4. Do předem připravené formy nalít gel, vložit hřeben a nechat ztuhnout.
5. Gel vložit do elektroforetické vany naplněné 1× TAE pufrém.
6. Do jamek nanést 1× 10 µl ladderu a 20 µl sekundárního PCR produktu s rodově specifickými primery nebo 20 µl sekundárního PCR produktu s druhově specifickými primery nebo 25 µl restriční reakce.
7. Nastavit napětí 70 V a vyvíjet dobu potřebnou pro separaci fragmentů (přibližně 60 minut).

DNA fragmenty byly vizualizovány UV transluminátorem a vyfoceny kamerou propojenou s počítačem. Pomocí rodově specifických primerů byly amplifikovány produkty o velikosti ~ 830 bp, pomocí druhově specifických primerů byly amplifikovány produkty o velikosti ~ 482 bp (*C. suis*) a o velikosti ~ 443 bp (*Cryptosporidium* pig genotype II).

5.11. Sekvenování

Sekundární produkty z rodově i druhově specifické PCR byly sekvenovány za použití sekundárních primerů. K přípravě vzorků k sekvenaci byl použit ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Sekvence byly upraveny pomocí programu ChromasPro (Technelysium, Queensland, Austarlia). Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank pomocí programu ClustalX.

6. VÝSLEDKY

6.1. Prevalence kryptosporidií

Během sledování v letech 2009 a 2010 bylo vyšetřeno celkem 457 vzorků trusu prasat různých věkových kategorií z prasečí farmy v Kozlovicích.

6.1.1. Prevalence na základě mikroskopického vyšetření

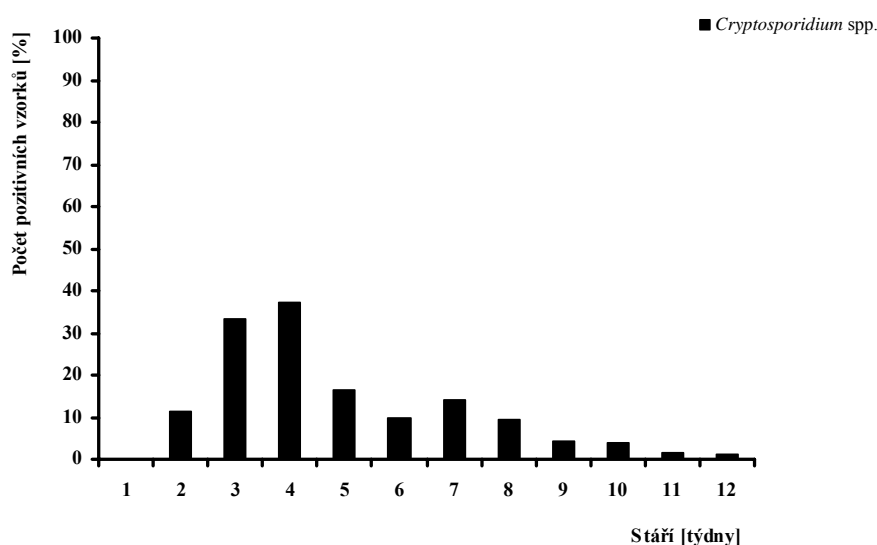
Všechny vzorky byly nejprve vyhodnoceny na výskyt oocyst kryptosporidií mikroskopicky. Ze 457 vyšetřených vzorků bylo 58 (12,7 %) mikroskopicky pozitivních (tabulka 5), z toho 41 (70,9 %) vzorků bylo od prasat před odstavem a 17 (29,1 %) vzorků bylo od prasat po odstavu.

Tabulka 5. Frekvence výskytu oocyst kryptosporidií v jednotlivých věkových kategoriích na základě mikroskopického vyšetření.

Kategorie	Počet vyšetřených vzorků	Pozitivní
Selata	183	41 (22,4 %)
Odstav	274	17 (5,8 %)
Celkem	457	58 (12,7 %)

U jednotýdenních selat nebyla mikroskopicky zachycena přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu. Tří- a čtyřtýdenní zvířata byla nejvíce promořena. Od pátého týdne věku se prevalence kryptosporidií u sledovaných zvířat snižovala, 12 týdnů po narození byla téměř nulová (graf 1).

Graf 1. Prevalence *Cryptosporidium* spp. u prasat různého stáří hodnocena na základě mikroskopického vyšetření.



6.1.2. Prevalence na základě molekulární analýzy

Molekulární analýza prokázala větší počet pozitivních vzorků než mikroskopické vyšetření, a to především u starších selat (od 5. týdne věku), kdy se počet oocyst vylučovaných trusem výrazně snižuje. Vzorky selat do 4 týdnů věku, prokázané jako pozitivní molekulární analýzou, byly prokázány jako pozitivní i mikroskopicky. Vzorky trusu selat od 5. týdne věku prokázané jako pozitivní molekulární analýzou nebyly prokázány ve všech případech jako pozitivní i mikroskopicky. Čím více bylo vzorků od starších selat, tím méně jich bylo prokázáno mikroskopicky pozitivních. Srovnání záchytnosti mikroskopického vyšetření a molekulární detekce ukázalo, že mikroskopie je mnohem méně spolehlivá především u vzorků prasat starších 6ti týdnů, kdy pomocí PCR bylo detekováno více pozitivních vzorků.

Celkem bylo 167 (36,5 %) vzorků trusu molekulárně pozitivních na kryptosporidie. Počet a procenta pozitivních zvířat v jednotlivých věkových kategoriích je uveden v tabulce 6. Zatímco u zvířat po odstavu byla sledována 45,6% promořenost, pouze 23 % selat před odstavením bylo pozitivních na přítomnost kryptosporidií v trusu (tabulka 6).

Tabulka 6. Frekvence výskytu oocyst kryptosporidií v jednotlivých věkových kategoriích na základě molekulárních analýz.

Kategorie	Počet vyšetřených vzorků	Pozitivní
Selata	183	42 (23,0 %)
Odstav	274	125 (45,6 %)
Celkem	457	167 (36,5 %)

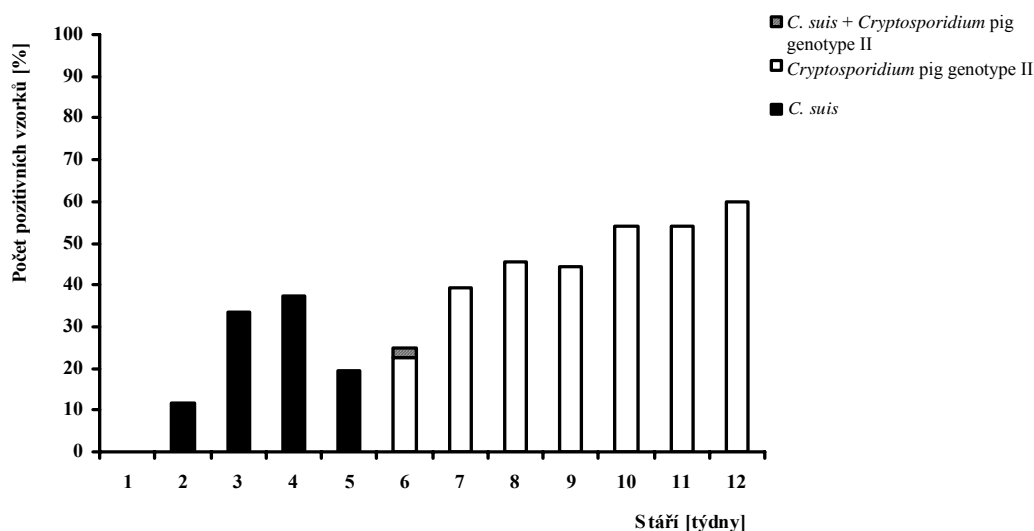
6.1.2.1. PCR-RFLP

Použitím standardní rodově specifické nested PCR s následnou PCR-RFLP analýzou byl z celkového počtu 167 molekulárně pozitivních vzorků u 42 (25,1 %) vzorků potvrzen druh *Cryptosporidium suis*, u 124 (74,3 %) vzorků *Cryptosporidium pig* genotype II a u 1 (0,6 %) vzorku byla potvrzena smíšená infekce druhem *C. suis* a genotypem *Cryptosporidium pig* genotype II. V grafu 2 jsou uvedeny procentuální počty pozitivních vzorků v jednotlivých věkových kategoriích. Druh *C. suis* se vyskytoval převážně u selat ve stáří 4 týdnů. Poprvé byl zaznamenán u zvířat ve věku 2 týdnů, od 5. týdne nákaza tímto druhem kryptosporidie klesala, v 6. týdnu už se tento druh u selat samostatně nevyskytoval. *Cryptosporidium pig* genotype II byl poprvé

zjištěn v 6. týdnu věku selat a jeho prevalence stále vzrůstala až do 12. týdne věku zvířat (zvířata starší 12 týdnů už nebyla sledována). U jednoho selete v 6. týdnu věku byla zjištěna smíšená infekce (graf 2).

Z pozitivních vzorků bylo náhodně vybráno 40 vzorků, u kterých byly výsledky získané pomocí PCR-RFLP ověřeny genotypizováním. Porovnáváním získaných sekvencí se sekvencemi uvedenými v databázi GenBank byla zjištěna 100% shoda s *C. suis* (AF115377) a *Cryptosporidium* pig genotype II (DQ182600).

Graf 2. Prevalence *C. suis*, *Cryptosporidium* pig genotype II a smíšených infekcí *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II za použití rodově specifických primerů a PCR-RFLP.



6.1.2.2. Druhově specifické primery

Použitím druhově specifických primerů bylo rozpoznáno méně mono-infekcí způsobených genotypem *Cryptosporidium* pig genotype II než v případě použití metody PCR-RFLP a naopak stoupl počet smíšených infekcí *C. suis* s *Cryptosporidium* pig genotype II.

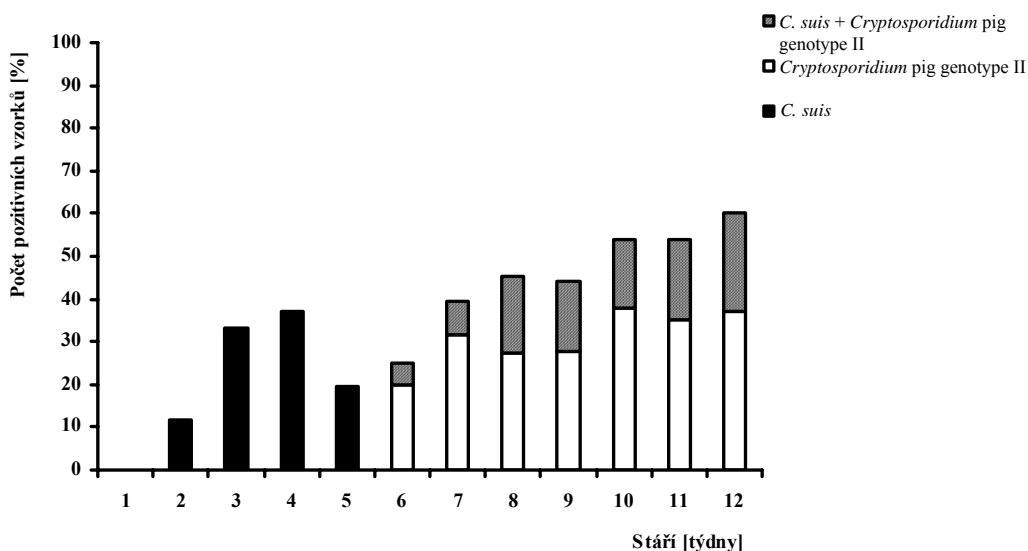
Shodně jako za použití rodově specifických primerů byl ve 42 (25,1 %) vzorcích potvrzen druh *Cryptosporidium suis*, nicméně pouze u 84 (50,3 %) vzorků byla zjištěna mono-infekce vyvolaná *Cryptosporidium* pig genotype II a u 41 (24,6 %) vzorků byla potvrzena infekce současně druhem *C. suis* a genotypem *Cryptosporidium* pig genotype II.

Druh *C. suis* se vyskytoval převážně u selat ve stáří 4 týdnů. Poprvé byl zaznamenán u zvířat ve věku 2 týdnů, od 5. týdne nákaza tímto druhem kryptosporidie klesala,

v 6. týdnu už se tento druh u selat samostatně nevyskytoval. *Cryptosporidium* pig genotype II byl poprvé zjištěn v 6. týdnu věku selat a jeho prevalence stále vzrůstala až do 12. týdne věku zvířat. Smíšené infekce byly druhově specifickými primery zachyceny od 6. týdnu až do 12. týdne věku (graf 3).

Nástup a pokles *C. suis*; nástup *Cryptosporidium* pig genotype II a nástup smíšených infekcí je shodný jako při použití metody PCR-RFLP (graf 2). V grafu 3 lze pozorovat zvyšování počtu smíšených infekcí, které kopírují křivku zvyšujících se infekcí genotypem *Cryptosporidium* pig genotype II.

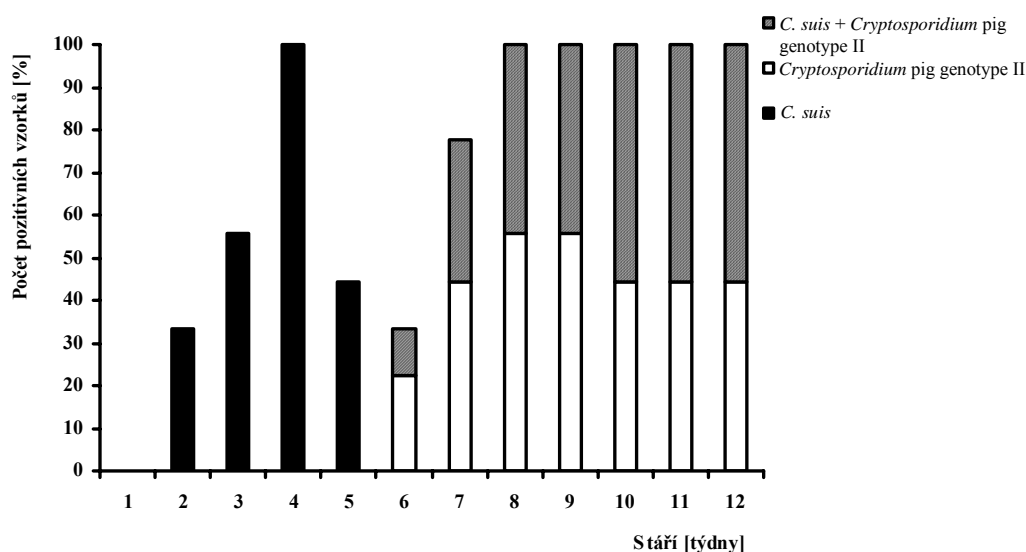
Graf 3. Prevalence *C. suis*, *Cryptosporidium* pig genotype II a smíšených infekcí *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II za použití druhově specifických primerů.



6.2. Sledování průběhu kryptosporidiových infekcí

Průběh infekcí u sledované skupiny prasat v jednotlivých týdnech byl obdobný jako průběh infekcí u jednotlivých věkových kategoriích sledovaných v letech 2009–2010 (graf 4). V prvním týdnu věku zvířat nebyla zjištěna žádná kryptosporidiová infekce. Od 2. týdne věku selat byla zjištěna infekce druhem *C. suis*, postupně se tímto druhem nakazila všechna zvířata, 100% prevalence byla detekována ve 4. týdnu věku selat, od 5. týdne klesala, v 6. týdnu nebyly zaznamenány již žádné samostatné infekce tímto druhem. V 6. týdnu byla zjištěna infekce genotypem *Cryptosporidium* pig genotype II a postupně byla zaznamenávána u stále vyššího počtu selat a v 8. týdnu dosáhla 100%, do 12. týdne věku zůstala nakažená všechna selata. Smíšené infekce byly poprvé zjištěny již v 6. týdnu a přetrvávaly až do 12. týdne věku selat.

Graf 4. Průběh kryptosporidiových infekcí u sledované skupiny zvířat od 1. do 12. týdne věku za použití druhově specifických primerů



6.3. Intenzita infekce

Mikroskopicky pozitivní vzorky byly rozděleny do skupin podle věku prasat a byla stanovena intenzita infekce. Byly zjištěny rozdíly v závislosti na věku zvířat. U sajících selat byla intenzita infekce několikanásobně vyšší než u selat odstavených. Intenzita infekce se pohybovala v rozmezí od 5×10^1 až $1,8 \times 10^6$ oocyst/gram trusu (tabulka 7).

Tabulka 7. Průměrná intenzita infekce v závislosti na stáří prasat.

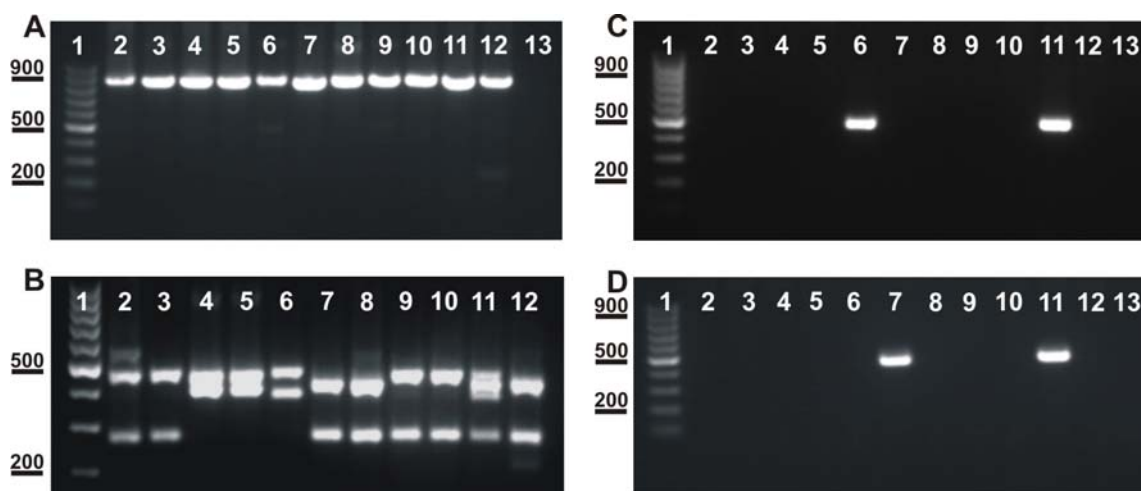
Stáří (týdny)	Intenzita infekce (OPG)
1	0
2	80 000
3	300 000
4	1 800 000
5	600
6	350
7	200
8	200
9	80
10	50
11	50
12	50

6.4. Testování specifity a senzitivity druhově specifických primerů

Druhově specifické primery byly testovány na nespecifické amplifikace. Deset uvedených druhů/genotypů kryptosporidií bylo testováno metodami uvedenými a popsány v kapitole 5.9.2.1.

I. Použitím rodově specifických primerů byly získány odpovídající části malé ribozomální podjednotky všech námi použitých druhů a genotypů kryptosporidií (obrázek 1A). Druh/genotyp byl navíc ověřen jak sekvenční, tak i restriční analýzou (obrázek 1B). Vzorek č. **11**, kde byla pomocí PCR-RFLP prokázána smíšená infekce *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II, nebyl na úrovni sekvence z důvodů její nečitelnosti vyhodnocen. V případě, kdy byly použity druhově specifické primery pro amplifikaci druhu *C. suis*, došlo k amplifikaci pouze požadovaného druhu, a to ve vzorcích **6** (*C. suis*) a **11** (*C. suis* + *Cryptosporidium* pig genotype II) (obrázek 1C). V případě, kdy byly použity druhově specifické primery pro amplifikaci druhu *Cryptosporidium* pig genotype II, došlo k amplifikaci pouze požadovaného genotypu, a to ve vzorcích **7** (*Cryptosporidium* pig genotype II) a **11** (*C. suis* + *Cryptosporidium* pig genotype II) (obrázek 1D). Smíšená infekce (vzorek **11**) byla potvrzena jak metodou PCR-RFLP (obrázek 1B), tak i pomocí druhově specifických primerů (obrázky 1C a 1D).

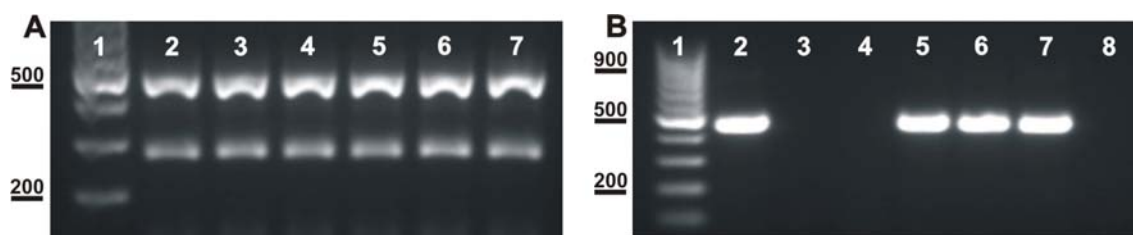
Obrázek 1. Deset druhů/genotypů kryptosporidií **A)** amplifikovaných pomocí nested PCR za použití rodově specifických primerů; **B)** amplifikovaných pomocí nested PCR za použití rodově specifických primerů s následnou restrikcí enzymem *Ssp* I; **C)** amplifikovaných pomocí druhově specifických primerů pro *Cryptosporidium suis*; **D)** amplifikovaných pomocí druhově specifických primerů pro *Cryptosporidium* pig genotype II.



1 100 bp Ladder, **2** *C. parvum*, **3** *C. hominis*, **4** *C. andersoni*, **5** *C. muris*, **6** *C. suis*, **7** *Cryptosporidium* pig genotype II, **8** chipmunk genotype I, **9** ferret genotype, **10** mouse genotype I, **11** smíšená infekce *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II, **12** *C. canis*, **13** negativní kontrola.

II. Druhová specifita navržených primerů byla prokázána i v případě, kdy byl k jednotlivým vzorkům (*C. suis*, *Cryptosporidium* pig genotype II a smíšené infekci) přidán nadbytek DNA jiného druhu kryptosporidie, konkrétně druhu *C. parvum*. Zatímco v případě použití nested PCR s rodově specifickými primery a následnou restrikční analýzou, došlo k amplifikaci pouze druhu *C. parvum* (obrázek 2A), při použití druhově specifických primerů byl amplifikován pouze požadovaný druh nebo genotyp, přestože DNA *C. parvum* bylo v reakci 75× více než DNA *C. suis* nebo *Cryptosporidium* pig genotype II (obrázek 2B).

Obrázek 2. A) Nested PCR za použití rodově specifických primerů s následnou restrikcí enzymem *Ssp* I. B) Nested PCR pro *C. suis*, *Cryptosporidium* pig genotype II a smíšenou infekci (*C. suis* + *Cryptosporidium* pig genotype II) s nadbytkem DNA *C. parvum* amplifikovaných pomocí druhově specifických primerů. Vzorky 2, 3 a 6 byly amplifikovány pomocí druhově specifických primerů pro *C. suis*. Vzorky 4, 5 a 7 byly amplifikovány pomocí druhově specifických primerů pro *Cryptosporidium* pig genotype II.

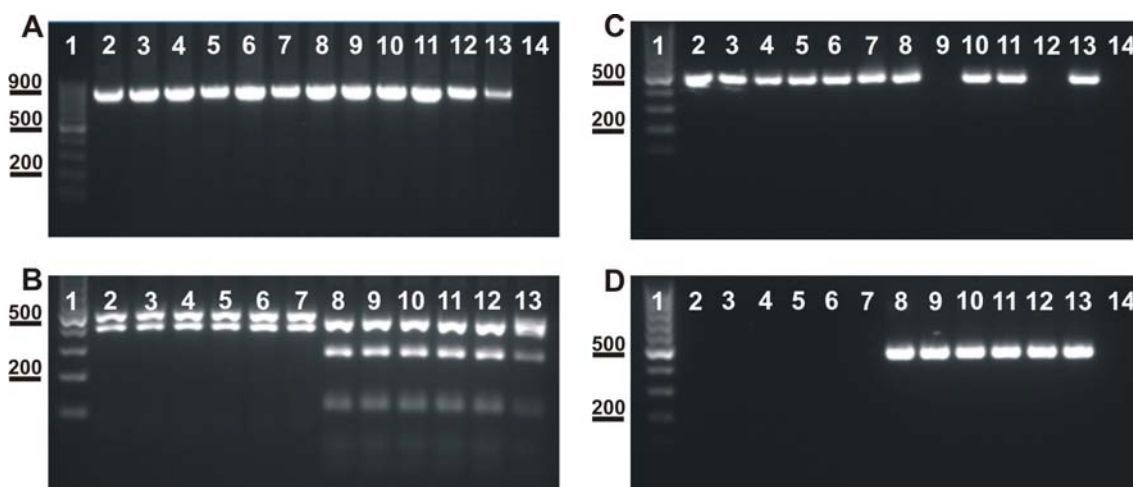


1 100 bp Ladder, 2 *C. suis* a *C. parvum*, 3 *Cryptosporidium* pig genotype II a *C. parvum*, 4 *C. suis* a *C. parvum*, 5 *Cryptosporidium* pig genotype II a *C. parvum*, 6 smíšená infekce *C. suis*, *Cryptosporidium* pig genotype II a *C. parvum*, 7 smíšená infekce *C. suis*, *Cryptosporidium* pig genotype II a *C. parvum*, 8 negativní kontrola

III. Použitím rodově specifických primerů byly získány odpovídající části malé ribozomální podjednotky dvanácti náhodně vybraných vzorků z věkových kategorií 2, 4, 8 a 12 týdnů (obrázek 3A). Druh/genotyp byl ověřen jak sekvenční, tak i restrikční analýzou (obrázek 3B). U vzorků č. 8, 10, 11 a 13 nebyla pomocí PCR-RFLP prokázána smíšená infekce *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II, ačkoliv specifické primery u těchto vzorků smíšenou infekci odhalily. V případě, kdy byly použity druhově specifické primery pro amplifikaci druhu *C. suis*, došlo k amplifikaci pouze požadovaného druhu, a to ve vzorcích 2–7 (*C. suis*) a 8, 10, 11 a 13 (*C. suis* + *Cryptosporidium* pig genotype II) (obrázek 3C). V případě, kdy byly použity druhově specifické primery pro amplifikaci druhu *Cryptosporidium* pig genotype II, došlo k amplifikaci pouze požadovaného druhu, a to ve vzorcích 9 a 12 (*Cryptosporidium* pig

genotype II) a **8, 10, 11 a 13** (*C. suis* + *Cryptosporidium* pig genotype II) (obrázek 3D). Smíšené infekce (vzorky **8, 10, 11 a 13**) byly potvrzeny pouze pomocí druhově specifických primerů (obrázky 3C a 3D).

Obrázek 3. Náhodně vybrané vzorky z věkových kategorií 2 týdny (2–4), 4 týdny (5–7), 8 týdnů (8–10) a 12 týdnů (11–13) týdnů **A)** amplifikované pomocí nested PCR pomocí rodově specifických primerů; **B)** amplifikovaných pomocí nested PCR za použití rodově specifických primerů s následnou restrikcí enzymem *Ssp* I; **C)** amplifikovaných pomocí druhově specifických primerů pro *Cryptosporidium suis*; **D)** amplifikovaných pomocí druhově specifických primerů pro *Cryptosporidium* pig genotype II.



1 100 bp Ladder, 2–7 *C. suis*, 9, 12 *Cryptosporidium* pig genotype II, 8, 10, 11, 13 smíšená infekce *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II, 14 negativní kontrola.

6.5. Morfologická analýza oocyst

Všechna měření byla vyhodnocena na základě průměrných hodnot naměřených délek a šířek a byl vypočten index tvaru pro fluorescenční i nativní preparáty. Oocysty *Cryptosporidium* pig genotype II byly změřeny pouze ve fluorescenci, nativní oocysty tohoto genotypu se nám nepodařilo ze vzorků trusu vyizolovat v dostatečném množství. Průměrné hodnoty jednotlivých měření jsou popsány v tabulce 8. Na základě statistického zhodnocení výsledků velikosti oocyst získaných pomocí měření jak v nativu, tak ve fluorescenci bylo prokázáno, že oocysty *C. suis* jsou statisticky významně větší než oocysty *C. parvum* a *Cryptosporidium* pig genotype II.

Tabulka 8. Průměr naměřených délek a šířek oocyst (v μm) jednotlivých druhů/genotypů kryptosporidií.

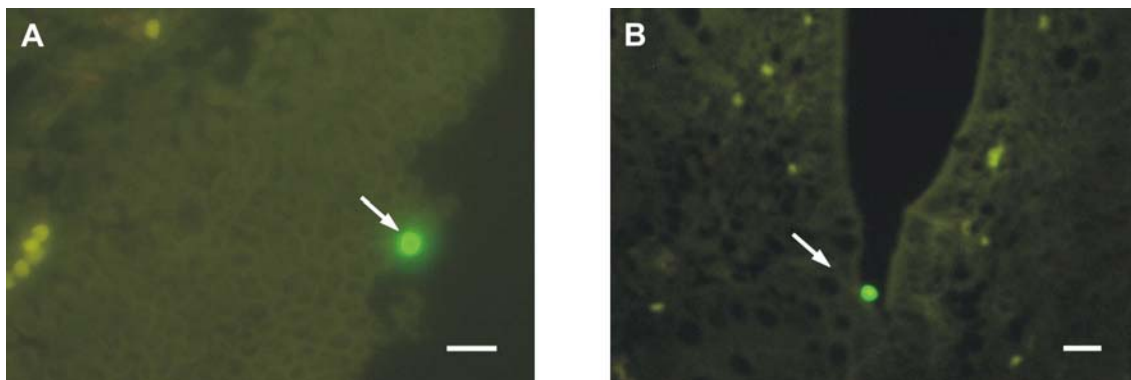
	IFAT			NATIV		
	délka	šířka	index tvaru	délka	šířka	index tvaru
<i>C. parvum</i>	5,2 (4,5–5,9)	4,5 (3,6–5,4)	1,15	5,3 (4,5–6,2)	4,6 (4,0–5,4)	1,15
<i>C. suis</i>	5,6 (4,7–6,3)	4,9 (3,8–5,7)	1,14	5,9 (5,1–7,1)	5,1 (4,3–5,9)	1,14
<i>C. pig genotype II</i>	5,1 (4,8–5,7)	4,8 (4,6–5,2)	1,06	N	N	N

N - nezměřeno

6.6. Histopatologické vyšetření

Histologické vyšetření prokázalo vývojová stádia *Cryptosporidium* pig genotype II pouze u jednoho zvířete ze dvou utracených. Vývojová stádia byla nalezena v duodenu, jejunu, ileu a tlustém střevě - ve vzestupném, příčném a sestupném tračníku. Vývojová stádia kryptosporidií byla prokázána ve všech typech použitých barvení - v imunofluorescenci, barvení hematoxylinem a Wolbachovou modifikací Giemsova barvení. Vývojová stádia nebyla nalezena v žaludku, slepém střevě a konečniku.

Obrázek 4. Histologické řezy **A)** sliznicí tenkého střeva (přední jejunum) a **B)** tlustého střeva (vzestupný tračník) přirozeně infikovaného prasete. Oocysty kryptosporidií (**šípky**) barvené druhotně nespecifickým imunofluorescenčním barvením proti stěně oocysty (*Cryptosporidium* IF Test, Crypto Cel, Medac). Měřítka 10 μm .



7. DISKUZE

Prasata jsou vnímavá k nálezům kryptosporidiemi v širokém věkovém rozpětí. Prevalence těchto infekcí byla popsána v několika zemích a souhrnně se pohybuje v rozmezí od 6 do 60 % (Quílez a kol. 1996; Wieler a kol. 2001; Ryan a kol. 2003; Vítovec a kol. 2006; Hamnes a kol. 2007; Langkjaer a kol. 2007; Suárez-Luengas a kol. 2007). V této práci byly oocysty kryptosporidií detekovány v 36,5 % vzorků trusu (167/457). Toto číslo výrazně převyšuje prevalence popsané dříve v České republice (11 a 21,1 %) (Vítovec a kol. 2006; Kváč a kol. 2009b). Výsledky této práce prokázaly nižší prevalenci kryptosporidiózy detekované u zvířat před odstavením (23 %) a vyšší prevalenci u zvířat po odstavení (45,6 %). Shodné výsledky byly popsány v pracích Sanforda (1987) a Vítovce a kol. (2006). Tato práce se shoduje i s jinými studiemi, kdy byla zjišťována věková specifita *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II. U starších selat jsme zjistili vyšší prevalenci *Cryptosporidium* pig genotype II než *C. suis* podobně jako Langkjaer a kol. (2007) a Suárez-Luengas a kol. (2007).

Je známo, že výskyt jednotlivých druhů/genotypů kryptosporidií infikujících prasata pravděpodobně souvisí s věkem zvířat. Kryptosporidiové infekce byly popsány až u selat starších 7 dnů (Xiao a kol. 2004). Jednalo se o druh *C. suis*, který se vyskytuje převážně u sajících selat, na rozdíl od genotypu *Cryptosporidium* pig genotype II, který infikuje spíše starší kategorie prasat (Langjaer a kol. 2007; Suarez-Luengas a kol. 2007; Zintl a kol. 2007; Kváč a kol. 2009b). V naší studii byla monoinfekce způsobená *Cryptosporidium suis* poprvé zaznamenána u osmi denních selat a poslední v 5. týdnu věku, což se shoduje s pracemi Quílez a kol. (1996), Ryan a kol. (2003), Vítovec a Koudela (2006); Hamnes a kol. (2007); Kváč a kol. (2009a). Naše výsledky potvrdily, že *Cryptosporidium* pig genotype II se vyskytuje pouze u starších prasat, konkrétně až od 6-ti týdnů věku (Suarez-Luengas a kol. 2007; Johnson a kol. 2008; Kváč a kol. 2009a) a výskyt tohoto genotypu se neustále zvyšoval s věkem prasat, až do sledovaného 12. týdne. Tato práce tedy jednoznačně prokázala, že nástup infekce *Cryptosporidium* pig genotype II souvisí s věkem zvířat, tak jak bylo naznačeno v pracích Santín a kol. (2004), Fayer a kol. (2006), Langjaer a kol. (2007) a Kváč a kol. (2009a).

Na základě molekulárních analýz pomocí rodově specifických primerů jsme prokázali samostatný výskyt *C. suis* pouze u selat mladších 6ti týdnů. V našem případě byl nejvyšší výskyt *C. suis* zaznamenán u sajících selat ve 4 týdnech stáří. U starších

selat od 5-ti týdnů výskyt tohoto druhu kryptosporidie postupně ustupuje. *Cryptosporidium suis* však lze nalézt i u starších prasat ve smíšené infekci s *Cryptosporidium pig* genotype II, což bylo prokázáno nově navrženou metodou nested PCR s druhově specifickými primery. Infekce *C. suis* v pozdějším věku selat, tedy po odstavu, byly dříve detekovány jen v ojedinělých případech. V naší práci jsme prokázali, že věrohodnost těchto nálezů není zcela pravdivá a že *C. suis* se běžně vyskytuje i u starších zvířat, ale jak již bylo zmíněno, vždy společně s *Cryptosporidium pig* genotype II.

Intenzita infekce se pohybovala od 5×10^1 do $1,8 \times 10^6$ OPG. Tyto výsledky odpovídají výsledkům studie Kváče a kol. (2009a), který uvádí intenzitu infekce v rozmezí od 2×10^2 do 1×10^6 . Na základě výsledků genotypizace pomocí metod PCR-RFLP a druhově specifických primerů byla zjištěna vyšší intenzita infekce u sajících selat, tedy zvířat infikovaných druhem *C. suis*. U selat po odstavu byla intenzita infekce nižší a s rostoucím věkem se stále snižovala. Tyto výsledky se shodují s prací Kváč a kol. (2009a) a naopak odporují výsledkům prací Guselle a kol. (2003) a Vítovce a kol. (2006), v kterých byl zaznamenán nižší počet oocyst *C. suis* u sajících selat než u selat po odstavu.

Ačkoli Mišič a kol. (2003) popsal průjmy u selat před odstavem po nakažení kryptosporidiiemi, v této práci nebyly pozorovány žádné klinické symptomy u přirozeně infikovaných selat, což odpovídá výsledkům práce Enemarkové a kol. (2003) a Vítovce a kol. (2006).

Velikost vyizoloovaných oocyst *Cryptosporidium pig* genotype II byla porovnáována s oocystami *C. suis* a *C. parvum*. Byly porovnávány pouze hodnoty získané měřením ve fluorescenci, protože se nám nepodařilo získat dostatečné množství nativních oocyst *Cryptosporidium pig* genotype II z žádného molekulárně pozitivního vzorku. Průměrná velikost oocyst *Cryptosporidium pig* genotype II ve fluorescenci byla $5,1 (4,8-5,7) \times 4,8 (4,6-5,2) \mu\text{m}$, index tvaru měl hodnotu 1,06. Tyto hodnoty nebylo možné porovnat s žádnou prací, morfologie oocyst tohoto genotypu zatím nebyla nikým popsána. Porovnávání měření ve fluorescenci s druhy *C. suis* $5,6 (4,7-6,3) \times 4,9 (3,8-5,7) \mu\text{m}$ (index tvaru 1,15) a *C. parvum* $5,2 (4,5-5,9) \times 4,5 (3,6-5,4) \mu\text{m}$ (index tvaru 1,16) ukázalo, že oocysty *Cryptosporidium pig* genotype II jsou statisticky významně menší než oocysty *C. suis* a jejich velikost je téměř shodná s velikostí oocyst *C. parvum*. Z výsledků měření vyplývá, že velikost oocyst měřených ve fluorescenci je

menší než velikost oocyst měřených v nativu. Lze tedy předpokládat, že nativní oocysty *Cryptosporidium* pig genotype II budou mít větší rozměry než udávané rozměry ve fluorescenci. Námi naměřené rozměry oocyst *C. suis* 5,9 (5,1–7,1) × 5,1 (4,3–5,9) μm v nativu odpovídají spíše rozměrům uváděným v práci Vítovec a kol. (2006) - 6,2 × 5,5 μm, než rozměrům, které udává ve své práci Ryan a kol. (2004) - 4,6 (4,4–4,9) × 4,2 (4,0–4,3) μm. Námi naměřené oocysty *C. parvum* 5,3 × 4,6 μm odpovídají hodnotám jaké udává ve své studii Upton a Current (1985) - 5,0 (4,5–5,4) × 4,5 (4,2–5,0) μm.

Histologické vyšetření gastrointestinálního traktu selete po odstavu, které bylo přirozeně infikované *Cryptosporidium* pig genotype II naznačuje, že kryptosporidiová infekce probíhá v tenkém i tlustém střevě, nicméně vývojová stádia kryptosporidií byla nalezena pouze ojediněle. Naše výsledky nelze porovnat s jinými pracemi, protože lokalizace infekce *Cryptosporidium* pig genotype II nebyla doposud v žádné práci popsána.

Pro identifikaci druhů a genotypů kryptosporidií se běžně používá rodově specifická nested PCR s následným RFLP. Tato metoda je dostatečně citlivá a detekuje široké rozmezí kryptosporidiových druhů a genotypů (Xiao a Ryan 2008). Pomocí této metody lze odlišit dva geneticky rozdílné hostitelsky specifické druhy/genotypy prasat, *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II. Nicméně, tato metoda je nevhodná k detekování smíšených infekcí, protože při použití rodově specifických primerů se přednostně amplifikuje pouze druh či genotyp kryptosporidie, který je v testovaném vzorku zastoupen dominantně (Cama a kol. 2006). Z tohoto důvodu byly navrženy a otestovány druhově specifické primery, které byly následně použity k molekulární analýze všech pozitivních vzorků. Použitím této metody bylo odhaleno několikanásobně vyšší množství smíšených infekcí prasat *C. suis* s *Cryptosporidium* pig genotype II. Druhově specifické primery odhalily přítomnost *C. suis* ve smíšené infekci s *Cryptosporidium* pig genotype II ve 24,6 % případů. Z našich výsledků tedy vyplývá, že počet smíšených infekcí prasat, který byl udáván doposud, pravděpodobně neodpovídá skutečnosti a je podstatně vyšší než se předpokládalo.

8. ZÁVĚR

- *Cryptosporidium suis* je infekční pro všechny věkové kategorie prasat, průběh infekce je v prvních 4 týdnech věku selat charakterizován vyšší intenzitou infekce.
- *Cryptosporidium* pig genotype II je infekční pro zvířata starší 6 týdnů věku.
- Z důvodu nedostatečné citlivosti metody PCR-RFLP a přímého sekvenování PCR produktů amplifikovaných pomocí rodově specifických primerů je pro rozlišení případných smíšených infekcí nezbytné používat metody využívající druhově specifické primery.
- Oocysty *Cryptosporidium* pig genotype II jsou menší než oocysty *C. suis*.
- *Cryptosporidium* pig genotype II infikuje epitel tenkého i tlustého střeva.

9. CITOVANÁ LITERATURA

- Akiyoshi D.E., Dilo J., Pearson C., Chapman S., Tumwine J., Tzipori S. 2003a:** Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. *Infect. Immun.* 71:1828–32.
- Akiyoshi D.E., Mor S., Tzipori S. 2003b:** Rapid displacement of *Cryptosporidium parvum* type 1 by type 2 in mixed infections in piglets. *Infect. Immun.* 71:5765–71.
- Alvarez-Pellitero P., Quiroga M.I., Sitjé-Bobadilla A., Redondo M.J., Palenzuela O., Padrós F., Vázquez S., Nieto J.M. 2004:** *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. Aquat. Organ.* 62:133–45.
- Alvarez-Pellitero P., Sitjé-Bobadilla A. 2002:** *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int. J. Parasitol.* 32:1007–21.
- Anderson B.C. 1991:** Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.* 24:235–8.
- Arrowood M.J., Donaldson K. 1996:** Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43:89S
- Arrowood M.J., Sterling C.R. 1987:** Isolation of *Cryptosporidium* oocyst and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.* 73:314–9.
- Atwill E.R., Sweitzer R.A., Pereira M.G., Gardner I.A., Van Vuren D., Boyce W.M. 1997:** Prevalence and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocyst and *Giardia* cyst within feral pig populations in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3946–9.
- Bergeland M.E. 1977:** Necrotic enteritis in nursing piglets. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.* 20:151–8.
- Cacció S.M. 2005:** Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parasitologia.* 47:185–92.
- Cama V., Gilman R.H., Vivar A., Ticona E., Ortega Y., Bern C., Xiao L. 2006:** Mixed *Cryptosporidium* infection and HIV. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1025–8.

- Canning E.U. 1990:** Protozoan infections. *Transact. Royal Soc. Tropic. Med. Hyg.* 84 suppl:1924.
- Carreno R.A., Martin D.S., Barta J.R. 1999:** *Cryptosporidium* is more closely related to the grenadines than to coccidia as shown by phylogenetic analyses of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85:899–904.
- Coates S.J.W. 1991:** Cryptosporidiosis in weaning piglets with enteritis. *Can. Vet. J.* 32:181.
- Craun G.F., Calderon R.L., Craun M.F. 2005:** Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int. J. Environ. Health Res.* 15:243–62.
- Current W.L., Reese N.C. 1986:** A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J. Protozool.* 33:98–108.
- Current W.L., Upton S.J., Haynes T.B. 1986:** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool.* 33:289–96.
- de Graaf D.C., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora L.M., Abbassi H., Peeters J.E. 1999:** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 29:1269–87.
- Doganci T., Araz E., Ensari A., Tanyuksel M., Doganci L. 2002:** Detection of *Cryptosporidium parvum* infection in childhood using various techniques. *Med. Sci. Monit.* 8:223–6.
- Domenéch-Sánchez A., Olea F., Berrocal C.I. 2008:** Infection related to recreational waters. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26:32–7.
- Ebeid M., Mathis A., Pospischil A., Deplazes P. 2003:** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* genotype I in conventionally reared piglets and lambs. *Parasitol. Res.* 90:232–5.
- Enemark H.L., Ahrens P., Bille-Hansen V., Heegaard P.M., Thamsborg S.M., Lind P. 2003:** *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the “porcine” genotype. *Parasitology* 126:407–16.
- Epe C., Coati N., Schneider T. 2004:** Results of parasitological examinations of fecal samples from horses, ruminants, pigs, cat, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. *Deut. Tierärztl. Wochenschr.* 111:243–7.

- Fayer R. 2010:** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124:90–7.
- Fayer R., Guidry A., Blagburn B.I. 1990:** Immunotherapeutic efficacy of bovine colostrum immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infect. Immun.* 58:2962–5.
- Fayer R., Santín M., Trout J.M. 2008:** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156:191–8.
- Fayer R., Santín M., Trout J.M., Greiner R. 2006:** Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.* 135:105–12.
- Fayer R., Santín M., Xiao L. 2005:** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91:624–9.
- Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P. 1997:** The general biology of *Cryptosporidium*. In: R, Fayer (Ed), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–41.
- Fayer R., Trout J.M., Xiao L., Morgan U.M., Lal A.A., Dubey J.P. 2001:** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87:1415–22.
- Fayer R. a Ungar B.L.P. 1986:** *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50:458–83.
- Gait R., Soutar R.H., Hanson M., Fraser C., Chalmers R. 2008:** Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. *Vet. Rec.* 162:843–5.
- Gatei W., Das P., Dutta P., Sen A., Cama V., Altaf A. Lal A.A., Xiao L. 2007:** Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infect. Genet. Evol.* 7:197–205.
- Giles M., Webster K.A., Marshall J.A., Catchpole J., Goddard T.M. 2001:** Experimental infection of a lamb with *Cryptosporidium parvum* genotype I. *Vet. Rec.* 149:523–5.
- Goodstein F.R., Colombo C.S., Illfelder M.A., Skaggs R.E. 1989:** Bronchial and gastrointestinal cryptosporidiosis in AIDS. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 89:195–7.
- Guselle N.J., Appelbee A.J., Olson M.E. 2003:** Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet. Parasitol.* 113:7–18.

- Hamnes I.S., Gjerde B.K., Forberg T., Robertson L.J. 2007:** Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Vet. Parasitol.* 144:222–33.
- Hamnes I.S., Gjerde B., Robertson L. 2006:** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in tree areas of Norway. *Vet. Parasitol.* 140:204–16.
- Higgins R.J. 1999:** Surveillance for cryptosporidiosis. *Pig J.* 43:88–91.
- Hinnant K., Swartz A., Rotterdam H., Rudsk C. 1989:** Cytomegaloviral and cryptosporidial cholecystitis in two patients with AIDS. *Am. J. Surg. Pathol.* 13:57–60.
- Hoover D.M., Hoerr F.J., Carlton W.W., Hinsoman E.J., Ferguson H.W. 1981:** Enteric cryptosporidiosis in nasotang, *Naso liturata*. *J. Fish Dis.* 4:425–8.
- Chacín-Bonilla L. 2007:** *Cryptosporidium*: phylogeny and taxonomy. *Invest. Clin.* 48:1–4.
- Chen F., Huang K. 2007:** Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* in pigs in eastern China. *Zoonoses Public Health* 54:393–400.
- Chen X.M., O'Hara S.P., Huang B.Q., Splinter P.L., Nelsom J.B., LaRusso N.F. 2005:** Localized glucose and water influx facilitates *Cryptosporidium parvum* cellular invasion by means of modulation of host-cell membrane protrusion. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 102:6338–43.
- Iseki M. 1979:** *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Japan. J. Parasitol.* 28:285–307.
- Iseki M. 1986:** Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Japn. J. Parasitol.* 35:521–6.
- Iseki M., Maekawa T., Moryia K., Uni S., Takada S. 1989:** Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75:218–22.
- Izumiyama S., Furukawa I., Kuroki T., Yamai S., Sugiyama H., Yagita K., Endo T. 2001:** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 54:23–6.
- Jiang J., Alderisio K.A., Xiao L. 2005:** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4446–54.

- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Křížek J., Modrý D., Šlapeta J. 2008:** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol.* 55:81–94.
- Johnson J., Buddle R., Reid S., Armson A., Ryan U.M. 2008:** Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. *Exp. Parasitol.* 119:418–21.
- Kahn D.G., Garfinkle J.M., Kionoff D.C., Pembroke L.J., Morrow D.J. 1987:** Cryptosporidial and cytomegaloviral hepatitis and cholecystitis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 111:879–81.
- Kennedy G.A., Kreitner G.L., Strafuss A.C. 1977:** *Cryptosporidiosis* in tree pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170:348–50.
- Kirkoyun U.H., Boral Ö., Metiner K., Ilgaz A. 2009:** Investigation of intestinal parasites in pig feces that are also human pathogens. *Türkiye Parazitol. Derg.* 33:218–21.
- Koudela B., Vítovec J., Dat D.T., Lan P.D. 1986:** Preliminary communication on cryptosporidiosis of pigs in Vietnam. *Folia Parasitol.* 33:301–4.
- Kváč M., Hanzlíková D., Sak B., Květoňová D. 2009a:** Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 160:319–22.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. 2007:** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 143:229–33.
- Kváč M., Sak B., Hanzlíková D., Kotilová J., Květoňová D. 2009b:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. *Parasitol. Res.* 104:425–8.
- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Secor W.E. 2009c:** Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet. Parasitol.* 163:33–8.
- Langkjær R.B., Vigre H., Enemark H.L., Maddox-Hyttel C. 2007:** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology* 134:339–50.
- Levine N.D. 1980:** Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66:830–4.

- Lindsay D.S., Blagburn B.L., Sundermann C.A. 1989:** Morphometric comparison of the oocyst of *Cryptosporidium meleagridis* and *Cryptosporidium baileyi* from birds. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 56:91–2.
- Lindsay D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R., Blagburn B.L. 2000:** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. J. Eukaryot. Microbiol. 47: 91–5.
- Maddox-Hyttel C.H., Langskjær R.B., Enemark H.L., Vigre H. 2006:** *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs. Occurrence and management associated risk factors. Vet. Parasitol. 141:48–59.
- Meisel J.L., Perera D.R., Meligro C., Rubin C.E. 1976:** Overwhelming watery diarrhea associated with a cryptosporidium in an immunosuppressed patient. Gastroenterology 70:1156–60.
- Miláček P., Vítovec J. 1985:** Differential staining of Cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scraping of intestinal mucosa. Folia Parasitol. 32:50
- Mišić Z., Katič-Radivojević S., Kulišić Z. 2003:** *Cryptosporidium* infections in nursing, weaning and post-weaned piglets and sows in the Belegrade district. Acta. Vet. (Belograd) 5-6:361–6.
- Mølbak K., Aaby P., Højling N., da Saliva A.P.J. 1994:** Risk factors for *Cryptosporidium* diarrhea in early childhood: a case - control study from Guinea-Bissau, West Africa. Am. J. Epidemiol. 139:734–40.
- Moon H.W., Bemrick W.J. 1981:** Fecal transmission of calf cryptosporidia between calves and pigs. Vet. Pathol. 18:248–55.
- Moore J.A., Frenkel J.K. 1991:** Respiratory and enteritic cryptosporidiosis in humans. Arch. Pathol. Lab. Med. 115:1160–2.
- Morgan U.M., Buddle J.R., Armson A., Elliot A., Thompson R.C.A. 1999b:** Molecular and biological characterization of *Cryptosporidium* in pigs. Aust. Vet. J. 77:44–7.
- Morgan-Ryan U.M., Fall A., Ward L.A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R.C., Olson M., Lal A., Xiao L. 2002:** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. J. Eukaryot. Microbiol. 49: 433–40.

- Morgan U.M., Monis P.T., Xiao L., Limor J., Sulaiman I., Raidal S., O'Donoghue P., Gasser R., Murray A., Fayer R., Blagburn B.L., Lla A.A., Thompson R.C. 2001:** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.* 31:289–96.
- Morgan U.M., Xiao L., Fayer R., Lal A.A., Thompson R.C.A. 1999a:** Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *Int. J. Parasitol.* 29:1733–51.
- Morgan U. M., Xiao L., Hill B.D., O'Donoghue P., Limor J., Lal A., Thompson R.C. 2000:** Detection of the *Cryptosporidium parvum* 'human' genotype in a dugong (*Dugong dugon*). *J. Parasitol.* 86:1352–4.
- Nime F.A., Burek J.D., Page D.L., Holscher M.A., Yardley J.H. 1976:** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70:592–8.
- Olson M.E., Thorlakson C.L., Deselliers L., Morck D.W., McAllister T.A. 1997:** *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet. Parasitol.* 68:375-81.
- Pavlásek, I., 1999:** Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum specificity and the environment. *Remedia Klin. Mikrobiol.* 3:290–301.
- Pavlásek I., Lávicková M., Horák P., Král J., Král B. 1995:** *Cryptosporidium varanii* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague Zoo. *Gazella* 22:99–108.
- Pedraza-Diaz S., Amar C., McLauchlin J. 2000:** The identification and characterization of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 189:189–94.
- Peng M. M., Xiao L., Freeman A.R., Arrowood M.J., Escalante A.A., Weltman A.C., Ong, C.S., MacKenzie W.R., Lal A.A., Beard C.B. 1997:** Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg. Infect. Dis.* 3:567–73.
- Pereira S.J., Ramirez N.E., Xiao L., Ward L.A. 2002:** Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotics pigs. *J. Infect. Dis.* 186:715–8.
- Power M., Ryan U. 2008:** *Cryptosporidium macropodum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos *Macropus giganteus*. *J. Parasitol.* 94: 1114–7.

- Quílez J., Sánchez-Acedo C., Clave A., del Cacho E., López-Bernard F. 1996:** Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 56:345–8.
- Reinoso R., Becares E. 2008:** The occurrence of intestinal parasites in swine slurry and their removal in activated sludge plants. *Bioresour. Technol.* 99:6661–5.
- Ryan U.M., Monis P., Enemark H.L., Sulaiman L., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R.C., Xiao L. 2004:** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* 90:769–73.
- Ryan U.M., Power M., Xiao L. 2008:** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryotic Microbiol.* 55:22–6.
- Ryan U., Read C., Hawhins P., Warnecke M., Swanson P., Griffith M., Deere D., Cunningham M., Cox P. 2005:** Genotypes of *Cryptosporidium* from Sydney water catchment areas. *J. Appl. Microbiol.* 98:1221–9.
- Ryan U.M., Samarasinghe B., Read C., Buddle J.R., Robertson I.D., Thompson R.C. 2003:** Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3970–4.
- Sanford S.E. 1983:** Porcine neonatal coccidiosis: clinical, pathological, epidemiological and diagnosis features. *Calif. Vet.* 37:26–30.
- Sanford S.E. 1987:** Enteritic cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1981-1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190:695–8.
- Santín M., Trout M.J., Xiao L., Zhou L., Greiner E., Fayer R. 2004:** Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* 122:103–17.
- Slavin D. 1955:** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 65: 262–6.
- Suárez-Luengas L., Clavel A., Quílez J., Goñi-Cepero M.P., Torres E., Sánchez-Acedo C., del Cacho E. 2007:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 148:231–5.
- Thompson R.C., Olson M.E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M.S., Hijjawi N.S. 2005:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 59:77–158.

- Tůmová M., Skřivan M., Marounek M., Pavlásek I., Ledvinka Z. 2002:** Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with *Cryptosporidium baley* and *Cryptosporidium meleagridis*. Avian Dis. 46:203–7.
- Tyzzar E.E. 1907:** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proc. Doc. Exp. Biol. Med. 5:12–3.
- Tyzzar E.E. 1912:** *Cryptosporidium parvum* (sp.nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenkd. 26:394–412.
- Tzipori S., Smith M., Makin T., Halpin C. 1982:** Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from calf faeces. Vet. Parasitol. 11:121–6.
- Upton S.J., Current W.L. 1985:** The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. J. Parasitol. 71:625–9.
- Valigurová A., Jirků M., Koudela B., Gelnar M., Modrý D., Šlapeta J. 2008:** Cryptosporidia: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. Int. J. Parasitol. 38:913–22
- Vetterling J.M., Jervis H.R., Merrill T.G., Sprinz H. 1971:** *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. J. Protozool. 18:243–7.
- Vítovec J., Hamadejová K., Landová L., Kváč M., Květoňová D., Sak B. 2006:** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. J. Vet. Med. B. 53:239–43.
- Vítovec J., Koudela B. 1987:** Natural cryptosporidiosis in a piglet suffering from pseudomembranous typhlitis. Folia Parasitol. 34:378.
- Vítovec J., Koudela B. 1992:** Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. Vet. Parasitol. 43:25–36.
- Weiler L.H., Ilieff A., Herbst W., Bauer C., Wieler E., Bauerfeind R., Failing K., Klos H., Wengerd D., Bajler G., Zahner H. 2001:** Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. J. Vet. Med. B. 48:151–9.
- Widmer G. 1998:** Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. Adv. Parasitol. 40:223–39.
- Widmer G., Akiyoshi D., Buckholt M.A., Feng X., Rich S.M., Deary K.M., Bowman C.A., Xu P., Wang Y., Wang X., Buck G.A., Tzipori S. 2000:** Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. Mol. Biochem. Parasitol. 108:187–97.

- Widmer G., Feng X., Tanriverdi S. 2004:** Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. *Methods Mol. Biol.* 268:177–87.
- Xiao L. 2009:** Overview of *Cryptosporidium* presentations: IWOP-10 2008. *Eukaryot. Cell* 8:429–36.
- Xiao L. 2010:** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experiment. Parasitol.* 124:80–9.
- Xiao L., Bern C., Arrowood M., Sulaiman I., Zhou L., Kawai V., Vivar A., Lal A.A., Gilman L.H. 2002:** Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. *J. Infect. Dis.* 185:1846–8.
- Xiao L., Fayer R. 2008:** Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* 38:1239–55.
- Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J. 2004:** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:72–97.
- Xiao L., Feng Y. 2008:** Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52:309–23.
- Xiao L., Herd R.P., Bowman G.L. 1994:** Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. *Vet. Parasitol.* 52:331–6.
- Xiao L., Moore J.E., Ukoh U., Gatei W., Lowery C.J., Murphy T.M., Dooley J.S., Millar B.C., Rooney P.J., Rao J.R. 2006:** Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4461–3.
- Xiao L., Ryan U.M. 2004:** *Cryptosporidiosis*: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17:483–90.
- Xiao L., Ryan U.M. 2008:** Molecular epidemiology. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 119–71.
- Zintl A., Neville D., Maguire D., Fanning S., Mulcahy G., Smith H.V., De Wall T. 2007:** Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. *Parasitology* 134:1575–82.