Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra zootechnických věd

Diplomová práce

Kryptosporidiové a mikrosporidiové infekce zajíců

Autorka práce: Bc. Alena Konvalinová

Vedoucí práce: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

České Budějovice
2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 12. 04. 2023

……

Abstrakt

V rámci této studie byla zkoumána genetická diverzita *Cryptosporidium* spp., *Encephalitozoon* spp. a *Enterocytozoon bieneusi* u zajíců polních (*Lepus europaeus*) pocházejících z České republiky a Slovenska, a to pomocí PCR/sekvenování izolátů z 370 zvířat. Celkem 2,7 %, 8,9 % a 4,3 % zvířat bylo PCR pozitivních na *Cryptosporidium*, *Encephalitozoon* spp. a *Enterocytozoon bieneusi*. Fylogenetická analýza sekvencí genů malé podjednotky rRNA/ITS rRNA ukázala přítomnost *C. parvum* (2), *C. sciurinum* (3) a *Cryptosporidium* sp. deer mouse genotyp IV (5), *E. cuniculi* genotyp I (5), *E. cuniculi* genotyp II (26), *E. cuniculi* genotyp III (1), *E. hellem* (1), *E. bieneusi* genotyp D (8), genotyp CHALT1 (1), genotyp WildBoar3 (1), genotyp CHN-F (2) a genotyp C (n=4). Na lokusu gp60 byly identifikovány genotypy IIaA15G1R1 u *C. parvum* a VIIIaA9G2R1 a VIIIcA10G1R1 u *C. sciurinum*. Intenzita infekce *Encephalitizoon* se pohybovala mezi $1{,}5\times10^{2}$–$7{,}6\times10^{9}$.

Klíčová slova: *Cryptosporidium* spp.; *Enterocytozoon bieneusi*; *Encephalitozoon* spp.; zajíci; infekce; prevalence; molekulární genotypizace; Česká republika; Slovensko

Abstract

Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp., *Encephalitozoon* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in Brownhares (*Lepus europaeus*) from the Czech Republic and Slovakia was investigated by PCR/sequencing of isolates from 370 animals. Overall, 2.7%, 8.9%, and 4.3 % of animals were positive for *Cryptosporidium*, *Encephalitozoon* spp., and *Enterocytozoon bieneusi* by PCR, respective. Phylogenetic analysis ofsmallsubunit rRNA/ ITS rRNA gene sequences showed the presence of *C. parvum* (2), *C. sciurinum* (3) a *Cryptosporidium* sp. deer mouse genotype IV (5), *E. cuniculi* genotype I (5), *E. cuniculi* genotype II (26), *E. cuniculi* genotype III (1), *E. hellem* (1), *E. bieneusi* genotype D (8), genotype CHALT1 (1), genotype WildBoar3 (1), genotype CHN-F (2), and genotype C (n=4). At the gp60 locus, gp60 families IIaA15G1R1 of *C. parvum*and VIIIaA9G2R1 and VIIIcA10G1R1 of C. *sciurinum*. Infection intensity of *Encephalitizoon*rangedbetween 1.5×10^{2}–7.6×10^{9}.

Keywords: *Cryptosporidium* spp.; *Enterocytozoon bieneusi*; *Encephalitozoon* spp.; hare; infection; prevalence; molecular genotyping; Czech Republic; Slovakia

Poděkování

Děkuji vedoucímu práce profesoru Martinovi Kváčovi za obdivuhodnou dávku motivace, kterou mi vždy vlil do žil ve chvílích beznaděje a za jeho profesionální a odborné vedení, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Děkuji také kolegům ze záchranných stanic pro živočichy za pomoc se sběrem vzorků a v neposlední řadě rodině, která mě ve studiu i práci dlouhodobě podporuje.

Obsah

Úvod ... 8

1 Literární přehled ... 10

1.1 Charakteristika zajíce polního (*Lepus europaeus*) ... 10

1.1.1 Taxonomie ... 11

1.1.2 Způsob života ... 11

1.1.3 Potrava a trávení zajíce polního, cékotrofie ... 13

1.1.4 Endoparaziti zástupců řádu Lagomorpha (zajícovci) ... 15

1.2 Mikrosporidie a encefalitozoonóza ... 20

1.2.1 Historie ... 21

1.2.2 Hostitelská specifita ... 21

1.2.3 Způsob přenosu mikrosporidií savců ... 22

1.2.4 Vývojový cyklus, klinické příznaky a průběh infekce ... 23

1.2.5 Terapie a prevence ... 25

1.2.6 Mikrosporidie infikující čeleď Leporidae (zajícovití) ... 25

1.3 Kryptosporidie a kryptosporidiózy ... 27

1.3.1 Historie kryptosporidií ... 28

1.3.2 Hostitelská specifita ... 29

1.3.3 Způsob přenosu ... 29

1.3.4 Vývojový cyklus, klinické příznaky a průběh infekce ... 30

1.3.5 Terapie a prevence ... 32

1.3.6 Kryptosporidie infikující čeleď Leporidae (zajícovití) ... 33

1.3.7 Orgánová a tkáňová specifita ... 35

2 Cíle práce ... 36

3 Materiál a metody ... 37

3.1 Lokality a sběr vzorků ... 37

3.2 Uchovávání a zpracování vzorků trusu 38
3.3 Mikroskopické vyšetření trusu 38
3.4 Molekulární analýzy 39
3.4.1 Izolace DNA 39
3.4.2 Genotypizace 39
3.4.3 Gelová elektroforéza 41
3.4.4 Izolace z gelu 42
3.4.5 Sekvenování 43
3.4.6 Hodnocení intenzity infekce 43
4 Výsledky 45
4.1 Mikroskopické vyšetření 45
4.2 Molekulární detekce 45
4.2.1 Genotypizace *Cryptosporidium* spp. 45
4.2.2 Genotypizace *Enterocytozoon bieneusi* 47
4.2.3 Genotypizace *Encephalitozoon* spp. 48
4.3 Kvantitifikace infekce 51
4.4 Klinické příznaky infekce 51
5 Diskuse 52
Závěry 56
Seznam použité literatury 57
Seznam obrázků 57
Seznam tabulek 81
Seznam použitých zkratek 82

Úvod

Ve většině oblastí střední Evropy byl v sedmdesátých a osmdesátých letech minulého století zaznamenán prudký pokles početnosti populací zajíce polního. Za hlavní příčinu se považuje stávající forma hospodaření na zemědělské půdě, tedy slučování menších polí do velkých sourodých celků. Za možnou příčinu poklesu početních stavů lze považovat také vliv parazitóz, které zapříčiňují zvýšenou mortalitu především v zimních měsících a zejména u mláďat.

Zajíci konzumují velmi rozmanitou potravu, která zahrnuje především mnoho kulturních a divoce rostoucích rostlin. Pro maximální využití rostlinného materiálu, především celulózy, využívá zajíc speciální trávicí mechanismus – cékotrofii. Výsledkem trávicího procesu jsou dva druhy výkalů – tvrdé bobky a tzv. cékotrofy (měkké bobky). Ty jsou produktem fermentačního procesu ve slepém střevě a zajíc je konzumuje přímo od řitního otvoru, a to převážně v noci. Díky slizničnímu obalu odolávají kyselému prostředí žaludku a cenné živiny jako jsou proteiny a vitamíny jsou vstřebávány v dalších pasážích trávicího traktu. Konzumace vlastních výkalů však může vést k autoinfekcím či k jejich přenosu na potomky při péči o ně.

Jak popsali Chroust a Forejtek (2010) mohou až 50 % celkových ztrát u zajíců způsobovat parazitózy. Nejenže jsou samy o sobě příčinou zhoršení kondice, hubnutí či snížení odolnosti organismu, ale mohou zhoršovat či urychlovat jiné infekční a neinfekční nemoci. Mezi nejvíce prozkoumané endopararzitózy u zajíců se řadí kokcidióza, helmintózy nebo cestodózy.

Za jednoho z nejčastějších parazitů napříč živočišnými druhy jsou považovány dříve opomíjené mikrosporidie. Mezi časté hostitele mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* se řadí právě zástupci zajícovců. Encefalitozoonóza je chronické onemocnění, které vede k selhání ledvin, encefalitidě, poruchám mozku a onemocněním močových cest, paralýzám, ne výjimečně končících smrtí. Náchylní jsou především imunodeficitní jedinci a mláďata.

Zatím nejméně popsaným parazitem u zajíců a králíků jsou kryptosporidie. Původně byly řazeny mezi kokcidie, ale později se potvrdila jejich příbuznost s třídou gregarín. Kromě morfologických odlišností jsou na rozdíl od kokcidií jejich oocysty plně infekční již při opuštění hostitelského těla. Dle dosavadních poznatků probíhá u většiny volně žijících zvířat nákaza kryptosporidiemi velice často asymptomaticky.

V případě nákazy imunosupresivních jedinců však může mít obdobně jako mikrosporidióza fatální následky. Hlavním klinickým příznakem je průjem, u mláďat pak může kryptosporidióza ovlivnit růst a vývoj.

Mikrosporidie a kryptosporidie, ač odlišné parazitární kmeny, mají mnoho společného. Nejčastější způsob přenosu je fekálně-orální cestou, jejich spory/oocysty mohou kontaminovat vody či potraviny, a především se řadí mezi parazity schopné nakazit člověka a dochází u nich k zoonotickému přenosu. Jak je popsáno níže, kontaminace vody následkem nakažené mršiny či přenos parazita ze zvířete na člověka nejsou ojedinělá a přináší rizika pro veřejné zdraví. Exogenní vývojová stadia mikrosporidií a kryptosporidií jsou navíc velice odolná a dokáží přežívat nepříznivé podmínky prostředí a odolat i některým druhům chemizace jako je např. ošetření vody chlorací.

Tato práce se věnuje výzkumu výskytu mikrosporidií a kryptosporidií u zajíců polních. Volně žijící živočichové s sebou nesou jistá rizika ohrožení veřejného zdraví. Jak potvrzují případy v práci uvedené, mohou být zdrojem infekce také domestikovaní králíci či divoké druhy zajícovců. Ve spolupráci s vybranými záchrannými stanicemi, slovenskými mysliveckými spolky a farmovým chovem ze slovenské Skalice byl proveden výzkum prevalence mikrosporidií a kryptosporidií u zajíců polních. V případech vzorků ze záchranných stanic se jednalo především o juvenilní jedince, ve druhém případě o dospělce.

S ohledem na níže popsané výsledky by si volně žijící zajíci zasloužili další podrobnější výzkum prevalence v celé Evropě, a to i z důvodu, že myslivecké spolky do České republiky dovážejí chovy zajíců polních z různých evropských zemí za účelem posílení populací v honitbách a hrozí tedy potenciální riziko zavlečení nových druhů či genotypů patogenů, na které nebudou lokální zající polní adaptováni a mohlo by dojít tedy k jejich dalším početním úbytkům.

1 Literární přehled

1.1 Charakteristika zajíce polního (*Lepus europaeus*)

Zajíc polní je druh zvířete, které žije samotářsky a vyskytuje se v rozsáhlých oblastech Evropy, Sibiře a Středního východu. Kromě toho byl tento druh zavlečen do Severní Ameriky, Austrálie a na Nový Zéland (Verhoef-Verhallen, 2007). V České republice (ČR) a na Slovensku se vyskytuje poddruh zajíce polního středoevropského (*Lepus europaeus europaeus*), který v ČR obývá téměř celé území, především nížiny a pahorkatiny. Na Slovensku je však vzácnější a byl zaznamenán pouze nad horní hranicí lesa v horách, nejvýše ve výšce 2880 m n. m. (Kučera et Kučerová, 2002).

Zajíc má běžně váhu 3 – 4 kg, v horských oblastech může dosáhnout až 6 kg. Má ochranné zbarvení v odstínech hnědošedé až rezavožluté, přičemž ocas je na svrchní straně černý. Jeho ušní boltce jsou delší než hlava a na vnitřních koncích mají černé skvrny (Hromas, 2000).

Zajíc může bez otáčení hlavy zaznamenat pohybující se objekty nejen před sebou a vedle sebe, ale do značné míry i za sebou. Pro hlavu zajíce je kromě dlouhých slechů typický rozpolcený pysk, tzv. zaječí pysk (Kučera et Kučerová, 2002).

Zajíc je specializován na běhání, což se odrazilo v jeho anatomické stavbě. Zadní končetiny má výrazně silnější a delší než přední, což mu umožňuje dosáhnout vysokých rychlostí při útěku. U zajíců není pozorován výrazný pohlavní dimorfismus, což znamená, že je obtížné určit, zda je jedinec v terénu samec nebo samice (Durantel et al., 2013).

Mezi nejdokonalejší smysly tohoto druhu patří sluch. Zrak má naopak slabší. Čich využívá k orientaci na kratší vzdálenost a při pohybu v noci v husté trávě využívá hmatové vousy (Hromas, 2000).

Většina oblastí střední Evropy zažila v sedmdesátých a osmdesátých letech minulého století prudký pokles zaječí populace. Příčiny úbytku zajíců jsou obecně známé a v první řadě se jedná o nevhodnou strukturu zemědělské krajiny, která vznikla v důsledku slučování menších polí do velkoplošných celků (Smith et al., 2005). Dalším významným faktorem je vysoká intenzita rostlinné produkce, která má negativní dopad na početní stavy zajíců, zejména když jsou využity všechny dostupné plochy pro zemědělskou výrobu. V místech, kde se oba tyto negativní faktory prolínají, dochází

k prudkému zhoršení životních podmínek nejen pro zajíce, ale také pro mnoho dalších druhů zvířat (Vodňanský, 2002).

1.1.1 Taxonomie

Říše: živočichové (Animalia)
Kmen: strunatci (Chordata)
Podkmen: obratlovci (Vertebrata)
Třída: savci (Mammalia)
Řád: zajícovci (Lagomorpha)
Čeleď: zajícovití (Leporidae)
Rod: zajíc (*Lepus*)
Druh: zajíc polní (*Lepus europaeus* Pallas, 1778)

Zajíc polní (*Lepus europaeus*) je řazen do Řádu zajícovci (Lagomorpha), kteří jsou fylogeneticky blízcí příbuzní s hlodavci (Rodentia) (Roček, 2002). Původně byli zajíci mezi hlodavce řazeni, ale později se prokázalo, že se jedná o samostatnou vývojovou větev placentálních savců (Hromas, 2000). Vzhledem k podobné stavbě těla a způsobu života je mnoho lidí považuje za stejnou skupinu dodnes (Papáček et al., 2000). Lagomorpha se od hlodavců odlišují tím, že mají na horní čelisti dva páry hlodáků, zatímco hlodavci mají pouze jeden. Tento společný znak však není jediným, ostatní části dentice a řada kosterních znaků se také liší.

Nejznámější skupinou zajícovců jsou Leporidae (zajícovití), která zahrnuje rody *Lepus* (zajíc) a *Oryctolagus* (králík). Tyto rody jsou známy již od raného pliocénu, ale nejstarší paleontologické nálezy pocházejí z eocénu. Druhou hlavní skupinou řádu Lagomorpha jsou pišťuchy (Ochotonidae), jejichž nejstarší záznamy pocházejí ze svrchního eocénu (Roček, 2002).

1.1.2 Způsob života

Zajíc je zvíře přizpůsobené stepním a lesostepním oblastem. Nevytváří si žádné nory, které by mu poskytovaly ochranu před nepřízní počasí nebo nebezpečím. Místo toho si vyhrabává mělký důlek, kam se ukládá na holou zem s hlavou orientovanou proti větru. Své lože využívá i v hlubokém sněhu. Při hustém sněžení se nechá zapadnout.

Dýchá pouze skrz malý otvor, který roztál vlivem jeho dechu. To mu pomáhá přežít i za nízkých teplot (Andreska, 1993).

Zajíc obývá určité území v krajině, jehož velikost se může lišit. V oblastech s vysoce početnou populací jsou teritoria menší, zatímco v horských oblastech, kde žije méně zajíců, jsou teritoria větší a mohou dosahovat velikosti až 60 ha (Andreska, 1993).

Zajíc preferuje pro pastvu lokality s výživnější potravou a potřebuje dostatek prostoru. Nejlepší podmínky pro něj v kulturní krajině panují v nadmořské výšce od 500 do 550 m n. m. s pravidelnými srážkami během celého roku a s menší sněhovou pokrývkou bez častých námraz. Ve vyšších polohách potřebuje úkryty a závětří jako jsou okraje lesů, křoviny a meze. Dlouhodobé deště mu však neprospívají, zejména v oblastech s těžší a mazlavější půdou (Kučera et Kučerová, 2002).

Zvířata si udržují určité teritorium, nazývané domovský okrsek, který může mít rozlohu od 10 a 300 hektarů. Tyto oblasti se často překrývají s teritorii jiných jedinců, zejména na místech, kde se nachází preferované zdroje potravy. Při hledání vhodné pastvy zajíci dokážou překonat až 1,8 km. Během jedné noci jsou schopni za potravou urazit až 15 km (Chapman et Flux, 1990).

Zajíci si značí svá teritoria pomocí výměšků pachových žláz, trusem a močí. Pro signalizaci pomocí pachu jsou pro zajíce důležité zejména párové lícní žlázy a nepárová žláza nad čenichem. Výměšky pachových žláz si při čištění označkuje tlapky a roztírá pach po celém těle. Tento způsob signalizace je důležitý pro komunikaci se soupeřícími zajíci (Andreska, 1993) a k vyhledávání partnerů (Hromas, 2000). Zároveň však tak upozorňuje predátory na jeho přítomnost.

Na svém teritoriu má zajíc několik loží orientovaných různými směry, aby mohl ulehnout vždy s hlavou proti větru. Tento způsob ulehání do loží není jen za účelem zajištění tepla, ale také pro zvýšení bezpečnosti. Před ulehnutím vytváří v okolí lože falešnou stopu (Andreska, 1993).

Preferuje samotářský životní styl a zůstává věrný svému teritoriu. S dalšími jedinci se druží pouze v období páření. Je aktivní jak ve dne, tak v noci a během klidových období rád odpočívá na volných polích v tzv. pekáči (lože vyhrabané předními nohama (Ophoven, 2011).

Zajíc polní má schopnost se rychle rozmnožovat a je velmi přizpůsobivý, což mu umožňuje kompenzovat ztráty způsobené přírodními faktory i lovem. (Pecina et Čepická, 1990). Řadí se mezi polyesrické zvířecí druhy, které se říjí vícekrát do roka s

podobnou intenzitou. Pohlavní aktivita trvá většinu roku s krátkými obdobími klidu. Již na začátku ledna nebo v druhé polovině prosince jsou zajíci připraveni k páření. Zvířata projevují začátek sexuální aktivity neklidem a menší ostražitostí. Při hledání partnera si zajíci vybírají otevřené a dobře přehledné plochy, kde uskutečňují „svatební běh“ (Kučera et Kučerová, 2002). Zajíčata se rodí na chráněných místech, jsou osrstěná a vidí. Již po několika hodinách od narození dovedou běhat. Jsou kojena po dobu přibližně 4 až 5 týdnů. Ztráty narozených zajíčat jsou velmi vysoké a do podzimu přežívá většinou pouze 20 – 30 % z nich (Ophoven, 2011).

1.1.3 Potrava a trávení zajíce polního, cékotrofie

Zajíci polní konzumují velmi rozmanitou potravu, která zahrnuje mnoho kulturních i divoce rostoucích rostlin, včetně léčivých bylin. Živí se také trávou, brukvovitými rostlinami, bulvami, obilím a v zimě pupeny, výhonky a kůrou měkkých dřevin a ovocných stromů (Ophoven, 2011). Zuby zajíců jsou přizpůsobené pro okusování tvrdší potravy. V horní i dolní čelisti mají mohutné obloukovitě zahnuté hlodací zuby, vždy dva vedle sebe, které neustále dorůstají a obrušují se při hlodání. Přední strana zubů je pokryta tvrdou sklovinou, na zadní straně je sklovina slabší, takže při kousání se silněji obrušuje zadní část zubů a vytváří se tak dlátkovitý tvar kousací plochy. Zajíci mají také v horní čelisti dva další zakrnělé zuby, které však k okusování nevyužívají (Bouchner, 2003).

Obrázek 1: Dva druhy zaječího trusu, vlevo cékotrofy, vpravo tuhé výkaly, (www.zverokruh-shop.cz. 2023)

Zaječí trus je v přírodě snadno rozpoznatelný díky svému kulatému tvaru. Na místech s lákavou potravou se nachází největší počet bobků, jinak jsou rozptýleny v celém teritoriu (Bouchner, 2003). Jedná se o tzv. tvrdý trus. Je tmavě hnědavé až černé barvy

a jeho velikost je závislá na věku jedince (Kučera et Kučerová, 2002). V trusu jsou patrné zbytky rostlinné potravy. V zimním období, kdy se zajíci živí suchou potravou, jsou bobky světlejší a sušší, ale v letním období jsou měkčí a často i tmavší díky šťavnatější potravě (Bouchner, 2003).

Zajíc polní se řadí mezi druhy s cékotrofickým trávením. Cékotrofie je označení pro typ koprofágie (požírání výkalů) u býložravců, kdy je hlavním místem fermentace slepé střevo nebo vzestupná část tlustého střeva (Glogowski, 2010).

Býložraví savci nemají sekreční žlázy pro celulolytické enzymy, které by umožnily trávení rostlinných pletiv. U většiny z nich je součástí trávicího traktu tzv. fermentační komora, kde jsou vhodné podmínky pro obývání a množení mikroflory pro fermetaci a efektivní využití rostlinného materiálu (Glogowski, 2010). U zajícovců fermentace probíhá v zadní části trávicího traktu a materiály jako je celulóza, které lze rozložit pouze fermentací, představují velkou část dostupného energetického obsahu rostlin (Alexander, 1993). Výsledkem trávicího procesu jsou dva typy výkalů – tvrdé a měkké (Glogowski, 2010). Zaječí organismus se přizpůsobil využití těžko stravitelné potravy pomocí zvláštní adaptace, cékotrofie (Kučera et Kučerová, 2002). Zatímco koprofágie je požití normální stolice, proces cékotrofie zpracovává zvláštní typ trusu – tzv. cékotrofy (Obrázek 1). Ty zajíc odebírá a požírá přímo od svého řitního otvoru (Pehrson, 1983). Měkké výkaly mají silný slizniční obal a polykají se bez žvýkání (Hörnicke et Björnhag, 1980), dále se tráví v žaludku a tenkém střevě. Právě díky ochrannému slizničnímu obalu pokračuje proces fermentace i ve vysoce kyselém prostředí žaludku (Hirakawa, 2001).

Cékotrofy mají vyšší koncentraci živin a nízký obsah vlákniny (Hörnicke et Björnhag, 1980) a prostřednictvím cékotrofie, tak mohou zajíci využívat cenné živiny jako je bílkovina (Glogowski, 2010) a vitamíny (Hörnicke et Björnhag, 1980). Studie ukázaly, že pokud se zvířatům odebere možnost konzumovat měkké výkaly, dochází u nich k podvýživě i při zachování normální stravy (Glogowski, 2010).

Separační mechanismus v proximálním tračníku, který odvádí jemné částice do slepého střeva, a tak propouští pouze velké částice potravy, produkuje tvrdé výkaly. Když mechanismus přestane působit, fermentované materiály ze slepého střeva jsou vylučovány jako cékotrofy. Tvrdé výkaly jsou v podstatě odpadem, ale jejich důkladné žvýkání při opětovném požití redukuje špatně stravitelné velké částice na jemné, vhodné ke kvašení. Pravidelné opětovné požírání denních tvrdých výkalů, tak podporuje stravitelnost potravy. V případě, že má živočich k dispozici lepší potravu, tuhé

výkaly nerecykluje. Naopak v případě nedostatku potravy a nepřízně počasí jsou zajíci schopni díky konzumaci tvrdých výkalů přežít bez potravy i několik dní (Hirakawa, 2001).

1.1.4 Endoparaziti zástupců řádu Lagomorpha (zajícovci)

Populační hustotu tohoto druhu může kromě intenzifikace zemědělství ovlivňovat široká škála dalších faktorů, a to včetně těch antropogenních. Mezi vnitřní faktory pak patří například míra reprodukce a schopnost adaptace. Mezi vnější faktory ovlivňující úbytek zajíce polního se řadí například klima, dostupnost potravy, predátoři a také nemoci a infekce (Treml et al., 2007).

V našich podmínkách jsou nejčastěji zaznamenávána parazitární onemocnění, která mohou velmi negativně ovlivnit zdravotní stav zvěře obecně. Studie této problematiky přinášejí významné poznatky a pomáhají lépe porozumět parazitózám v regionálním kontextu, stejně jako v ekologických souvislostech. Parazitózy mohou zhoršovat a urychlovat jiné infekční a neinfekční nemoci, a ovlivňovat fyziologické procesy i odolnost organismu, zejména u mláďat. Výzkumy ukazují, že parazitózy mohou v některých oblastech způsobit až 50 % celkových ztrát zajíců, zejména v zimním a jarním období (Chroust et Forejtek, 2010).

Kokcidie (Coccidea)

Kokcidie jsou významnými patogenními parazity u zajíců a spolu s hlísticemi, které se vyskytují v plicích a trávicím traktu, představují hlavní regulační faktor pro populaci zajíců (Chroust, 1984).

Řadí se mezi výtrusovce (Apicomplexa), což jsou paraziti řadící se mezi závažné humánní a veterinární parazity. Kmen výtrusovci tvoří čtyři velké řády organismů: gregariny (Gregarinea), kryptosporidie (Cryptosporidiidae), kokcidie (Coccidea) a hemosporidie (Hematozoea) (Volf et Horák, 2007).

Existuje několik skupin obligátně intracelulárních parazitů patřících do Apicomplexa. Pro všechny tyto skupiny je společným rysem přítomnost apikálního komplexu v infekčních stadiích, známých jako zoity (Tenter et al., 2002). Apikální komplex se podílí na pohybu a pronikání zoitů do hostitelských buněk. Skládá se z cytoskeletárních struktur, zahrnujících konoid (tvořený spirálovitě seskupenými mikrofibrilami) a

polární prstenec. Součástí tohoto komplexu jsou také sekreční organely, jako jsou mikronémy a rhoptrie, které při invazi vylučují specifické látky umožňující interakci s hostitelskou buňkou a proniknutí do ní (Katris et al., 2014).

Apicomplexa se dělí do dvou tříd na základě přítomnosti a struktury konoidu. Aconoidasida nemají konoid, zatímco Conoidasida, zahrnující kokcidie, mají kompletní konoidovou stavbu (Adl et al., 2019).

Kokcidie jsou specifické právě svou stavbou buňky a třem fázím rozmnožování v průběhu životního cyklu (Volf et Horák, 2007). Tento druh má jedno jádro a jeho životní cyklus se vyznačuje střídáním generací. Střídání zahrnuje fázi nepohlavního mnohonásobného rozpadu, který se nazývá schizogonie (merogonie). Dále následuje fáze tvorby a splývání pohlavních buněk (gametogonie) a konečně fáze vytváření oocyst se sporozoity (sporogonie). Během schizogonie se vytváří velké množství dceřiných jedinců, tzv. schizontů nebo merozoitů, kteří napadají další buňky hostitele a proces schizogonie se opakuje (Laštůvka, 2004).

Coccidia se dělí na dvě skupiny, Adeleorina a Eimeriorina. Řazení závisí na přítomnosti nebo absenci určitých vývojových stadií (Adl et al., 2019). Tito prvoci mají složitý životní cyklus, který může probíhat buď v jednom hostiteli (monoxenní), nebo v několika hostitelích (heteroxenní).

Mezi monoxenní řadíme např. *Eimeria* spp. Jedná se o kokcidiální organismy, jejichž celý životní cyklus včetně tvorby oocyst probíhá uvnitř buněk jediného hostitele. Tento rod představuje nejzávažnější skupinu monoxenních kokcidií. Většina druhů rodu *Eimeria* se vyvíjí v různých částech střevní tkáně hostitele, přičemž pouze několik druhů se může rozmnožovat mimo střeva, například *E. stiedai*, který se vyskytuje v játrech (Ryšavý, 1989).

Obvykle nedochází k přenosu z jednoho druhu zvířete na jiný, protože kokcidie jsou druhově specifické (Geisel, 2002). Kokcidie byly zjištěny u zajíců všech věkových kategorií, ale zvěř okolo šesti týdnů je nejvíce náchylná k infekci. Během průzkumu zajíců v přírodě bylo zjištěno, že vylučování oocyst má dynamický průběh s nejvyššími hodnotami koncem léta a na začátku podzimu (srpen až říjen), a dalšími, menšími vrcholy na jaře (březen až duben). Většinou se jedná o smíšené infekce více druhů kokcidií, přičemž asi 70 % všech vylučovaných oocyst tvoří druhy *E. leporis* a *E. robertsoni* (Chroust, 1984).

U zajíců a králíků se infekce kokcidiemi projevuje onemocněním střev tzv. kokcidiózou (Páv, 1981). Infekce kokcidiovými oocystami se přenese při pozření trusu

infikovaných zvířat. V důsledku parazitické infekce dochází v trávicím traktu k zánětlivým procesům, které se projevují průjmy a celkovým vyčerpáním organismu. Kokcidie jsou běžně přítomny u dospělé zvěře, aniž by vyvolaly příznaky onemocnění. Mladí zajíci se nejčastěji nakazí na podzim a v zimě na společných stanovištích, kde se nachází potrava (Červený, 2004).

Hlístice (Nematoda)

Většina hlístic je drobná a nenáročná a jsou jednou z nejpočetnějších a nejrozmanitějších forem života na této planetě. Velká většina z nich žije volně a jejich druhy jsou přizpůsobeny prakticky každé vhodné vodní nebo suchozemské ekologické nice. Jen malá část z nich parazituje na živočiších a využívá je pro část nebo celý svůj životní cyklus (Jacobs et al., 2015)

Hlístice představují velmi rozmanitou skupinu z hlediska morfologie i biologie. Jejich tělo je válcovitého, vřetenovitého nebo nitkovitého tvaru a může mít různé délky, od menších měřících 1 mm až po obří druhy dlouhé až 8 m (Ryšavý et al., 1989).

Jsou výjimeční mezi živočichy díky tomu, že udržují tekutinu v tělní dutině pod relativně vysokým tlakem, což umožňuje pohyb pomocí svalových svazků působících proti tomuto vnitřnímu hydrostatickému tlaku a pružnosti tvrdých vnějších vrstev těla (tzv. kutikuly). Tyto vnitřní síly ztěžují polykání a vyžadují větší svalový hltan k přečerpávání potravy do střeva. Všechny tyto funkce jsou koordinovány nervovým prstencem kolem hltanu, který je spojen podélnými nervy s různými ganglii. Mnoho anthelmintik působí tak, že narušuje nervosvalovou koordinaci, což brání červům přijímat potravu nebo udržovat svou polohu v hostiteli (Jacobs et al., 2015).

Barva těla hlístic se liší v závislosti na druhu, často bývá bělavá, nažloutlá nebo hnědožlutá, ale u druhů, které se živí krví svých hostitelů, může být až červená. Hlístice jsou gonochoristé a samečci jsou obvykle menší než samičky (Ryšavý et al., 1989).

Hlístice jsou rozšířené v různých prostředích. Mohou žít v trávicím traktu, kde spotřebovávají trávenou potravu, poškozují střevní epitel nebo se živí krví hostitele, nebo se vyskytují v tkáních hostitele. Názvy onemocnění způsobených těmito parazity jsou odvozeny od jejich vědeckých názvů a obecně se označují jako helmintózy (Laštůvka et al., 2001).

U hlístic byl zaznamenán paratenický parazitismus, kdy se infekční larvy hromadí v tělech hostitelů. Parateničtí hostitelé jsou z hlediska epizoologie a epidemiologie vý-

znamnější než mezihostitelé, protože infekční larvy se v jejich tělech mohou kumulovat po delší dobu a udržovat svou schopnost vyvolat infekci. V důsledku toho v tělech paratenických hostitelů často nalezneme velké množství infekčních larev, které po pozření hostitele mohou vyvolat masivní infekci (Ryšavý et al., 1989).

I když se mnoho hlístic jeví na první pohled beztvarých, lze je pod mikroskopem snadno identifikovat. Kutikula, která pokrývá jejich povrch, není jednoduchou membránou, ale složitou strukturou s mikroskopickými znaky, jako jsou malé jamky obsahující drobné smyslové orgány podobné prstům (smyslové papily). Někdy se vyskytují výraznější diagnostické znaky, jako jsou křídlovité výčnělky a kutikulární zduření, které pokrývají celý obvod těla (Jacobs et al., 2015).

Trichostrongylus retortaeformis je nejčastějším a nejnebezpečnějším parazitem zajíců v průběhu celého roku. Jedná se o nitkovité, bělavé cizopasníky, kteří parazitují na sliznici žaludku a střev. Tento parazit způsobuje onemocnění známé jako „trichostrongilóza“. Dalším častým parazitem u zajíců je *Trichocephalus sylvilagi*, který obývá slepé a tlusté střevo. Tělo tohoto cizopasníka je bílé a má delší, nitkovitou přední část a kratší, silně ztluštělou záď. U dospělých jedinců mohou poškodit střevní sliznici (Skřivan et al., 2007).

Mezi méně významné parazity zajíců patří hádě střevní (*Strongyloides papillosus*) a roup králičí (*Passalurus ambiquus*), kteří obývají tlusté a slepé střevo (Ryšavý et al., 1989). Hádě střevní způsobuje onemocnění strongyloidózu. Parazit má složitý životní cyklus, při kterém se dospělci vyskytují v trávicím traktu a produkují vajíčka, ze kterých se vyvíjejí larvy. Tyto larvy jsou vylučovány společně s výkaly a musí projít dvěma svlékáními, aby se staly infekčními a mohly znovu napadat hostitele. Nejčastěji se larvy dostávají do těla savců kůží a cestují krevním oběhem do plic, kde způsobují kašel. Po polknutí hlenu se larva dostane zpět do trávicího traktu, kde dospěje a opět produkuje vajíčka (Skřivan et al., 2007).

Roup králičí se vyskytuje ve slepém a tlustém střevě králíků, přičemž samička klade svá vajíčka v oblasti konečníku. Z vajíček se vylíhnou larvy, které obvykle způsobují infekci téhož jedince v rámci autoinfekce. U zajíců a králíků usnadňuje autoinfekci cékotrofie. Infekce může být přenesena i přes kontaminované krmivo nebo podestýlku, kde se mohou vyskytovat vývojová stadia roupů (Franklová et Bulantová, 2012).

Jedince řádu Lagomorpha postihuje také plicní protostrongylóza (Anderson, 2000). Zvíře se nakazí po pozření infekčních larev (larvy třetího stadia neboli L3),

které jsou v terénu uvolňovány mezihostiteli - plži (Joyeux et Gaud, 1946). Klinický aspekt infekce je typicky charakterizován bilaterální bronchopneumonií a subpleurálními lézemi (Battisti et al., 2000). Rozsáhlé léze mohou modifikovat plicní funkce a ovlivňovat celkový zdravotní stav a kondici. Z toho důvodu může zvíře hůře unikat predátorům a je náchylnější k bakteriálním infekcím. V Evropě se plicní helmintóza často vyskytuje a pravděpodobně se podílí na cyklickém poklesu populací zajíců (Lesage et al., 2012).

Tasemnice (Cestoda)

Tasemnice jsou ploší červi, kteří jsou zodpovědní za vznik různých typů parazitárních onemocnění (Mertin, 2005). Řadí se do kmene ploštěnců (Platyhelminthes), kteří jsou obecně charakterizováni silně dorzoventrálně zploštělým tělem a mohou mít tvar listovitý nebo pentlicovitý (Ryšavý et al., 1989). Proces vývoje tasemnic zahrnuje mezihostitele, který je nezbytný pro dokončení cyklu (Mertin, 2005). Vývoj je buď s proměnou nebo přímý, u některých parazitických tříd se složitými životními cykly (Ryšavý et al., 1989).

Třída tasemnic se považuje za monofyletickou skupinu, která zahrnuje tři skupiny: Gyrocotylidea, Amphilinidea (Cestodaria) a Eucestoda. Tasemnice zahrnují přibližně 5000 druhů, kteří parazitují na všech skupinách obratlovců s největším počtem řádů u paryb a ryb (Volf et Horák, 2007).

Tasemnice se vyskytují ve formě monozoické (tvořené jedním článkem - např. Caryophyllidea) nebo polyzoické (tvořené několika články - např. *Echinococcus*) a někdy i mnoha články (např. *Taenia*) (Volf et Horák, 2007).

Onemocnění způsobená tasemnicemi jsou označována jako cestodózy. Tyto cestodózy se dělí na dvě kategorie: cestodózy způsobené larvami tasemnic a cestodózy způsobené dospělými tasemnicemi. Mezi cestodózy způsobené larvami tasemnic patří cysticerkózy, coenurózy a echinokokózy. Cysticerkózu u zajíců způsobuje boubel hráškový tasemnice hráškové (*T. pissiformis*) nazývaný *Cysticerkus pissiformis*, který je velikosti malého hrášku a vyskytuje se na serózních blanách v dutině břišní i hrudní. U zajíců se také vyskytuje larvální stadium boubel *Coenurus serialis*, které se nachází v podkoží a je vývojovým stadiem tasemnice mnohohlavé (*T. serialis*). Tasemnice mnohohlavá parazituje obdobně jako boubel hráškový (Zachovalová, 2005).

Tenké střevo zajíce může osidlovat také tasemnice *Mosqovoyia pectinata* (tasemnice zaječí), která je schopna dosahovat délky 50–180 mm a maximální šířky 10–15

mm. Vzácně se u druhu zajíce polního vyskytují také druhy *Andrya rhopalocepha* a *Ctenotaenia ctenoides* (Ryšavý et al., 1989).

Tasemnice obvykle vyžadují dva hostitele: mezihostitele a finálního hostitele pro dokončení svého životního cyklu, jako je například rod *Taenia*. Nicméně existují i druhy s tříhostitelským cyklem, jako je rod *Diphyllobothrium*, a vyjimečně jsou popsány druhy, které se spoléhají na jediného hostitele, jako jsou rody *Archigetes* a *Hymenolepis*. Vajíčka tasemnic se spolu s trusem hostitele dostávají do vnějšího prostředí, a když je nový hostitel spolkne (např. při konzumaci infikované vody nebo potravy), vajíčko se uvolní a larva se dostane do těla hostitele. Tato larva pronikne stěnou střeva do lymfatického nebo krevního oběhu a následně se může dostat do různých orgánů (Volf et Horák, 2007).

Paraziti mohou často narušovat různé hormonální a metabolické procesy v těle hostitele, a dokonce ovlivňovat sílu svalů, což může ztížit hostiteli rychlou únikovou reakci před predátorem. Pokud jde o vícehostitelský životní cyklus parazita, definitivní hostitel se nakazí pozřením infikované tkáně mezihostitele. Larva se poté v těle finálního hostitele připojí ke stěně střeva, dorůstá, dospívá a začíná produkovat vajíčka (Letková et al., 2010).

1.2 Mikrosporidie a encefalitozoonóza

Mikrosporidie jsou jednobuněční intracelulární paraziti a jsou klasifikováni jako samostatný kmen Microsporidia. Na základě výzkumů, lze předpokládat, že mikrosporidie by mohly být jedním z nejčastějších parazitů živočichů. V současnosti je známo přibližně 2000 druhů těchto parazitů rozřazených do 200 rodů (Vávra, 2017), kteří jsou schopni infikovat jak obratlovce, tak bezobratlé organismy a způsobovat u nich nemoci (JA, 1989). Předpokládá se, že většina druhů doposud nebyla objevena (Canning et Lom 1986).

Hlavním jejich morfologickým znakem je rozdíl mezi vegetativními stadii, která slouží k množení, a diseminovanými sporami (Vávra et Lukeš, 2013). Diseminované spory jsou speciální typy mikrosporidiových buněk, které jsou výsledkem množení a diferenciace mikrosporidie. Tyto spory jsou určeny k šíření infekce a jsou produkty mikrosporidiového životního cyklu (Canning et al., 2005).

Spory mikrosporidií jsou malé a mají charakteristickou morfologii. Mohou být kulovité, oválné nebo podlouhlého tvaru a mají odolnou vnější stěnu, pod níž je stočená speciální struktura zvaná pólová trubice. Tato trubice slouží k infekci nové hostitelské buňky a obsahuje buď lysozym, nebo jiné enzymy, které umožňují pronikání do hostitelské buňky (Didier, 2005).

Když jsou spory uvolněny z hostitele, mohou přežít v prostředí mimo hostitele po dobu několika dní a čekat na příležitost, kdy se dostanou do nového hostitele (Becnel et Weiss, 2014).

Klinické příznaky a onemocnění spojené s microsporidiózou se liší v závislosti na druhu původce infekce a stavu imunitního systému hostitele (Didier, 2005).

1.2.1 Historie

V polovině 19. století byl významně ovlivněn evropský hedvábný průmysl onemocněním nazvaným pébrine (onemocnění bource morušového způsobené prvoky) (Müller, 1841). Následně byla v roce 1857 identifikována a popsána první mikrosporidie *Nosema bombycis* u housenky bource morušového (Nägeli, 1857). O několik let později popsal Luis Pasteur morfologii spor (Pasteur, 1870). Podobné organismy byly nalezeny u řady druhů živočichů, zejména u ryb. Roku 1922 byl poprvé zdokumentován případ výskytu mikrosporidií u savce. Jednalo se o záznam výskytu mikrosporidií u králíka (Wright et Craighead, 1922).

Mikrosporidiózy se vyskytují také u lidí. Poprvé byla infekce popsána v roce 1959 u devítiletého chlapce (Matsubayashi et al., 1959). Nejvíce infekcí v lidské populaci bylo zaznamenáno od začátku pandemie HIV. Postupně tak byly popsány mikrosporidie: *Encephalitozoon cuniculi* (Bergquist et al., 1984), *Enterocytozoon bieneusi* (Desportes et al., 1985), *Encephalitozoon hellem* (Didier et al., 2004) a *Encephalitozoon intestinalis* (Cali et al., 1993).

1.2.2 Hostitelská specifita

Infekčním stadiem mikrosporidií jsou spory (Canning et Lom, 1986) a jsou schopny infikovat živočichy téměř všech kmenů. Vysoká početnost výskytu byla zaznamenána u ryb a hmyzu (Desportes et al., 1985). Poprvé byly mikrosporidie detekovány ve tkáních savců před téměř 100 lety (Matsubayashi et al., 1959). Do 60. let 20. století bylo

zaznamenáno 15 druhů mikrosporidií, které způsobují infekce u lidí (Desportes et al., 1985).

Největší klinický význam mají druhy z rodu *Encephalitozoon* (Didier et Khan, 2014). *Encephalitozoon cuniculi* patří k nejvíce prozkoumaným druhům mikrosporidií a jsou známy čtyři hostitelsky nepříliš specifické genotypy (I – králičí kmen, II – myší kmen, III – psí kmen a IV – lidský kmen (Talabani et al., 2010).

Mikrosporidie nejčastěji infikují trávicí trakt hostitelů, ale napadají téměř všechny orgány a dokáží se šířit celým organismem (Weber et Bryan, 1994).

U imunokompetentních savců, kteří byli laboratorně nakaženi, byly pozorovány multifokální změny v tkáních, které se nejčastěji vyskytovaly v játrech, ledvinách, slezině a mozku (Shadduck et Orenstein, 1993).

1.2.3 Způsob přenosu mikrosporidií savců

Mezi zvířetem a člověkem dochází k zoonotickému přenosu mikrosporidií (Didier et al., 2004). Přenos z nakažených štěňat na člověka prokázali Innes a Stewart (1991), kdy vyšetřovali dva vrhy různých fen, jejichž štěňata prokazovala klinické příznaky. Nakazily se děti, které byly se štěňaty v bezprostředním kontaktu (Innes et Stewart, 1991).

Nejčastějším ze způsobů přenosu do vnějšího prostředí je prostřednictvím výkalů a moči infikovaných jedinců. Minimální infekční dávka je stále neznámá a pravděpodobně se liší v závislosti na jednotlivém druhu a genotypu (Didier et Weiss, 2011).

Nejčastějším zdrojem infekce jsou fekálně-orálním přenosem šířené spory z infikovaných osob a zvířat, které se dostanou do potravy a vody. Nicméně, infekce se mohou šířit pohlavním stykem, skrz poraněnou kůži nebo oční léze (Didier et Weiss, 2011).

Spory mikrosporidií mají schopnost přežívat v nepříznivých podmínkách díky své specifické struktuře a stavbě, což umožňuje jejich přenos prostřednictvím vody, který patří mezi nejčastější způsoby šíření infekce. Výzkumy ukázaly, že spory jsou odolné vůči různým typům vody, včetně slané a sladké vody. Dále byla popsána schopnost spor *E. cuniculi* uchovat si svou infekčnost po dobu dvou let při teplotě 4 °C, stejně jako po zamrznutí při teplotě -24 °C po dobu 24 hodin (Koudela et al., 1999).

Studie ukázaly souvislost mezi mikrosporidiózou a AIDS pacienty, kteří konzumovali nedostatečně tepelně upravené maso a mořské plody. Spory mikrosporidií byly také nalezeny v čerstvém ovoci a zelenině, ovocných džusech (Fayer et Santín-Duran,

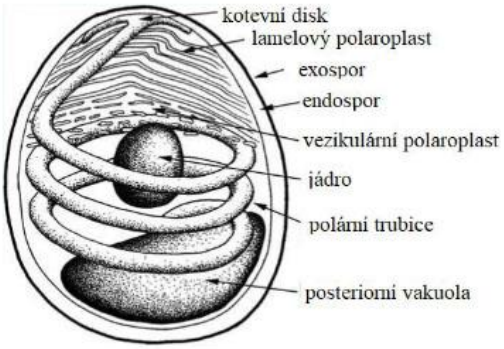
2014; Jedrzejewski et al., 2007) a pasterizovaném kravském mléce (Lee, 2008; Kváč et al., 2016). Nedávné výzkumy dokonce prokázaly, že spory mikrosporidií mohou přežívat ve fermentovaných masných výrobcích a čerstvých sýrech a udržovat si tak infekčnost (Sak et al., 2019; Vecková et al., 2021).

Byla zjištěna přítomnost spor mikrosporidií *E. intestinalis* v zavlažovací vodě používané v rostlinné produkci. Další výzkum prokázal, že spory mikrosporidií *E. bieneusi, E. intestinalis* a *E. cuniculi* mohou přežívat na bobulovitých plodech a listové zelenině, a že zjištěné množství spor bylo dostatečné k vyvolání infekce (Jedrzejewski et al., 2007). Kromě oplachování potravin kontaminovanou vodou mohou být spory přeneseny také při používání chlévské mrvy od nakažených hospodářských zvířat jako hnojiva (Slifko et al., 2000).

Kromě již zmíněných způsobů přenosu byl popsán také přenos mikrosporidií transplacentálně, který byl pozorován u hlodavců, masožravců, koní a opic. U lidí však přenos mikrosporidií z matky na plod dosud prokázán nebyl (Snowden et al., 1998).

1.2.4 Vývojový cyklus, klinické příznaky a průběh infekce

Životní cykly různých druhů mohou mít různorodé charakteristiky, ale obecně se skládají z tří hlavních fází: proliferační fáze (merogonie), sporogonické fáze (sporogonie) a infekčního stadia – spory (Obrázek 2). Merogonie zahrnuje nepohlavní dělení nepohyblivých stadií známých jako meronti, které se vyskytují v hostitelských buňkách. Tento proces může být několikrát opakován a hostitelská buňka obvykle neutrpí významné poškození (Fantham et Porter, 1912).



Obrázek 2. Schéma spory mikrosporidie, upraveno (Keeling et Fast, 2002).

Endogenní vývojová stadia jsou narozdíl od složitě stavěných spor primitivně organizovaná. Jednoduchá mikroskopická sporoplazma, která stojí na počátku vývoje, je

vpravena do hostitelské cytoplazmy dutým vláknem vystřeleným ze spory během klíčení. Sporoplazma se postupně mění v tzv. meront, které se dále dělí a svými dceřinými buňkami (merozoity) dále zaplavuje buňku hostitele. Následně se každá původně vegetativní buňka mění ve sporu (Vávra, 2017). Dělení probíhá buď v přímém kontaktu s hostitelskou cytoplasmou např. u druhů *Nosema* spp. nebo *Enterocyzoon* spp., v parazitoforní vakuole např. u druhu *Encephalitozoon* spp., v nukleoplasmě např. u druhů *Enterospora* spp. nebo *Nucleospora* spp. případně v endoplazmatickém retikulu, např. u druhu *Endoreticulatus* spp. (Vávra et Larsson, 2014). Následně se merozoiti přeměňují ve sporonty (formuje se elektrodenzní vrstva na povrchu buněk). Další fází je vznik sporoblastu, který probíhá buď uvnitř pouzdra parazitárního původu nebo v přímém kontaktu s hostitelskou cytoplazmou (Cali et Takvorian, 2014). Během morfogeneze se sporoblast zmenšuje a cytoplazma zahušťuje a vzniká spora (Vávra et Larsson, 2014). Některé mikrosporidie se zredukovaly až na hranici minimálního eukaryotického genomu. Genomy rodu *Encephalitozoon* jsou menší než genomy některých bakterií (např. *Escherichia coli* – 4,6 Mbp) (Vávra, 2017). Životní cyklus mikrosporidie je ukončen diferenciací zralých spor, a jakmile počet spor kompletně vyplní hostitelskou cytoplazmu, praskne buněčná membrána a spory jsou uvolněny do prostředí, kde mohou infikovat další buňky. Odolná spora je dále přenesena do nového hostitele nebo způsobí autoinfekci stávajícího (Becnel et Weiss, 2014).

To, jestli hostitel onemocní mikrosporidiózou, je závislé na jeho schopnosti imunokompetence, celkovém zdravotním stavu a také lokalizaci infekce (Didier et al., 2004; Talal et al., 1998). V případě, že je hostitel zdráv, často infekce proběhne bezpříznakově. U oslabených jedinců mívá naopak celou řadu příznaků (Wittner et Weiss, 1999). Onemocnění se často objevuje u zvířat v chovech v nevhodných podmínkách a také u mláďat. Infekční agens nejčastěji osidlují trávicí trakt a tkáně ledvin a jater. Podle lokalizace infekce se odvíjí také symptomy onemocnění (Black et al., 1997). Nejčastějším příznakem mikrosporidiózy je chronický průjem doprovázený horečkou, zimnicí, hubnutím, ztrátou chuti k jídlu, snížením množství tuků, D-xylózy a vitamínu B12. Hostitel postupně chřadne a trpí únavou (Gumbo et al., 1999). Některé druhy mikrosporidií (např. *Vittaforma corneae*, *Brachiola algerae* druhy rodu *Nosema*) infikují také oko, nejčastěji rohovku, což způsobuje rozostřené vidění a může dojít až k jejímu protržení (Friedberg et Ritterband, 1999).

1.2.5 Terapie a prevence

Pro diagnostiku mikrosporidií se dnes častěji než mikroskopie, využívají molekulární metody. Ty jsou přesnější, citlivější a snazší pro interpretaci a rozlišení jednotlivých druhů a jejich genotypů (Procop, 2007). Světelná a elektronová mikroskopie či barvicí metody (např. barvení modifikovaným trichromem či fluorescenční barviva) jsou časově náročné a jak se ukázalo, nejsou mnohdy dostatečné pro zařazení do druhu (Weber et al., 1992; Procop, 2007). Často využívaná metoda je metoda PCR, která díky své vysoké citlivosti a specificitě a umožňuje rychlou a přesnou amplifikaci DNA v laboratoři bez nutnosti kultivace buněk (Kolmodin et Birch, 2002).

K léčbě mikrosporidióz se používají léčivé preparáty na bázi albendazolu, které inhibují polymeraci β-tubulinu a vykazují též antimykotickou aktivitu (Molina et al., 2002). Mechanismus účinku albendazolu spočívá v narušení metabolismu parazita, což vede k jeho smrti (Hutin et al., 1998). Nicméně, úplně účinkuje jen na druhy rodu *Encephalitozoon*. Na *E. bieneusi* je vhodnější fumagilin, antibiotikum produkované houbou *Aspergillus fumigatus*, který je však pro lidský organismus toxický a způsobuje neutropenii a thrombocytopenii (Molina et al., 2002).

1.2.6 Mikrosporidie infikující čeleď Leporidae (zajícovití)

Enterocytozoon bieneusi

Čeleď Enterocytozoonidae obsahuje dva rody, rod *Nucleospora* a rod *Enterocytozoon*. Zatímco druhy rodu *Nucleospora* infikují pouze ryby, rod *Enterocytozoon* obsahuje jediný druh *Enterocytozoon bieneusi*, který se vyskytuje také u králíků a zajíců a je to zároveň nejčastější původce lidských mikrosporidióz (Shadduck et Orenstein, 1993). Parazituje nejčastěji v epitelu dvanáctníku a tenkého střeva, ale i ve žlučových cestách. Spory tohoto parazita jsou přibližně 1 μm velké (Volf et Horák, 2007). Dle rozdílů v ITS (internal transcribed spacer – nástroj pro identifikaci organismů dle nekódující sekvence DNA) bylo k dnešnímu dni popsáno více než 500 genotypů, z nichž řada infikuje výhradně člověka (Santín et Fayer, 2009).

Encephalitozoon spp.

Rod *Encephalitozoon* zahrnuje čtyři druhy mikrosporidií, které nelze od sebe morfologicky odlišit: *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* a *E. lacertae* (Hinney et al., 2006).

Encefalitozoonóza je chronické a latentní onemocnění, které vede k selhání ledvin, encefalitidě, poruchám mozku a močových cest a může vést k úmrtí (Deplazes et al., 2000). Onemocnění je nejčastěji spojeno s postižením rovnovážného ústrojí, což se projevuje náklonem hlavy na stranu, chybným držením těla, poruchami rovnováhy, špatnou koordinací pohybů a třesem. Kromě toho se může projevit postižením zraku, což způsobuje zánět čočky a vznik šedého zákalu. Klinické příznaky postižení mozku, ledvin a očí se mohou vyskytovat samostatně nebo společně (Shadduck et Orenstein, 1993).

Encephalitozoon cuniculi

Tento druh byl poprvé identifikován u skupiny laboratorních králíků v roce 1922 (Jordan, 2005). U paralyzovaných zvířat byl izolován z míchy, mozku a ledvin (Wright et Craighead, 1922).

Nejčastěji infikovanými zvířaty jsou domácí králíci (Jeklová et al., 2010), spontánní infekce však byly zaznamenány i u jiných druhů savců (Jordan, 2005).

Rozeznáváme čtyři genotypy *E. cuniculi:* I. genotyp byl identifikován u králíků a lidí, II. genotyp u myší a polárních lišek, III. genotyp u psů a IV genotyp u lidí. Byl prokázán přenos ze zvířete na člověka (Didier et al., 1995) a současnosti je tedy považován za zoonotického parazita (Jordan, 2005).

V rámci studie provedené v České republice, Rakousku a na Slovensku bylo zjištěno, že 1,42 % (ze 701 zkoumaných jedinců) zajíců polních testovaných sérologickým vyšetřením bylo pozitivních na *E. cuniculi* (Bártová et al., 2015).

***Encephalitozoon intestinali*s**

U dospělého zajíce polního byl tento parazit poprvé popsán společně s *Encephalitozoon hellem* v roce 2007 v Belgii (Wright et Craighead, 1922). *Encephalitozoon intestinalis* je druhou nejrozšířenější mikrosporidií schopnou infikovat ptáky a savce včetně člověka (Bornay-Llinares et al., 1998).

Jedná se o mikrosporidii s velikostí spor 2 × 1,2 μm. Nejčastěji se vyskytuje v enterocytech, makrofázích lamina propria, fibroblastech a buňkách endotelu lamina propria, ale může také infikovat tlusté střevo, hepatobiliární trakt a rozšířit se do dalších orgánů jako je mozek, slezina nebo rektum (Kotler et Orenstein, 1999).

Encephalitozoon hellem

Za primární hostitele jsou považování ptáci, především vodní ptáci a papoušci, ale i kolibříci a pštrosi. U zvířecích pacientů způsobuje těžké střevní a ledvinové infekce (Kašičková et al., 2007). Jedná se o původce multifokální klínovité chronické intersticiální nefritidy (MKCD). MKCD je charakterizována tvorbou klínovitých jizev v intersticiu ledvin, což vede ke ztrátě funkce nefronů a následnému selhání ledvin. Mezi příznaky MCKD patří vysoký krevní tlak, proteinurie (vylučování bílkovin do moči), hematurie (přítomnost krve v moči) a postupné zhoršování funkce ledvin. Tyto příznaky mohou být asymptomatické v počátečních stadiích onemocnění (Eckardt et al., 2012).

1.3 Kryptosporidie a kryptosporidiózy

Rod *Cryptosporidium* patří do kmene výtrusovci a tvoří jej prvoci, kteří napadají především epiteliální buňky gastrointestinálního nebo respiračního traktu (Xiao et Fayer, 2008). Jedná se o kosmopolitně rozšířené parazity se širokou hostitelskou specifitou (Hoover et al., 1981). Patogenita kryptosporidií se liší podle jednotlivých druhů (Xiao et Fayer, 2008). Některé druhy mají pouze jednoho hostitele (*C. wrairi*) a jiné jsou specializované na konkrétní skupinu obratlovců (např. *C. muris* napadá hlodavce) (Xiao et Aryan, 2004).

Dříve byly kryptosporidie kvůli podobnostem ve vývojovém cyklu mylně řazeny mezi kokcidie (Levine et al., 1988). Molekulární fylogenetické analýzy později prokázaly, že jsou nejvíce příbuzné s třídou Gregarinea (Carreno et al., 1999). Oproti nejbližším příbuzným gregarinám jsou ale kryptosporidie mnohem menší a jejich velikost se pohybuje v řádech několika μm (Volf et Horák, 2007).

Zásadní odlišností od kokcidií jsou extracytoplazmatická lokalizace uvnitř hostitelské buňky, sporulace oocyst již uvnitř původního hostitele (Fayer, 1994) a absence plastidu (Zhu et al., 2000). Určité druhy infikují pouze žaludek (*C. andersoni*), jiné napadají výhradně mikroklky střeva (*C. parvum*), další druhy byly lokalizovány také v plicích a lymfatickém systému (*C. baileyi*) (Current et al., 1986; Xiao et al., 2004). Některé nemoci způsobené tímto parazitem mohou být akutní a mohou ohrozit život hostitele, zatímco jiné se mohou projevit mírnými příznaky, které postupně odezní nebo přejdou do chronického stadia (Putignani et Menichella, 2010).

1.3.1 Historie kryptosporidií

Ernest Edward Tyzzer, lékař a parazitolog, zaznamenal první zmínku o kryptosporidiích již na začátku 20. století. V roce 1907 objevil parazitického prvoka parazitujícího v žaludku laboratorních myší a nazval ho *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1907). V roce 1912 popsal Tyzzer další druh kryptosporidií, který se vyskytuje u myší a infikuje tenké střevo. Tento druh byl pojmenován *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). Třetí druh byl popsán v roce 1955 tentokrát u krůt. Jednalo se o *C. Meleagridis* (Slavin, 1955).

Z lékařského ani veterinárního hlediska nebyla kryptosporidiím dlouhou dobu věnována pozornost, až do doby, než byl tento parazit identifikován jako původce průjmových onemocnění skotu v roce 1970 a u lidí s oslabeným imunitním systémem o šest let později (Panziera et al.,1971). V sedmdesátých letech byly zaznamenány dva výskyty kryptosporidií u lidí (Meisel et al., 1976). Průjmové onemocnění bylo u těchto případů diagnostikováno biopsií a obě postižené osoby byly ve styku s dobytkem. Zároveň se kryptosporidióza prokázala také u chlapce, který v kontaktu se zvířaty nebyl (Lasser et al., 1979) a u dvaapadesátileté osoby po imunosupresi spojenou s transplantací ledvin (Weisburger et al., 1979).

V osmdesátých letech zájem o tuto problematiku stoupl a kryptosporidióza byla popsaná v cca čtyřiceti publikacích. Vědecké texty se zabývaly výskytem onemocnění napříč živočišnými druhy (hospodářská zvířata, opice či plazi) (Fayer et al., 2008). Od osmdesátých let byla odhalena celá řada případů kryptosporidiózy v souvislosti s pandemií AIDS (Blagburn et Current, 1983). Nejznámější epidemií způsobenou kryptosporidiemi je infekce 403 000 osob ve městě Milwaukee, USA. Nejméně 100 osob tehdy nemoci podlehlo a 1000 jich bylo hospitalizováno. Většinu případů opět tvořili imunodeficitní jedinci (Smith et Rose, 1998). Od poloviny 90. let došlo k významnému posunu v poznání diverzity kryptospordií, a to s nástupem molekulárních metod (Xiao et Ryan, 2004).

1.3.2 Hostitelská specifita

Každý parazit má své preference ohledně hostitelských druhů (Fayer, 2004). Hostitelské spektrum kryptosporidií se často studuje v laboratorních podmínkách pomocí experimentálních infekcí. Pokud kryptosporidie dokončí svůj vývojový cyklus v hostiteli a začnou být vylučovány infekční oocysty daného druhu nebo genotypu, který byl podán v infekční dávce, je hostitel považován za vnímavého k infekci (Vetterling et al., 1971).

Kryptosporidie se podle své hostitelské specifity dělí na druhy a genotypy s vysokou hostitelskou specificitou, což znamená, že jsou schopné parazitovat pouze na jednom hostitelském druhu. Na druhé straně stojí kryptosporidie, které jsou schopny infikovat několik fylogeneticky příbuzných druhů. A nakonec jsou tu kryptosporidie, které jsou schopné parazitovat na více vzájemně nepříbuzných druzích (Vetterling et al., 1971; Kváč et al., 2013).

Druhy *C. ubiquitum* a *C. parvum* patří mezi nejméně hostitelsky specifické, a proto se předpokládá, že mohou infikovat všechny savce včetně lidí (Fayer, 2004, Li et al., 2014). Zároveň však *C. parvum* subtyp IIc patří mezi kryptosporidie infikující pouze jediného hostitele, v tomto případě člověka (Kváč et al., 2014).

Druhy *C. wrairi* (výskyt u morčat), *C. ryanae* (výskyt u skotu), *C. hominis* (výskyt u člověka) nebo *C. suis* (výskyt u prasat) jsou zástupci s úzkou hostitelskou specifitou (Ifeonu et al., 2016; Kváč et al., 2013). I přesto, že jsou některé druhy úzce hostitelsky specifické, mohou příležitostně infikovat i nespecifické hostitele. Jedním z příkladů je infekce druhem *Cryptosporidium erinacei*, který je typickým parazitem ježků a zároveň byl prokázán také u imunokompetentního muže (Kváč et al., 2014).

1.3.3 Způsob přenosu

K nákaze dochází nejčastěji fekálně-orální cestou (Ditrich et al., 2005). Kryptosporidie obvykle napadají trávicí trakt, ale zejména u ptáků se objevují také infekce dýchacích cest či Fabriciovy bursy (Plutzer et Karanis, 2009).

Přenos často probíhá prostřednictvím kontaminované vody (Jiang et al., 2005). Chlorace vody je proti kryptosporidiím nedostatečně účinná (Xiao et al., 2000), a tak se *Cryptosporidium* spp. považuje za nejvýznamnější patogen z řad parazitů, které jsou přenášeny vodu (Hlavsa et al., 2018). Oocysty jsou schopné přežít ve vodě až 140 dní díky své vysoké životaschopnosti a odolnosti vůči vnějším vlivům (Ramirez et al.,

2004). Ke kontaminaci vody dochází přímo fekáliemi nebo splachem fekálně znečištěné půdy (Fayer, 2000). Poslední výzkumy potvrdily také výskyt kryptosporidií v mořské vodě. Kryptosporidie jsou schopné přilnout k mikroplastům ve vodě obsaženým, a tak snáze proniknou do potravního řetězce (Zhang et al., 2022). Oocysty kryptosporidií byly nalezeny i na žábrách mořských měkkýšů (Fayer, 2000).

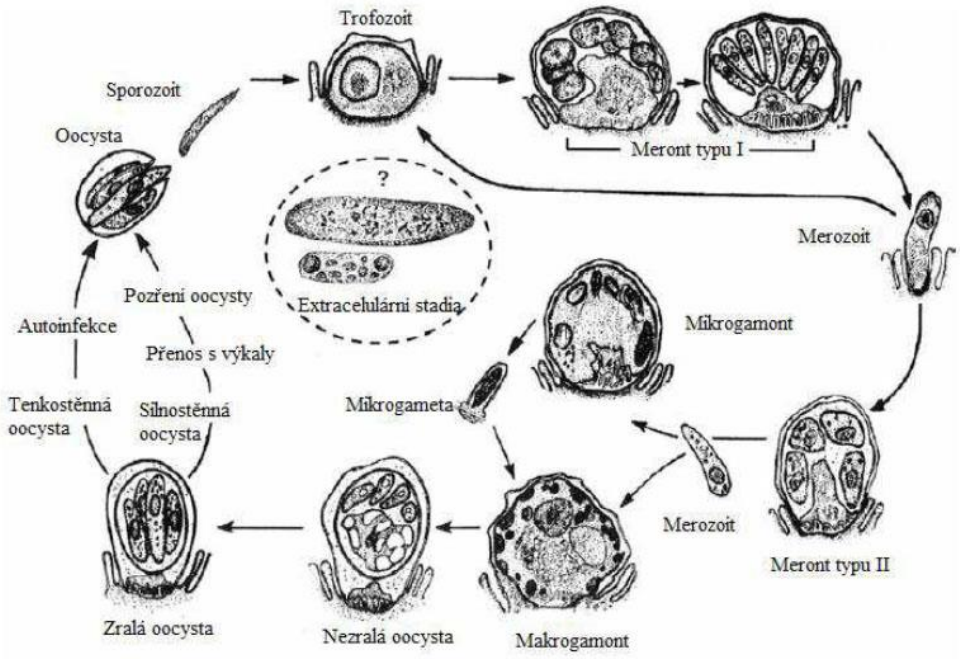
Jako další zdroj infekce byla prokázána kontaminovaná potrava nebo přímý kontakt s infikovaným jedincem (Atwill et al., 2002). Výjimečný není přenos mezi lidmi a časté jsou také případy zoonotických infekcí (Putignani et Menichella, 2010).

Infekční dávka se liší podle imunokompetence hostitele. U imunokompetetních jedinců je zapotřebí k propuknutí nákazy pozření alespoň 50 oocyst (Okhuysen et al., 1999).

1.3.4 Vývojový cyklus, klinické příznaky a průběh infekce

Zatím byl kompletní vývojový cyklus popsán pouze u několika málo druhů kryptosporidií: *C. muris* (Tyzzer, 1907, 1910), *C. parvum* (Tyzzer, 1912), *C. baileyi* (Current et al., 1986), *C. proliferans* (Melicherová et al., 2014) a *C. ornithophilus* (Holubová et al., 2020). U ostatních druhů kryptosporidií se předpokládá podobný vývojový cyklus s případnými menšími odchylkami.

Životní cyklus kryptosporidií je monoxenní, neboť je ukončen v jednom hostiteli (Obrázek 3; Okhuysen, 1999). Exogenní infekční stadia jsou nejčastěji vylučována výkaly vyjma oocyst *C. baileyi*, které svého hostitele mohou opouštět i dýchacími cestami či nosním sekretem (Current et Reese, 1986). Excystace probíhá v gastrointestinálním či respiračním traktu uvolněním čtyř infekčních sporozoitů (Volf et Horák, 2007), kteří adherují k hostitelským buňkám (Reduker et al., 1985), následně do buňky vnikají a mění se v trofozoity (Ditrich et al., 2005).



Obrázek 3. Vývojový cyklus kryptosporidií, upraveno (Fayer et Xiao, 2007)

Excystace je ovlivněna řadou faktorů jako jsou teplota a hodnota pH (Hijjawi et al., 2001), pankreatické enzymy, žlučové soli nebo obsah oxidu uhličitého (Fayer et Leek, 1984; Robertson et al., 1993). Právě v této fázi se výrazně odlišují od kokcidií, které se zanořují do cytoplasmy (Robertson et al. 1993).

Kryptosporidie zůstávají pod buněčnou membránou v tzv. parazitorforní vakuole, tzn. že kryptosporidie způsobí změny v mikrovilech střevního epitelu, enterocyty se následně prodlouží a obklopí trofozoit (Ditrich et al., 2005). Spolurované oocysty obsahují čtyři sporozoity a během defekace se uvolňují do vnějšího prostředí (Harris et Petry, 1999). Životaschopnost a odolnost sporozoitů zajišťuje třívrstvá stěna tvořená z proteino-lipido-sacharidového matrix (Fayer 2008).

V infikované cílové buňce hostitele se v parazitoforní vakuole vytvoří trofozoiti, kteří se účastní asexuálního množení (Wetzel et al., 2005). Během merogonie postupně vznikají různé typy merontů (Hijjawi et al., 2004). U *C. baileyi* se po rozdělení jádra trofozoita tvoří 3 typy merontů, u *C. parvum* dva – typ I. a typ II. (Bjorneby et al., 1990). Typ I. obsahuje 6–8 merozoitů, kteří napadají okolní enterocyty (Tyzer, 1910; Current, 1988). Merozoiti typu II. postupují buněčné dělení (Sunnotel et al., 2006), jehož výsledkem jsou čtyři merozoiti, ze kterých se vyvíjí nediferencovaná stadia. Každý z těchto gamontů je schopen infikovat další hostitelské buňky (Tyzer, 1910) a vstupují do sexuální fáze – gametogonie (Melicherová et al 2014).

V průběhu dalšího vývoje vznikají pohlavní formy – jednojaderné makrogamonty a vícejaderné mikrogamonty. Z mikrogamontů se uvolňují pohyblivé mikrogamety, které oplodní makrogamety vzniklé z makrogamontů. Tímto splynutím vzniká zygota (Sunnotel et al., 2006; Hijjawi et al., 2010). Diploidní zygota se dále dělí sporogonií (Tyzer,1910; Current et Garcia, 1988). Následuje endogenní sporulace a vznikají dva typy oocyst. Silnostěnná oocysta obsahuje čtyři volně uložené haploidní sporozoity a reziduální tělísko a po opuštění těla hostitele s trusem je na rozdíl od oocyst kokcidií již plně infekční (Jokipii et Jokipii, 1986). Tenkostěnných oocyst např. druh *C. parvum* tvoří až 20 % ze všech produkovaných oocyst. Uvolňují se již v těle hostitele, infekční stadia pronikají k enterocytům a dochází k tzv. autoinfekci (Current et Reese, 1986).

Dle lokalizace v hostiteli a podle druhu kryptosporidie se liší i klinické projevy kryptosporidiózy (Vítovec et al., 2006). Mezi hlavní klinické příznaky humánní kryptosporidiózy patří vodnatý průjem, často s hlenem. Další symptomy jsou nausea, vomitus, horečka nebo křeče v krajině břišní (Jokipii et Jokipii, 1986). U oslabených jedinců způsobují střevní kryptosporidie, zejména druh *C. parvum*, trávicí poruchy a mohou ovlivnit růst a vývoj, především u mláďat. Naopak, některé další druhy střevních kryptosporidií, jako je *C. suis*, mohou probíhat asymptomaticky (Ryan et al., 2004). Průměrné trvání nemoci je 12 dní,v rozmezí 2 až 26 dní (Jokipii et Jokipii, 1986).

Většina infekcí žaludečních kryptosporidií probíhá bez klinických příznaků (Current et Garcia, 1991).

1.3.5 Terapie a prevence

Jediným lékem schváleným v USA pro léčbu humánní kryptosporidiózy je Nitazoxanid. Ten však neúčinkuje u pacientů HIV pozitivních (Rossignol, 1998). Lék snižuje klinické ukazatele nemoci a zkracuje délku trvání kryptosporidiózy (Ortiz et al., 2001). Dále se k léčbě využívá Paromomycin, který účinkuje i u imunodeficitních jedinců, ale obdobně jako předchozí lék nezabírá u HIV pacientů (Cabada et White, 2010). V případě kombinace Paromomycinu s Azithromycinem byla prokázána signifikantní redukce vylučovaných oocyst i u pacientů s AIDS (Smith et al., 1998).

U imunokompetentních jedinců se používá především symptomatická léčba, především rehydratace organismu a doplňování elektrolytů. Využívají se také probiotické bakterie, které tlumí projevy kryptosporidiózy (Ditrich et al., 2005).

Veterinární preparáty obsahující účinnou látku halofuginon jsou používány k léčbě hospodářských zvířat. Tyto přípravky se využívají nejen jako preventivní a terapeutická léčba kryptosporidózy u telat, ale také jako kokcidiostatika u drůbeže a králíků (Trotz-Williams et al., 2011; Brainard et al., 2021). U telat se také úspěšně vyvinula protektivní imunita po peroorální vakcinaci oocystami *C. parvum* ozářenými gama zářením (Ditrich et al., 2005).

Studie prokázaly také účinnost kravského kolostra. Kravské mlezivo obvykle obsahuje protilátky účinně bojující proti kryptosporidiím. Zároveň poskytují částečnou ochranu sliznice střeva a neutralizují uvolněné kryptosporidie. Pro dosažení maximálního účinku je nutné podávat mlezivo nejméně třikrát denně po dobu několika dní a poté alespoň další dva dny po ukončení vylučování oocyst. Infikované zvíře by mělo být drženo odděleně a trus pravidelně odstraňován (Svoboda et al., 2000).

1.3.6 Kryptosporidie infikující čeleď Leporidae (zajícovití)

Cryptosporidium spp. bylo zaznamenáno ve výkalech více jak 150 druhů savců. Zatím však nebyla přesně popsána rizika nákazy od volně žijících živočichů (Robinson et Chamlers, 2009), ačkoliv je řada vědců považuje za rezervoáry nákazy a zdroje potencionálních zoonóz (Fayer et Xiao, 2008).

Přestože byla první zpráva o výskytu kryptosporidií u králíků zaznamenána již v roce 1912 (Tyzzer, 1912), obavy z kryptosporidiové infekce u králíků se objevily až v posledních letech (Robinson et al., 2008).

Prevalence *Cryptosporidium* spp. byla zkoumána v populacích volně žijících králíků a zajíců pouze v několika studiích.

Cryptosporidium cuniculus identifikovali ve své studii Inman a Takeuchi u asymptomatické samice králíka divokého. Kryptosporidie byly v tomto případě zastoupeny v dostatečně velkém počtu a bylo možné provést elektronmikroskopická pozorování (Inman et Takeuchi, 1979).

V roce 1986 byl poprvé objeven výskyt kryptosporidií u divokého králíka východoamerického (*Sylvilagus floridanu*) v USA. Nalezená mrtvá samice byla značně vyhublá a kromě výskytu řady dalších parazitů u ní byly nalezeny i oocysty kryptosporidií (Ryan et al., 1986).

V roce 2010 byl v Austrálii proveden epidemiologický výzkum, který identifikoval výskyt kryptosporidií u králíků ze čtyř lokalit ve Victorii pomocí PCR spojené se

sekvenováním a fylogenetickými analýzami sekvencí. Bylo vyšetřeno 176 vzorků a z nich 6,8 % s pozitivním výsledkem (Nolan et al., 2010).

Druhy a genotypy*Cryptosporidium* spp. králíků a zajíců

Cryptosporidium parvum

Poprvé byl popsán parazit *Cryptosporidium parvum* u laboratorních myších v roce 1912 Tyzzerem (Tyzzer, 1912). Nicméně, je pravděpodobné, že Tyzzer pracoval s jiným druhem, než je dnes známé *C. parvum*, které parazituje především u skotu a dalších hospodářských zvířat, jak uvádějí Robertson et al. (2014). Tento druh má velmi širokou hostitelskou specifitu a předpokládá se, že je infekční pro většinu savců a některé druhy ptáků (Morgan et al., 1999; Bajer et al., 2003). Velikost oocyst *C. parvum* se pohybuje v rozmezí 4,2 (4,2–5,8) × 4,8 (3,5–5,0) μm, jak uvádí Hijjawi et al. (2004). V rámci rodu *Oryctolagus* bylo popsáno *C. parvum* v Číně u farmových králíků (Xiao et al., 2002), na Novém Zélandu u zastřeleného divokého králíka (Learmonth et al., 2004) a v ČR u brojlerového králíka z chovu (Ryan et al., 2003).

Ayinmode a Agbajelola (2019) zkoumali výskyt kryptosporidií ve farmovém chovu králíků v Nigérii. Ze 307 vzorků byl výskyt zaznamenán u 3,7 %. Všechny pozitivní vzorky byly identifikovány jako *C. parvum*.

Cryptosporidium cuniculus (dříve *Cryptosporidium* sp. rabbit genotyp)

Tento druh byl detekován v Northaptonshiru (UK). Jednalo se o kontaminaci vody oocystami z mršiny divokého králíka (Chalmers et al., 2009). V roce 2010 potvrdili Robinson et al. (2010) nález tohoto druhu u experimentálně infikovaných odstavených králíků divokých a zároveň tento druh označili společně s člověkem za přirozeného hostiele (Robinson et al., 2010). Zhang et al. (2012) potvrdili výskyt druhů u *C. cuniculus* u divokých králíků v Číně. Z 378 vzorků získaných v čínské provincii Heilongjiang byla zjištěna míra infekce 2,38 %.

Puleston et al. (2014) potvrdili kontaminaci vodního zdroje z mršiny králíka a identifikovali jej jako původce potvrzených výskytů kryptosporidiózy v oblasti Northamptonshire, jednalo se o *C. cuniculus*. Přítomnost nového podtypu VbA24 *C. cuniculus* potvrdili Kaupke et al. (2014) ve farmovém chovu králíků, kde docházelo k častým průjmovým incidentům a následným úhynům.

Výskyt u farmově chovaných králíků byl potvrzen také kolektivem autorů Naguib et al. (2021) v Egyptě. *Cryptosporidium cuniculus* u králíků divokých ve své studii popisují také Baz-González et al. (2021) a to na Tenerife, Kanárských ostrovech a ve Španělsku.

Cryptosporidium hominis

Tisíce případů kryptosporidiózy u lidí byly zjištěny po celém světě (Casemore et al. 1997; Fayer et al. 2000). Podle genetické analýzy byla většina infekcí způsobena dvěma typy organismů, které byly dříve klasifikovány jako "lidský" (genotyp 1) a "genotyp 2" vyskytující se u skotu (Awad-El-Kariem et al., 1994; Carraway et al., 1997). Výzkumy ukázaly, že genotyp 2 může infikovat mnoho různých hostitelů, zatímco "lidský" genotyp není tak snadno přenosný (Casemore et al., 1997).

Výskyt *C. hominis* byl potvrzen i u králíků, a to v zájmovém chovu v Japonsku (Shibashi et al., 2006).

***Cryptosporidium* sp. skunk genotyp**

Tento genotyp byl popré izolován z burunduka páskovaného (*Tamias sibiricus*) v Kalifornii (LV et al., 2009). Nicméně později byl popsán i u jiných hostitelů, především u veverek (Feng et al., 2007; Rengifo-Herrera et al., 2011; Stenger et al., 2015). Li et al. (2020) identifikovali tento genotyp u druhu *Lepus americanus*.

1.3.7 Orgánová a tkáňová specifita

Jednotlivé druhy nebo genotypy kryptosporidií vykazují tkáňovou či orgánovou specifitu. Vývoj všech známých kryptosporidií se často odehrává v nějaké části zažívacího traktu s možností infekce dalších orgánových soustav. Kryptosporidie lze rozdělit do monofyleticky odlišných linií podle místa infekce.

První linie zahrnuje kryptosporidie infikující epiteliální buňky žaludku, zatímco druhá linie zahrnuje kryptosporidie infikující střeva. U střevních kryptosporidií se dále rozlišují druhy napadající tenké, tlusté nebo slepé střevo. Většina kryptosporidií se vyvíjí v tenkém střevě, především v duodenu a jejunu, zatímco jen málo druhů (genotypů) bylo popsáno vývojem ve slepém nebo tlustém střevě (Xiao et al., 2004; Kváč et al., 2018; Horčičková et al., 2019).

2 Cíle práce

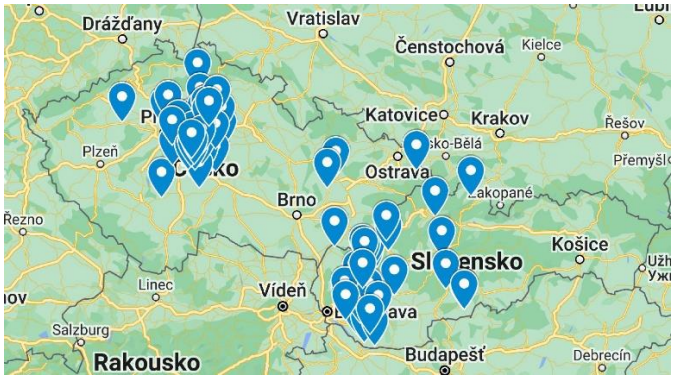
Cílem práce je popsat výskyt a prevalenci kryptosporidií a mikrosporidií u volně žijících zajíců polních na území České republiky, případně dalších států. Pomocí molekulárních metod určit druhy a genotypy studovaných parazitů a pomocí parazitologických metod stanovit intenzitu infekce. Fylogenetickými metodami určit fylogenetické vztahy nalezených druhů a genotypů kryptosporidií. Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů a porovnat získané výsledky s publikovanými údaji.

3 Materiál a metody

3.1 Lokality a sběr vzorků

Celkem bylo získáno a vyšetřeno 370 vzorků trusu z volně žijících zajíců polních, 130 vzorků z ČR a 240 ze Slovenska z celkem 91 lokalit (Obrázky 4 a 5). Vzorky byly pro potřeby výzkumu odebírány od zajíců dočasně chovaných v záchranných stanicích Vlašim a Huslík, z farmového chovu ze slovenské Skalice a dále pak z volné přírody na různých místech na Slovensku a ČR. Vzhledem k tomu, že nálezci mladých zajíců ne vždy sdělí přesné místo nálezu, nebylo možné u 24 vzorků určit přesně lokalitu a jedná se tedy u území spravované těmito dvěmi záchrannými stanicemi (Obrázky 4 a 5).

Obrázek 4. Působnost záchranných stanic pro živočichy v ČR, (www.zvirev-nouzi.cz, 2023)



Obrázek 5. Mapa lokalit sběru vzorků, QR kód pro online přístup

3.2 Uchovávání a zpracování vzorků trusu

Ihned po odběru bylo ke každému vzorku přikápnuto několik kapek dH_2O, aby nedošlo během skladování k vyschnutí vzorku. Vzorky byl individuálně skladovány při teplotě 4–8 °C až do laboratorního zpracování, které byly provedeno během 1–3 týdnů po odběru. Z každého vzorku byl zhotoven nátěr na podložní sklo (3.3) a odebráno 200 mg trusu pro izolaci gDNA (3.4).

3.3 Mikroskopické vyšetření trus

Pro detekci oocyst kryptosporidií ve vyšetřovaných vzorcích trusu byla použita metoda barveného nátěru trusu dle Miláčka a Vítovce (1985). S ohledem na velmi malou velikost spor mikrosporidií a nízkou senzitivitu a specificitu barvení spor nebyly mikroskopické techniky pro detekci *Encephalitozoon* spp. a *E. bieneusi* využity.

Barvení oocyst kryptosporidií anilin-karbol-methyl violetí (Miláček et Vítovec, 1985)

Chemikálie

- ***Methylviolet'*** (roztok 0,6 g methylvioleti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml 96% alkoholu a 70 ml deionizované vody)
- ***roztok 2% kyseliny sírové***
- ***1% roztok tartrazinu v 1% kyselině sírové***

Postup

- Natřít trus na podložní sklíčko v tenké vrstvě.
- Nafixovat nátěr v metanolu po dobu 10 minut.
- Barvit vzorek v roztoku methylvioleti po dobu 30 minut.
- Opláchnout vzorek po vodou.
- Diferenciace vzorek v 2% H_2SO_4 po dobu 2 minut.
- Opláchnout vzorek po vodou.
- Barvit vzorek v tartrazinu po dobu 5 minut.
- Opláchnout vzorek po vodou.
- Nechat vzorek oschnout při laboratorní teplotě.
- Prohlížet mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

3.4 Molekulární analýzy

3.4.1 Izolace DNA

Izolace gDNA byla provedena za použití komerčního kitu Exgene Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology).

Postup (jedná se o standardizovaný postup dle návodu výrobce s mírnou modifikací)

- Odvážit přibližně 200 mg vzorku trusu, dát ho do Safe-Lock zkumavky.
- Přidat přibližně 100 µl skleněných (0,2 mm) a 10 zirkonových (2 mm) kuliček.
- Připipetovat 0,8 ml FL pufru a homogenizovat vortexováním.
- Uvolnit DNA z oocyst a spor přístrojem Fast Prep 24 Instrument (MP Bio) po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s.
- Inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě
- Centrifugovat 5 minut při 14 000 *g*.
- Přepipetovat veškerý supernatant na EzPass kolonu.
- Centrifugovat 1 minutu při 14 000 *g* a následně vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Na EzPass kolonku napipetovat 100 µl EB pufru a inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, s následně centrifugovat 1 minutu při 14 000 *g*.
- Odstranit EzPass kolonku a připipetovat 500 µl PB pufru do sběrné zkumavky, promíchat pipetováním.
- Obsah sběrné zkumavky přenést na mini spin kolonu.
- Centrifugovat 1 minutu při 14 000 *g* a vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Napipetovat 500 µl NW pufru na střed mini spin kolony a centrifugovat 1 minutu při 14 000 *g*.
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět centrifugovat 1 minutu při 14 000 *g*.
- Přenést mini spin kolonu na čistou mikrozkumavku.
- Napipetovat 50 µl EB pufru na min spin kolonu, inkubovat 1 minutu a centrifugovat 1 minutu při 14 000 *g*.
- Získanou DNA skladovat při -20 °C.

3.4.2 Genotypizace

Vyizolovaná gDNA byla použita pro detekci specifické DNA *Cryptosporidim* spp., *Encephalitozoon* spp. a *Enterocytozoon bieneusi*. Přítomnost *Cryptosporidim* spp. byla testována amplifikací genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU) (Xiao, 2010).

a 60 kDa glykoproteinu (*gp60*) (Tang et al., 2016). Přítomnost *Encephalitozoon* spp. a *Enterocytozoon bieneusi* byla testována amplifikací celého úseku ITS sekvence rRNA genů za použií druhově specifických primerů (Santin et Fayer 2009). Jako negativní kontrola byla použita dH_2O a jako pozitivní kontrola pro *Cryptosporidium* spp. byla použita DNA *C. tyzzeri*, pro *Encephalitozoon* spp. DNA *Encephalitozoon helem* genotyp 1Aa pro *E. bieneusi* DNA *E. bieneusi* genotyp EpBa. Všechny PCR reakce byly provedeny jako nested PCR.

Primární reakce o objemu 20 µl se skládala z 10 µlHS-Taq premix (GenAll, Korea), 7 µl PCR vody, 1 µl200 mM specifického forward a reverse primeru a 2 µl gDNA. Sekundární reakce byla shodná s předpisem primární reakce s tím rozdílem, že jako templát pro sekundární reakci byly použity 2 µl z primární reakce. Jak primární, tak sekundární PCR reakce proběhla v 35 cyklech. Před zahájením cyklů byla DNA denaturována při teplotě 95 % po dobu 10 minut. V prvním kroku cyklu došlo k denaturaci DNA při 95 °C po dobu 45 sekund. Dále následoval krok nasedání primerů při specifické teplotě pro každou reakci po dobu 45 sekund (Tabulka 1) a následovala teplota 72 °C po dobu 1 minuty. Po ukončení všech 35 cyklů následoval cyklus konečné extenze produktů při 72 °C po dobu 7 minut s následným shlazením na 4 °C.

Tabulka 1. Seznam nukleotidových sekvencí primerů a jejich nasedacích teplot použitých v této práci.

***Cryptosporidium* spp. – SSU**									
PRIMÁRNÍ REAKCE- nasedací teplota 50°C									
F1	TTC	TAG	AGC	TAA	TAC	ATG	CG		
R1	CCC	ATT	TCC	TTC	GAA	ACA	GGA		
SEKUNDÁRNÍ REAKCE - nasedací teplota 55 °C									
F2	GGA	AGG	GTT	GTA	TTT	ATT	AGA	TAA	AG
R2	AAG	GAG	TAA	GGA	ACA	ACC	TCC	A	
Cryptosporidium* spp. – *gp60									
PRIMÁRNÍ REAKCE- nasedací teplota 50 °C									
F1	TTT	ACC	CAC	ACA	TCT	GTA	GCG	TCG	
R1	ACG	GAC	GGA	ATG	TAT	CTG	A		
SEKUNDÁRNÍ REAKCE - nasedací teplota 50°C									
F2	ATA	GGT	GAT	AAT	TCA	GTC	TTT	AAT	
R2	CCA	AAA	GCG	GCT	GAG	TCA	GCA	TC	

Tabulka 1. Seznam nukleotidových sekvencí primerů a jejich nasedacích teplot použitých v této práci (pokračování).

***Encephalitozon* spp. – ITS**									
PRIMÁRNÍ REAKCE- nasedací teplota 50 °C									
F1	TAG	ATG	GGT	CCC	TGT				
R1	GTT	CAT	TCG	CAC	TAC	T			
SEKUNDÁRNÍ REAKCE - nasedací teplota 55 °C									
F2	GGA	ATT	CAC	ACC	GCC	CGT	CGT	TAT	
R2	CCA	AGC	TTA	TGC	TTA	AGT	CCA	GGG	AG
***Enterocytozoon bieneusi* - ITS**									
PRIMÁRNÍ REAKCE- nasedací teplota 57°C									
F1	GGT	CAT	AGG	GAT	GAA	GAG			
R1	TTC	GAG	TTC	TTT	CGC	GCT	C		
SEKUNDÁRNÍ REAKCE - nasedací teplota 55 °C									
F2	GCT	CTG	AAT	ATC	TAT	GGC	T		
R2	ATC	GCC	GAC	GGA	TCC	AAG	TG		

3.4.3 Gelová elektroforéza

Sekundární PCR produkty byly separovány a analyzovány na 2% agarózovém gelu s přídavkem ethidium bromidu (EtBr). Vizualizace byla provedena pomocí UV záření na transiluminátoru (Ultra-Lum Inc, USA).

Chemikálie

- 50× TAE pufr (242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA o pH 8,00)
- agarosa (Serva Electrophoresis, Germany)
- ethidium bromid (10 mg/ml, Sigma Aldrich, USA)
- DNA Ladder – 100 bp (Fermentas International Inc., Kanada)

Postup

- 1×TAE pufr smíchat s agarózou v potřebném objemu.
- Pufr s agarózou rozpustit v mikrovlnné troubě a ochladit pod tekoucí vodou.
- Do tekutého gelu přidat cca 2 µl EtBr a opatrně promíchat.
- Gel nalít do formy s hřebeny a nechat ztuhnout. Po ztuhnutí hřebeny vyndat a gel vložit do elektroforetické vany s 1×TAE pufrem.

- Do první jamky napipetovat DNA Ladder a do dalších jamek produkty sekundární reakce PCR.
- Zapnout zdroj a nastavit napětí v rozmezí 70–120 V a separovat.
- Výsledek elektroforézy vizualizovat pomocí UV transluminátoru a dokumentovat pomocí příslušné kamery.

3.4.4 Izolace z gelu

Pozitivní PCR produkty v odpovídající výšce byly vyříznuty z gelu, vyizolovány a následně sekvenovány. K izolaci byl použit komerční kit Gen Elute (Sigma) podle návodu výrobce.

Postup

- Vyříznout fragment DNA z gelu vždy čistým skalpelem a přenést fragment do 1,5 ml mikrozkumavky.
- Připipetovat Gel Solubilization Solution (100 mg gelu / 300 µl roztoku).
- Inkubovat 10 minut při 50 °C.
- Zahřát PCR vodu na eluci na 65 °C.
- Sestavit Binding Column G, napipetovat 500 µl Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Připipetovat ke vzorku 150 µl isopropanolu a promíchat.
- Přenést veškerý objem vzorku na Binding G kolonu a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět použít s Binding G kolonou.
- Přepipetovat 700 µl Wash Solution G a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět ji použít s kolonou.
- Centrifugovat 1 minutu při 14 000 g nasucho.
- Otočit zkumavku v centrifuze o 180° a centrifugovat znovu 3 minuty při 14 000 g.
- Binding G Kolonu dát do nové 1,5 ml mikrozkumavky a na kolonu nanést provést 30 µl PCR H_2O předehřáté na 65 °C.
- Inkubovat 1 minutu a poté centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.

3.4.5 Sekvenování

Sekundární PCR produkty vyizolované z gelu byl sekvenovány metodou Sangerova sekvenování v komerčních firmách za použití příslušných sekundárních primerů. Získané nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí programu ChromasPro v 2.10 a následně pomocí programů ClustalX a BioEdit porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank. Získané sekvence byly seřazeny pomocí MAFFT verze 7 online server s automatickým výběrem strategie (Mafft, http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/). Chyby v sekvencích byly ručně doopraveny v programu BioEdit a byly provedeny fylogenetické analýzy v programu MEGA 7.0. Fylogenetické vztahy byly vytvořeny pomocí metody Maximum likelihood (ML) substitučním modelem, který byl stanoven na základě Bayesiánského informačního kritéria ve stejném programu. Podpora všech větví pro všechny modely byla získána 1000 bootstrapovými replikacemi. Fylogenetické stromy byly do finální podoby upraveny pomocí programu CorelDraw X7.

3.4.6 Hodnocení intenzity infekce

U vzorků mikroskopicky pozitivních na přítomnost oocyst kryptosporidií byla intenzita infekce odhadnuta a vyjádřena počtem oocyst v gramu trusu (OPG; oocyst per gram) (Kváč et al., 2007).

Množství spor *Encephalitozoon* spp. v trusu pozitivních zvířat bylo vyhodnoceno pomocí real time PCR za použití specifických primerů amplifikujících část genu kódujícího malou podjednotku rRNA *Encephalitozoon* spp. a specifické TaqMan próby (Wolk et al., 2002). Amplifikace byla provedena přístrojem Light cycler 480 (Roche, Indianapolis, IPA, USA) a výsledky reakce byly vyhodnoceny pomocí programu Light cycler 480 Software Release 1.5.0 SP4 (Roche). Kalibrační křivka byla sestrojena z DNA vzorků obsahujících známý počet spor *E. cuniculi* genotyp II (10^3 až 10^8) ve 200 mg trusu.

Reakce o objemu 25 µl se skládala z 12,5 µlFastStart Universal Probe Master 2× (Roche, USA), 5 µl PCR vody, 2 µl200 mM specifického forward a reverse primeru (Tabulka 2) a 0,5 µl próby a 5,0 µl gDNA.

Amplifikační program pro qRT-PCR se skládal z počáteční denaturace 95 °C po dobu 3 minut a 45 cyklů skládajících se z denaturace - 95 °C po dobu 45 s, nasedání primerů při 60 °C po dobu 10 s a extenze při 72 °C po dobu 16 s. Závěrečné extenze byla nastavena na 55–85 °C po dobu 16 s s rychlostí 20 °C/s a finálním chlazením na 40 °C po dobu 30 s (Wolk et al., 2002).

Tabulka 2. Seznam primerů a proby použitých v této práci pro RT-PCR kvantifikující *Encephalitozoon* spp.

Encephalitozoon spp.										
F	GTC	CGT	TAT	GCC	CTG	AGA				
R	ACA	GCA	GCC	ATG	TTA	CGA	CT			
proba	RED-	TGG	ACG	AGG	ATT	GGA	AGG	TCT	GAG	TC - PHOSPHATE

4 Výsledky

4.1 Mikroskopické vyšetření

Celkem bylo získáno a vyšetřeno 370 vzorků trusu z volně žijících zajíců v České republice (n=130) a na Slovensku (n=240). V žádném z vyšetřovaných vzorků trusu nebyly pomocí specifických barvení detekovány oocysty kryptosporidií.

4.2 Molekulární detekce

Molekulární analýzy založené na nested PCR amplifikaci za použití rodově specifických primerů amplifikujících SSU *Cryptosporidum* spp. a ITS *Encephalitozoon* spp. a *E. bieneusi* prokázaly přítomnost specifické DNA testovaných parazitů u 10,33, respektive u 16 zvířat. Vzorky pozitivní na na přítomnost specifické DNA kryptosporidií byly dále genotypovány na genu kódujícím gp60. Z deseti pozitivních vzorků bylo pět z nich pozitivních na gp60.Všechny amplifikované vzorky se podařilo úspěšně sekvenovat (dále).

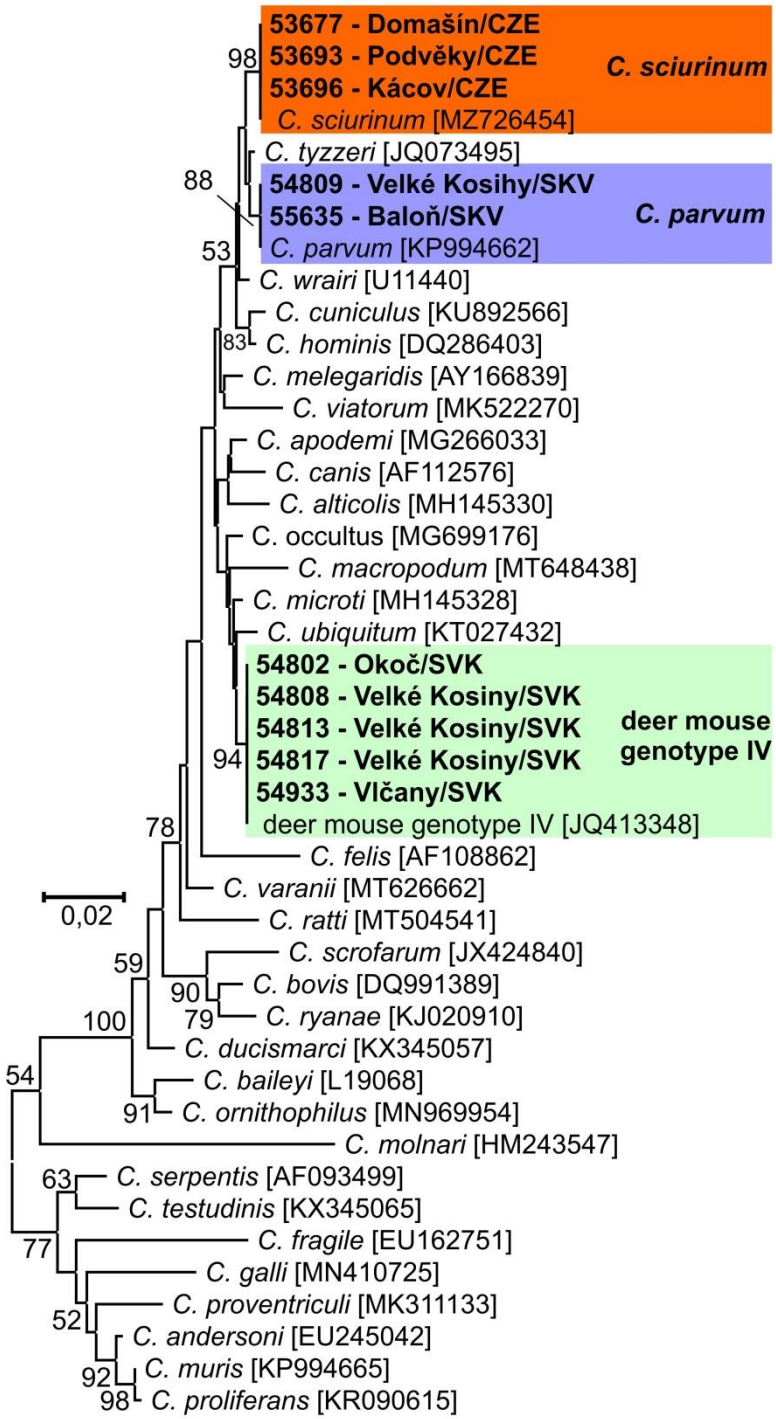
4.2.1 Genotypizace *Cryptosporidium* spp.

Analýzy sekvencí *Cryptosporidium* spp. prokázaly přítomnost tří různých sekvencí. Následnými fylogenetickými analýzami založenými na částečné sekvenci SSU jsme potvrdili výskyt *C. parvum* (n=2), *C. sciurinum* (n=3) a *Cryptosporidium*sp. deer mouse genotyp IV (n=5). Všechny sekvence v rámci daného druhu/genotypu byly mezi sebou vzájemně identické a současně 100% shodné se sekvencemi uloženými v databázi GenBank (Obrázek 7).

Druh *C. sciurinum* byl detekován pouze v České republice u tří zajíců pocházejících ze tří různých lokalit a umístěných v záchranné stanici Vlašim. Další dvě kryptosporidie byly detekovány pouze u zajíců ze Slovenska. *Cryptosporidium parvum* bylo nalezeno u dvou jedinců z různých lokalit a *Cryptosporidium* deer mouse genotyp IV u pěti zajíců ze tří lokalit. Z lokality Velké Kosiny byly detekováni tři pozitivní jedinci v různých obdobích sběru vzorků a lze tedy vyloučit, že se jednalo o vzorek pocházející ze stejného zvířete (Obrázek 6).

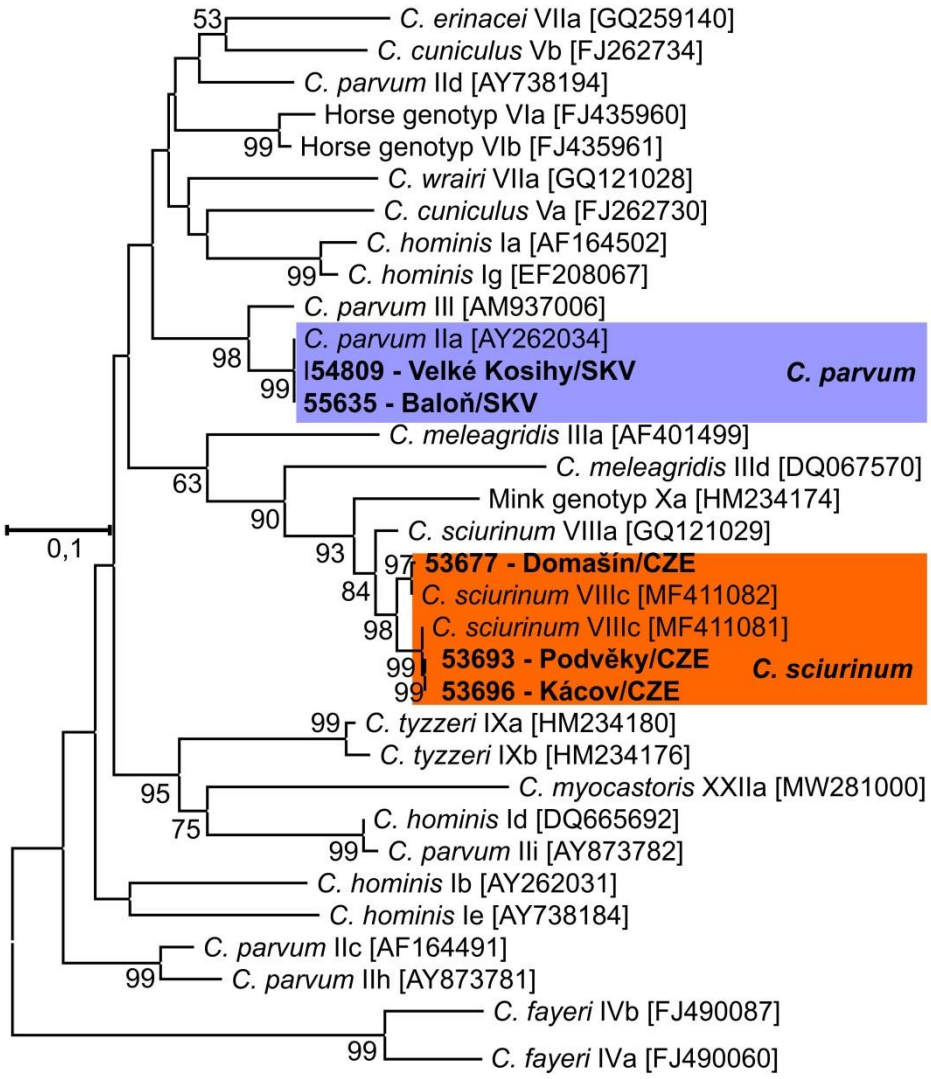
Následná genotypizace na genu gp60 ukázala, že u obou dvou jedinců *C. parvum* infekcí se vyskytoval identický subtyp IIaA15G1R1 (Obrázek 7). Analýza gp60 sekvencí získaných z druhu *C. scuirinum* prokázala přítomnost dvou odlišných subtypů

VIIIc. Zatímco zajíci z lokalit Podveky a Kácova měli identický subtyp VIIIaA9G2R1, zajíc z Domašína byl infikován subtypem VIIIcA10G1R1 (Obrázek 7).



Obrázek 6. Kladogram fylogenetických vztahů *Cryptosporidium* spp. detekovaných v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro SSU vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny tučně a barevně odlišeny. Databázové číslo

GenBank je uvedeno v hranaté závorce. Za identifikačním číslem izolátu je uvedena lokalita a země původu vzorku (CZE – Česká republika, SVK – Slovensko).



Obrázek 7. Kladogram fylogenetických vztahů *Cryptosporidium* spp. detekovaných v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro gp60 vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny tučně a barevně odlišeny. Databázové číslo GenBank je uvedeno v hranaté závorce. Za identifikačním číslem izolátu je uvedena lokalita a země původu vzorku (CZE – Česká republika, SVK – Slovensko).

4.2.2 Genotypizace *Enterocytozoon bieneusi*

V námi vyšetřených vzorcích bylo detekováno pět různých genotypů druhu *E. bieneusi*. Fylogenetické analýzy prokázaly přítomnost *E. bieneusi* genotyp D (n=8), *E.*

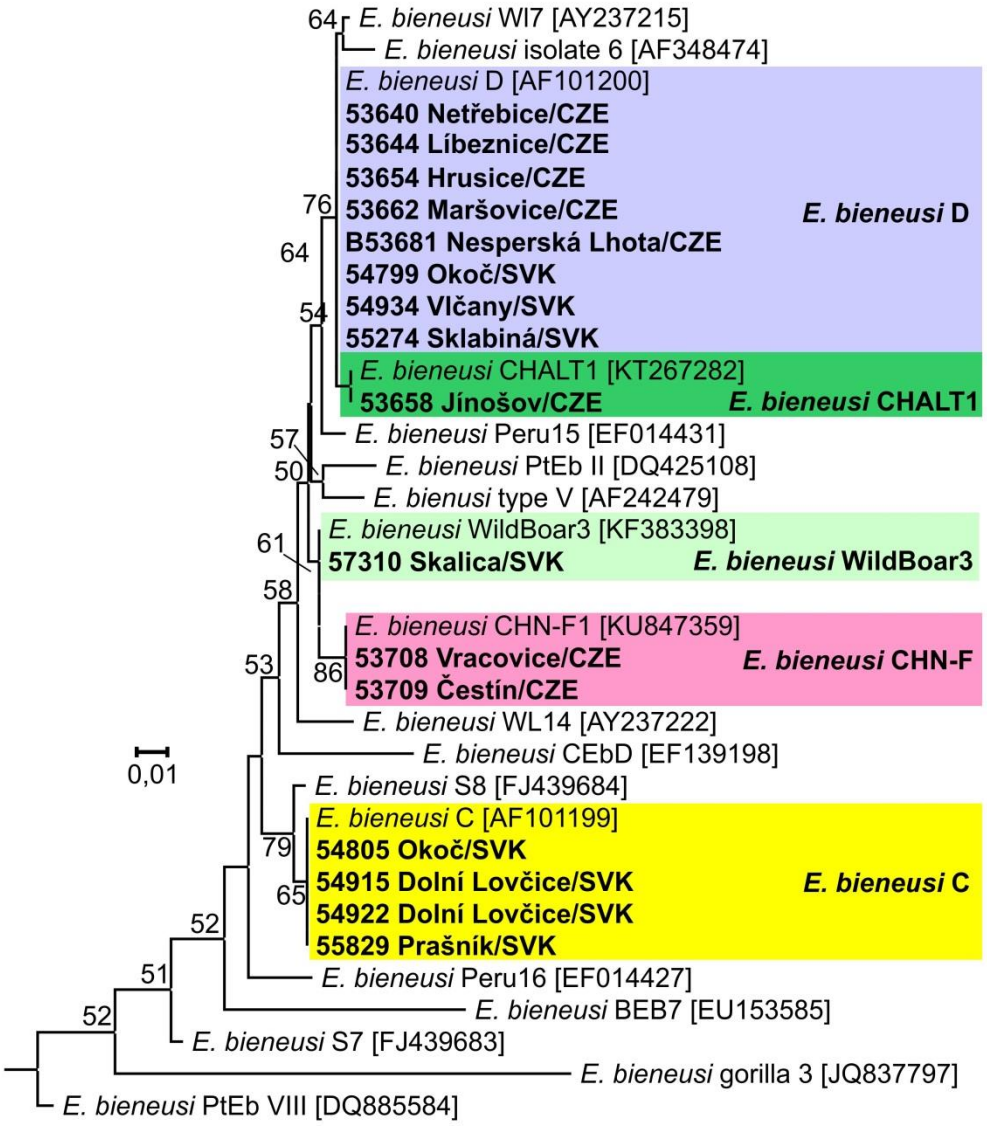
bieneusi genotyp CHALT1 (n=1), *E. bieneusi* genotyp WildBoar3 (n=1), *E. bieneusi* genotyp CHN-F (n=2) a *E. bieneusi* genotyp C (n=4). Všechny sekvence v rámci daného genotypu byly mezi sebou vzájemně identické a současně 100% shodné se sekvencemi uloženými v databázi GenBank (Obrázek 8).

Genotypy C a WildBoar3 byly detekovány výhradě u zajíců ze Slovenska, zatímco genotypy CHN-F a CHALT1 jen u zvířat z České republiky. Poslední genotyp D byl nalezen nejčastěji, a to u zvířat pocházejících z obou států (Obrázek 8).

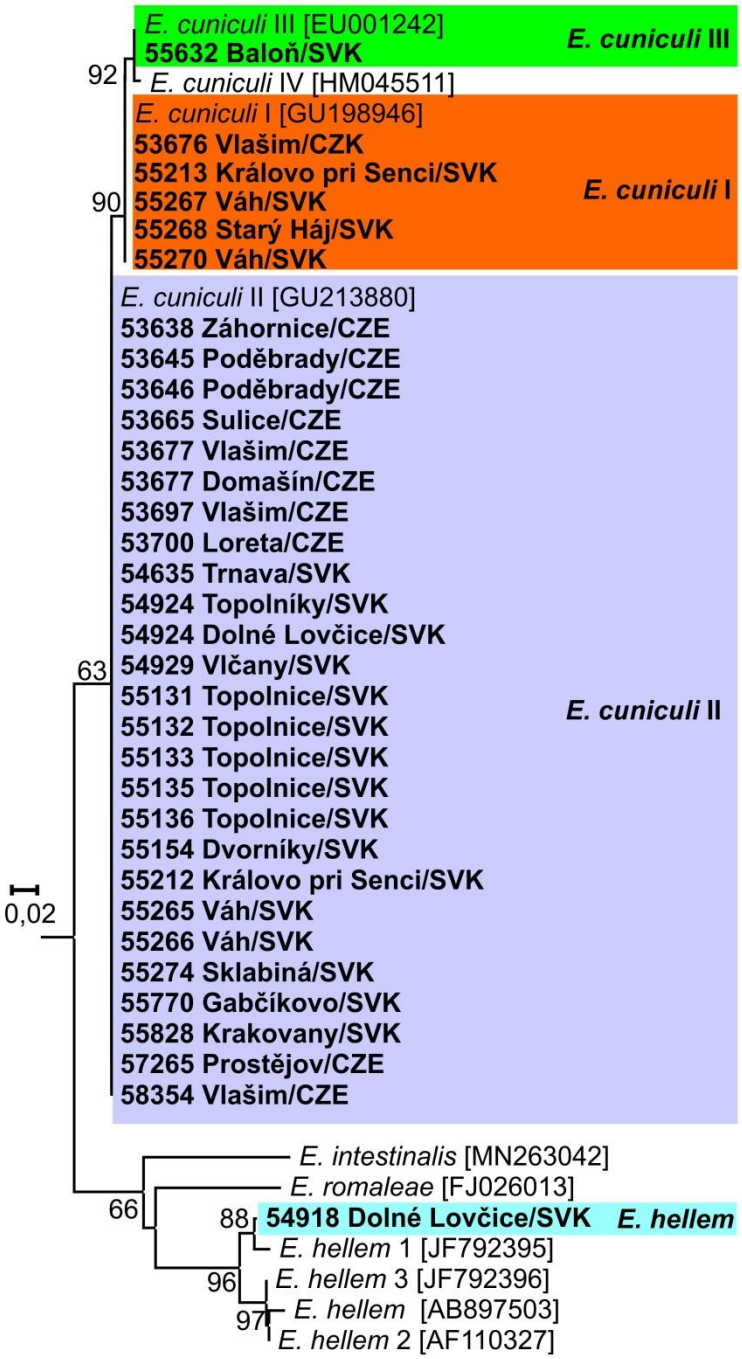
4.2.3 Genotypizace *Encephalitozoon* spp.

Všech 33 pozitvních vzorků se podařilo osekvenovat. Analýzy sekvencí *Encephalitozoon* spp. prokázaly přítomnost čtyř různých sekvencí. Následnými fylogenetickými analýzami založenými na úplné sekvenci ITS jsme prokázaly *E. cuniculi* genotyp I(n=5), *E. cuniculi* genotyp II(n=26), *E. cuniculi* genotyp III(n=1) a *Encephalitozoon hellem*(n=1). Všechny sekvence v rámci daného druhu/genotypu byly mezi sebou vzájemně identické a současně 100% shodné se sekvencemi uloženými v databázi GenBank, vyjma sekvence vzorku 54918 (Obrázek 10).

U zajíce č. 54918 byla detekována přítomnost sekvence blízce příbuzná k *E. hellem* genotyp 1 (JF92395), nicméně nebyla nalezena 100% shoda s jinou sekvencí uloženou v GenBank (Obrázek 9).



Obrázek 8. Kladogram fylogenetických vztahů *Enterocytozoon bieneusi* detekovaných v této práci s ostatními a genotypy *E. bieneusi* na základě úplné nukleotidové sekvence genu pro ITS vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny tučně a barevně odlišeny. Databázové číslo GenBank je uvedeno v hranaté závorce. Za identifikačním číslem izolátu je uvedena lokalita a země původu vzorku (CZE – Česká republika, SVK – Slovensko).



Obrázek 9. Kladogram fylogenetických vztahů *Encephalitozoon* spp. detekovaných v této práci s ostatními a genotypy *Encephalitozoon* spp.na základě úplné nukleotidové sekvence genu pro ITS vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny tučně a barevně odlišeny. Databázové číslo GenBank je uvedeno v hranaté závorce. Za identifikačním číslem izolátu je uvedena lokalita a země původu vzorku (CZE – Česká republika, SVK – Slovensko).

4.3 Kvantitifikace infekce

Vzhledem k tomu, že nebyly v žádném ze vzorků pozitivním na DNA kryptosporidií detekovány oocysty, je zřejmé, že intenzita infekcí byla velmi nízká pohybující se pod detekčním limitem mikroskopických metod, tedy méně než 2000 oocyst na gram trusu.

RT-PCR analýzy prokázaly intenzitu infekce *Encephalitozoon* spp. v rozpětí$1{,}5\times10^{2}$–$7{,}6\times10^{9}$, nicméně většina infekcí se pohybovala v rozmezí mezi $1{,}5\times10^{2}$–$5{,}4\times10^{2}$. Nebyl zjištěn rozdíl v intenzitě infekce mezi jednotlivými genotypy detekovaných druhů. Masivní intenzita infekce $7{,}6\times10^{9}$ byla detekována u jedince č. 54833 infikovaného *E. cuniculi* genotyp II a pocházejícího z Trnavy na Slovensku. Tento jedinec byl uloven a nejsou u něho známy bližší informace o potenciálních klinických příznacích infekce.

4.4 Klinické příznak infekce

U zvířat odchovávaných v záchranných stanicích nebyly v průběhu sledování zaznamenány žádné úhyny zajíců spojené s klinickými příznaky typickými pro mikrosporidiové nebo kryptosporidiové infekce.

5 Diskuse

Zajíc polní (*Lepus europaeus*) je z historického hlediska pravděpodobně nejvýznamnější lovnou zvěří v Evropě (Tsokana et al., 2020). Kromě masa a kožešiny, pro které byli a jsou zajíci loveni, představují tato zvířata potenciální zdroj nebezpečí pro lovce a dnes i pro osoby zabývající se jejich záchranou. Stejně jako jiné druhy volně žijících zvířat, také zajíci jsou hostiteli celé řady patogenů, které jsou přenášeny na člověka. Pro příklad můžeme uvést virus krymsko-konžské hemoragické horečky, viru hepatitidy E, *Yersinia* spp., *Brucella* spp., *Francisella tularensis*, *Toxoplasma gondii*nebo *Leishmania infantum* (Tsokana et al., 2020).

Z několika málo dosud provedených studií vyplývá, že kromě výše uvedených původců onemocnění mohou být zajíci polní hostiteli celé řady druhů kryptosporidií (Fayer et Xiao, 2007; Robinson et al., 2008; Nolan et al., 2010), které celosvětově patří mezi významné zoonotické patogeny (Xiao et al., 2014; Robinson et Chalmers, 2010). Kromě toho publikované práce naznačují, že stejně jako jejich příbuzní králíci, také zajíci jsou často parazitovaní mikrosporidiemi rodu *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon*, které jsou spojovány s významnými, život ohrožujícími infekcemi imunodeficitních osob (Ditrich et al., 2005; Smith et Rose, 1998).

Kryptosporidie jsou až na výjimky hostitelsky specifické (Vetterling et al., 1971; Kváč et al., 2013) a často infikují pouze jednoho hostitele nebo skupinu fylogeneticky příbuzných hostitelů (Fayer, 2004; Li et al., 2014). Zatímco u králíků byl popsán hostitelsky specifický druh *C. cuniculus*, z více než 49 platných druhů a 200 genotypů kryptosporidií není známa žádná kryptosporidie, která by byla hostitelsky specifická pro zajíce. Toto lze přikládat i faktu, že bylo na toto téma provedeno jen velmi malé množství studií.

V populaci námi studovaných zajíců v České republice a na Slovensku jsme detekovali přítomnost *C. parvum*, *C. sciurinum* a *Cryptosporidium* sp. deer genotyp IV. Druh *C. parvum* je považován za kryptosporidii s nejširším hostitelským spektrem. Přestože je tato kryptosporide nejčastěji detekována u mláďat hospodářských zvířat, zejména skotu, infekce *C. parvum* u volně žijících zvířat nejsou neobvyklé (Tyzzer, 1912; Morgan et al., 1999; Bajer et al., 2003; Ryan et al., 2003). Nicméně podíl infekcí *C. parvum* v porovnání s hostitelsky specifickými infekcemi je nízký (Carey et al., 2004). Tomu odpovídají i výsledky naší práce, kdy *C. parvum* infekce tvořily pouze 20 % všech kryptosporidiových infekcí.

Cryptosporidium sciurinum je druh, který je hostitelsky specifický pro stromové veverky a je běžným parazitem veverek obecných (*Sciurius vulgaris*) v Evropě (Prediger et al., 2021). Kromě stromových veverek byl tento druh nalezen i u fretky (označen jako *C. parvum* ferret genotyp (AF112572) (Xiao et al., 1999b), burunduka (*Tamias sibiricus*) a čipmanka východního (*Tamins striatus*). V jednom případě byl *C. sciurinum* nalezen i u nesavčího hostitele, u andulky vlnkované (*Melopsittacus undulatus*). V posledně jmenovaném případě se pravděpodobně jednalo o kontaminaci nebo pasáž zažívacím traktem andulky. Takovéto případy byly v minulosti již popsány (Abe et Makino, 2010). Až na výjimky, kterými jsou *C. parvum* a *C. meleagridis*, nejsou známy žádné společné infekce napříč živočišnými třídami (Morgan-Ryan et al., 2002). Detekce *C. sciurinum*, tak byla pro nás velkým překvapením. Nicméně po důkladné analýze dat bylo zjištěno, že všichni zajíci, u kterých bylo *C. sciurinum* detekováno, byly umístěni v záchranné stanici Vlašim. V této záchranné stanici byly vedle zajíců umístěny i další volně žijící zvířata, včetně veverek obecných, u kterých byl tento druh v minulosti detekován (Feng et al., 2007). Vzhledem k tomu, že každé zvíře bylo odebíráno pouze jedenkrát, nelze s jistotou tvrdit, že se jednalo o aktivní infekci. Mohlo dojít ke kontaminaci krmiva a pasáži specifické DNA. Ani počet tří pozitivních jedinců není pro rozhodnutí určující.

V případě volně žijících zajíců pocházejících z různých lokalit bychom si odvážili tvrdit, že se pravděpodobně jedná o aktivní nezávislé infekce, nicméně v případě jedinců pobývající v potenciálně kontaminovaném prostředí by se jednalo pouze o spekulace. Naopak v případě *Cryptosporidium* sp. deer mouse genotyp IV si dovolujeme tvrdit, že se s největší pravděpodobností jedná o aktivní infekce. Tato kryptosporidie byla detekována u pěti jedinců ze tří různých lokalit. Navíc dosud není znám žádný přirozený hostitel *Cryptosporidium* sp. deer mouse genotyp IV na evropském kontinentu. Tato kryptosporidie byla dosud nalezena jen u hlodavců rodu *Peromyscus*, kteří se vyskytují výhradně na severoamerickém kontinetu (Stenger et al.,2018). Obdobně jako v případě *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I, který byl do Evropy zavlečen spolu s veverkou popelavou (*Sciurus carolinensis*) (Prediger et al., 2021), lze předpokládat, že i tato kryptosporidie byla do Evropy zavlečena spolu s nějakým dovezeným mazlíčkem a zajíci mohou představovat vnímavého hostitele.

Ve všech případech kryptosporidiových infecí byla zjištěna velmi nízká intenzita infekce, což odpovídá většině dosud známých údajů o kryptosporidiových infekcích volně žijících savců. Nízká intenzita infekce není spojována s klinickými příznaky

onemocnění, které nebyly u žádného ze zvířat pozorovány. Na základě výsledků práce lze přepokládat, že kryptosporidiové infekce zajíců nejsou v populaci zajíců časté, a tedy ohrožující jejich počet.

Na rozdíl od kryptosporidií nejsou mikrosporidie rodů *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* úzce hostitelsky specifické (Snowden et al., 1998; Didier et al., 2000; Canning et al., 1986; Canning et Hollister, 1992). Jediný dostupný výzkum publikovaný v roce 2015 ukázal, že 1,42 % populace zajíců v České republice, Rakousku a na Slovensku bylo serologicky pozitivních na přítomnost protilátek *E. cuniculi* (Bártová et al., 2015). Vzhledem k tomu, že protilátková imunitní odpověď v hostiteli přetrvává déle, než je doba probíhající aktivní, detekovatelné infekce (Volf et Horák, 2007), výsledky autorů ukazují na nízké promoření zajíců mikrosporidiemi. Naše práce je však v rozporu s výše uvedenými údaji. Téměř u 9 % zajíců jsme detekovali přítomnost specifické DNA *Encephalitozoon* spp. ukazující na probíhající infekci. Vzhledem k tomu, že řada předchozích studií prokázala, že *Encephalitozoon* spp. je z těla hostitele vylučován v průběhu infekce intermitentně, je výše prevalence ze studií, které hodnotí pouze jeden vzorek ze zvířete velmi podhodnocena (Jordan, 2005; Bártová et al 2005). Na základě našich výsledků a výsledků jiných studií se domníváme, že výskyt *Encephalitozoon* spp. v populaci zajíců je velmi častý. Stejně tak se přikláníme i k výsledkům *E. bieneusi*, který byl v naší práci detekován ve 4,3 % případů. Bohužel neexistuje žádná práce, se kterou bychom naše výsledky srovnali.

V souladu s předchozími studiemi jsme detekovali *E. cuniculi* genotyp II jako dominantní genotyp. Tento genotyp je ze všech genotypů nejčastější, a to nejen v populacích volně žijících savců, ale i u hospodářských zvířat a člověka (Kotková et al., 2018). Za pozornost stojí přítomnost *E. hellem* u jednoho jedince. Samotná přítomnost ptačího encephalitozoonu u savce není překvapivá, protože savci jsou *E. hellem* poměrně často infikováni (Kotková et al., 2018). Zajímavější je však fakt, že námi získaná sekvence nebyla identická s žádnou jinou uloženou v GenBank. S ohledem na fakt, že i resekvenování zmíněného vzorku prokázalo přítomnost unikátní sekvence klastrující k *E. hellem*, jsme přesvědčeni, že se jedná buď o nový genotyp *E. hellem* nebo o nový druh rodu *Encephalitozoon*. K zodpovězení této otázky je však potřeba udělat řadu dalších analýz, které svou náročností přesahují cíle této práce.

Zařazení izolátů *E. bieneusi* do jednotlivých genotypů ukázalo, že zajíci jsou infikováni nejméně pěti různými genotypy. Všechny detekované genotypy patří do skupiny genotypů vyznačující se nízkou hostitelskou specifitou a byly v minulosti detekovány u řady jiných hostitelů (Cali et al., 1993).

Na rozdíl od dříve publikovaných údajů uvádějící časté klinické příznaky spojené s infekcemi mikrosporidiemi u králíků (Cox et Pye, 1975; Hinney et al., 2016, Huang et al., 2003; Chappell et al., 2011; Lindsay et al., 1989; Tůmová et al., 2002), nebyly obdobné příznaky zaznamenány u zajíců, tedy alespoň u těch, kteří prošli záchrannými stanicemi.

Závěry

Tato práce přinesla prioritní výsledky o výskytu parazitů rodu *Cryptosporidium*, *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* u volně žijících zajíců polních ve střední Evropě.

Jako vůbec první jsme prokázali *Cryptosporidium sciurinum* a *Cryptosporidium* sp. deer mouse genotyp IV u zajíce polního. Z pohledu ohrožení zdraví lidí nepředstavují zajíci významný zdroj zoonotických kryptosporidií. Původ, respektive způsob zavlečení deer mouse genotypu IV, který byl dosud detekován pouze na severoamerickém kontinetu zůstává nevysvětlen.

Zajíci jsou často infikováni mikrosporidiemi rodu *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon,* aniž by u nich byly pozorovány klinické příznaky mikrosporidiózy. Z pohledu šíření infekcí představují zajíci potenciální zdroj infekce pro člověka, zejména pro osoby profesně manipulující jak s živými, tak mrtvými zajíci.

Seznam použité literatury

ABE, N. a MAKINO, I. (2010). Multilocus genotypic analysis of Cryptosporidium isolates from cockatiels, Japan. *Parasitology research*, *106*(6), 1491-1497.

ADL, S. M., SIMPSON, A. G., LANE, C. E., LUKEŠ, J., BASS, D., BOWSER, S. S., BROWN, M. W., FABIEN BURKI, F., DUNTHORN, M., HAMPL, V., HEISS, A., HOPPENRATH, LARA, M. E., LINE LE GALL, LYNN, D. H., MCMANUS, H., MITCHELL, E. A. D., MOZLEY-STANRIDGE, S. E., LAURA W. PARFREY, L. W., PAWLOWSKI, J., RUECKERT, S., SHADWICK, L., CONRAD L. SCHOCH, C. L., SMIRNOV, A., SPIEGEL, F. W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eucaryotic Microbiology*, *59*(5), 429-514.

ALEXANDER, R. M. (1993). The relative merits of foregut and hindgut fermentation. *Journal of Zoology*, 231(3), 391-401.

ANDERSON, R. C. (2000). *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. Cabi.

ANDRESKA, J. (1993). *Tisíc let myslivosti: Lovecké hrady a zámky. Lovecké zbraně. Lovečtí psi. Zvěř. Sokolnictví. Čižba. Člověk myslivcem.* Tina, Vimperk. ISBN 80-85618-12-5.

ATWILL, E. R., PHILLIPS, R., RULOFSON, F. (2002). Environmental loading rates of the waterborne pathogenic protozoa *Cryptosporidium parvum* in certain domestic and wildlife species in California. In *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference* (Vol. 20, No. 20).

AWAD-EL-KARIEM, F. M., WARHURST, D. C., McDONALD, V. (1994). Detection and species identification of Cryptosporidium oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction. *Parasitology*, *109*(1), 19-22.

AYINMODE, A. B. a AGBAJELOLA, V. I. (2019). Molecular identification of Cryptosporidium parvum in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Nigeria. *Annals of Parasitology*, *65*(3).

BAJER, A., CACCIO, S., BEDNARSKA, M., BEHNKE, J. M., PIENIAZEK, N. J., SINSKI, E. (2003). Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *Journal of Parasitology*, *89*(5), 1053-1055.

BÁRTOVÁ, E., MARKOVÁ, J., SEDLÁK, K. (2015). Prevalence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi in European hares (*Lepus europaeus*). *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *22*(4).

BATTISTI, A., DI PAOLO, M., DI GUARDO, G. (2000). Pulmonary protostrongyliasis in a mountain hare from Italy. *Journal of wildlife diseases*, *36*(2), 367-369.

BAZ-GONZÁLEZ, E., MARTÍN-CARRILLO, N., GARCÍA-LIVIA, K., FORONDA, P. (2022). Molecular detection of *Cryptosporidium cuniculus* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Tenerife, Canary Islands, Spain. *Veterinary Sciences*, *9*(2), 91.

BECNEL, J. J. a WEISS, L. M. (Eds.). (2014). *Microsporidia: pathogens of opportunity* (pp. 521-570). John Wiley & Sons Incorporated.

BERGQUIST, R., MORFELDT-MÅNSSON, L., PEHRSON, P. O., PETRINI, B., WASSERMAN, J. (1984). Antibody against *Encephalitozoon cuniculi* in Swedish homosexual men. *Scandinavian journal of infectious diseases*, *16*(4), 389-391.

BJORNEBY, J. M., RIGGS, M. W., PERRYMAN, L. E. (1990). *Cryptosporidium parvum* merozoites share neutralization-sensitive epitopes with sporozoites. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *145*(1), 298-304.

BLACK, S. S., STEINOHRT, L. A., BERTUCCI, D. C., ROGERS, L. B., DIDIER, E. S. (1997). *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary Pathology*, *34*(3), 189-198.

BLAGBURN, B. L. a CURRENT, W. L. (1983). Accidental infection of a researcher with human Cryptosporidium. *Journal of Infectious Diseases, 148*(4), 772-773.

BORNAY-LLINARES, F. J., DA SILVA, A. J., MOURA, H., SCHWARTZ, D. A., VISVESVARA, G. S., PIENIAZEK, N. J., CRUZ-LÓPEZ, A., HERNÁNDEZ-JAÚREGUI, P., GUERRERO, J., ENRIQUEZ, F. J. (1998). Immunologic, microscopic, and molecular evidence of Encephalitozoon intestinalis (Septata intestinalis) infection in mammals other than humans. *Journal of Infectious Diseases, 178*(3), 820-826.

BOUCHNER, M. (2003). *Stopy zvěře: kapesní průvodce*. Cesty, Praha. ISBN 80-7181-695-7.

BRAINARD, J., HAMMER, C. C., HUNTER, P. R., KATZER, F., HURLE, G., TYLER, K. (2021). Efficacy of halofuginone products to prevent or treat cryptosporidiosis in bovine calves: a systematic review and meta-analyses. *Parasitology*, 148(4), 408-419.

CABADA, M. M. a WHITE JR, A. C. (2010). Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? *Current Opinion in Infectious Diseases, 23*(5), 494-499.

CALI, A. a TAKVORIAN, P. M. (2014). Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, 71-133.

CALI, A., KOTLER, D. P., ORENSTEIN, J. M. (1993). *Septata intestinalis* ng. n. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *40*(1), 101-112.

CANNING, E. U. a LOM, J. (1986). *The microsporidia of vertebrates*. Academic Press, London.

CAREY, C. M., LEE, H., TREVORS, J. T. (2004). Biology, persistence and detection of Cryptosporidium parvum and Cryptosporidium hominis oocyst. *Water research*, *38*(4), 818-862.

CARRENO, R. A., MATRIN, D. S., BARTA, J. R. (1999). *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research, 85*, 899-904.

CARRAWAY, M., TZIPORI, S., WIDMER, G. (1997). A new restriction fragment length polymorphism from Cryptosporidium parvum identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts. *Infection and Immunity*, *65*(9), 3958-3960.

CASEMORE, D. P. (1990). Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiology & Infection*, *104*(1), 1-28.

COX, J. C. a PYE, D. (1975). Serodiagnosis of nosematosis by immunofluorescence using cell-culture-grown organisms. *Laboratory Animals*, *9*(4), 297-304.

CURRENT, W. L. a GARCIA, L. S. (1991). Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *4*(3), 325-358.

CURRENT, W. L a REESE, N. C. (1986). A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice 1. *The Journal of Protozoology*, *33*(1), 98-108.

CURRENT, W. L., UPTON, S. J., HAYNES, T. B. (1986). The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology*, *33*(2), 289-296.

ČERVENÝ, J. (2004) *Encyklopedie myslivosti*. Ottovo nakladatelství v divizi Cesty, Praha. ISBN 80-7181-901-8.

DEPLAZES, P., MATHIS, A., WEBER, R. (2000). Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contributions to microbiology*, *6*, 236-260.

DESPORTES, I. Y. A. F. B. A., CHARPENTIER, Y. L., GALIAN, A., BERNARD, F., COCHAND-PRIOLLET, B., LAVERGNE, A., RAVISSE, P., MODIGLIANI, R. (1985). Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* ng. n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS 1. *The Journal of Protozoology*, *32*(2), 250-254.

DIDIER, E. S. (2005). Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica*, *94*(1), 61-76.

DIDIER, E. S. a KHAN, I. A. (2014). The immunology of microsporidiosis in mammals. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, 307-325.

DIDIER E. S. a WEISS L. M. (2011). Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *CurrentOpinion in Infectious Diseases*,*24*, 490–495

DIDIER, E. S., STOVALL, M. E., GREEN, L. C., BRINDLEY, P. J., SESTAK, K., DIDIER, P. J. (2004). Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology*, *126*(1-2), 145-166.

DITRICH, O., KVÁČ, M., KVĚTOŇOVÁ, D. (2005). Kryptosporidióza: rizika pro imunokompetentní a imunodeficitní jedince. Seminář "Oportunní a opomíjené protozoární střevní nákazy". Lékařský dům ČLS JEP, 2005. Sborník: 21-26.

DURANTEL, P., CORTAY, G., DENUC, J., DESCHRYVER, C., ROSSIGNOL, C. (2013). *Myslivost*: s. 285

ECKARDT, K. U., ALPER, S. L., ANTIGNAC, C., BLEYER, A. J., CHAUVEAU, D., DAHAN, K., DELTAS, C. HOSKING, A., KMOCH, S., RAMPOLDI, L.,

WIESENER, M., WOLF M. T., DEVUYST, O. (2015). Autosomal dominant tubulo-interstitial kidney disease: diagnosis, classification, and management—a KDIGO consensus report. *Kidney international*, *88*(4), 676-683.

FANTHAM, H. B., PORTER, A. (1912). The morphology and life history of *Nosema apis* and the significance of its various stages in the so-called 'Isle of Wight'disease in bees (Microsporidiosis). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *6*(2), 163-195.

FAYER, R. (1994). Effect of high temperature on infectivity of Cryptosporidium parvum oocysts in water. *Applied and environmental microbiology*, *60*(8), 2732-2735.

FAYER, R. (2004). Cryptosporidium: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary parasitology*, *126*(1-2), 37-56.

FAYER, R. (2008). Cryptosporidium and cryptosporidiosis . Fayer, R. and Xiao, L. *CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton*, *251*, 251.

FAYER, R. a LEEK, R. G. (1984). The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. *The Journal of Protozoology*, *31*(4), 567-569.

FAYER, R. a SANTIN-DURAN, M. (2014). Epidemiology of Microsporidia in Human Infections. *In Microsporidia: Pathogens of Opportunity (eds L.M. Weiss and J.J. Becnel)*, 135–164.

FAYER, R., SANTÍN, M., TROUT, J. M. (2008). Cryptosporidium ryanae n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (Bos taurus). *Veterinary parasitology*, *156*(3-4), 191-198.

FENG, Y., ALDERISIO, K. A., YANG, W., BLANCERO, L. A., KUHNE, W. G., NADARESKI, C. A., XIAO, L. (2007). *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(20), 6475-6483.

FRANKLOVÁ, M. a BULANTOVÁ, J. (2012) *Králík zakrslý*. Dotisk 1. vyd. Robimaus, Rudná u Prahy. Abeceda chovatele. ISBN 978-80-87293-09-6.

FRIEDBERG, D. N., a RITTERBAND, D. C. (1999). Ocular microsporidiosis. *The Microsporidia and Microsporidiosis*, 293-314.

GEISEL O. (2002). *Choroby zvěře* – rozeznávání a posuzování. Kostelec nad Černými lesy; nakladatelství Lesnická práce, s. r. o., Kostelec nad Černými lesy. ISBN: 80-86386-30-9.

GLOGOWSKI, R., PRZYGUDZKA, A., DZIERZANOWSKA-GORYN, D. (2010). Znaczenie zjawiska cekotrofii u malych ssakow roslinozernych. *Przegląd Hodowlany, 78*(06), 23-25.

GUMBO, T., HOBBS, R. E., CARLYN, C., HALL, G., ISADA, C. M. (1999). Microsporidia infection in transplant patients. *Transplantation, 67*(3), 482-484.
HARRIS, J. R. a PETRY, F. (1999). *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. *The Journal of Parasitology*, 839-849.

HIJJAWI, N. S., MELONI, B. P., MORGAN, U. M., THOMPSON, R. C. A. (2001). Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *International Journal for Parasitology, 31*(10), 1048-1055.

HINNEY, B., SAK, B., JOACHIM, A., KVÁČ, M. (2016). More than a rabbit's tale–Encephalitozoon spp. in wild mammals and birds. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 5*(1), 76-87.

HIRAKAWA, H. (2001). Coprophagy in leporids and other mammalian herbivores. *Mammal review, 31*(1), 61-80.

HLAVSA, M. C., CIKESH, B. L., ROBERTS, V. A., KAHLER, A. M., VIGAR, M., HILBORN, E. D., WADE, T. J., ROELLIG D. M., MURPHY, J. L., XIAO L., YATES, K. M, KUNZ, J. M., ARDUINO, M. J., REDDY, S. C., FULLERTON, K.

E., COOLEY, L. A., BEACH, M. J., HILL, V. R., YODER, J. S. (2018). Outbreaks associated with treated recreational water—United States, 2000–2014. *American Journal of Transplantation*, *18*(7), 1815-1819.

HOLUBOVÁ, N., SAK, B., HLÁSKOVÁ, L., KVĚTOŇOVÁ, D., HANZAL, V., RAJSKÝ, D., SLOSARKOVÁ, S., McEWAN, N. R., TOMAN, M. J., KVÁČ, M. (2018). Host specificity and age-dependent resistance to *Cryptosporidium avium* infection in chickens, ducks and pheasants. *Experimental Parasitology, 191*, 62-65.

HOLUBOVÁ, N., TŮMOVÁ, L., SAK, B., HEJZLAROVÁ, A., KONEČNÝ, R., MCEVOY, J., KVÁČ, OKHUYSEN, M. (2020). Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. *Parasites & Vectors*, *13*, 1-17.

HOOVER, D. M., HOERR, F. J., CARLTON, W. W., HINSMAN, E. J., FERGUSON, H. W. (1981). Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, Naso lituratus Bloch and Schneider. *Journal of Fish Diseases*, *4*(5), 425-428.

HORČIČKOVÁ, M., ČONDLOVÁ, Š., HOLUBOVÁ, N., SAK, B., KVĚTOŇOVÁ, D., HLÁSKOVÁ, L., KVÁČ, M. (2019). Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology*, *146*(2), 220-233.

HÖRNICKE, H., et BJÖRNHAG, G. (1980). Coprophagy and related strategies for digesta utilization. In Digestive physiology and metabolism in ruminants: Proceedings of the 5th International Symposium on Ruminant Physiology, held at Clermont—Ferrand, on 3rd–7th September, 1979 (pp. 707-730). Springer Netherlands.

HUANG, K., AKIYOSHI, D. E., FENG, X., TZIPORI, S. (2003). Development of patent infection in immunosuppressed C57Bl/6 mice with a single *Cryptosporidium meleagridis* oocyst. *Journal of Parasitology*, *89*(3), 620-622.

HROMAS, J. (2000). *Myslivost*. Matice lesnická. ISBN 80-86271-04-8.

HUTIN, Y. J., SOMBARDIER, M. N., LIGUORY, O., SARFATI, C., DEROUIN, F., MODAÏ, J., MOLINA, J. M. (1998). Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *Journal of Infectious Diseases*, *178*(3), 904-907.

CHALMERS, R. M., ROBINSON, G., ELWIN, K., HADFIELD, S. J., XIAO, L., RYAN, U., MALLAGHAN, C. (2009). *Cryptosporidium* sp. rabbit genotype, a newly identified human pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(5), 829-830.

CHAPMAN, J.A., FLUX, J. E. C. (1990). *Rabbits, hares and pikas: status survey and conservation action plan*. IUCN.

CHROUST, K. (2014). Dynamics of coccidia infection in free living and cage-reared hares. *Acta Veterinaria Brno*, *53*(3-4), 175-182.

CHROUST, K. a FOREJTEK, P. (2010). Parazitární choroby zvěře a jejich zdravotní význam. *Myslivost*, *4*(2010), 44.

IFEONU, O. O., CHIBUCOS, M. C., ORVIS, J., SU, Q., ELWIN, K., GUO, F., ZHANG, H., XIAO, L., SUN, M., CHALMERS, R. M., FRASER, C. M., ZHU, G., KISSINGER, J. C., SILVA, J. C. (2016). Annotated draft genome sequences of three species of C*ryptosporidium*: *Cryptosporidium meleagridis* isolate UKMEL1, *C. baileyi* isolate TAMU-09Q1 and *C. hominis* isolates TU502_2012 and UKH1. *FEMS Pathogens and Disease*, *74*(7), ftw080.

INMAN, L. R. a TAKEUCHI, A. (1979). Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Veterinary Pathology*, *16*(1), 89-95.

INNES, E. F. a STEWART, C. (1991). The pathology of subclinical infection of E*n-cephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, *62*(2), 51-54.

JA, S. (1989). Greeley E. Microsporidia and human infections. *Clinical Microbiology Reviews*,*2*(2), 158-165.

JACOBS, D., FOX, M., GIBBONS, L., HERMOSILLA, C. (2015). *Principles of veterinary parasitology*. John Wiley & Sons.

JEDRZEJEWSKI, S., GRACZYK, T. K., SLODKOWICZ-KOWALSKA, A., TAMANG, L., MAJEWSKA, A. C. (2007). Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(12), 4071-4073.

JEKLOVA, E., LEVA, L., KOVARCIK, K., MATIASOVIC, J., KUMMER, V., MASKOVA, J., SKORIC, M., FALDYNA, M. (2010). Experimental oral and ocular Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. *Parasitology*, *137*(12), 1749-1757.

JIANG, J., ALDERISIO, K. A., XIAO, L. (2005). Distribution of Cryptosporidium genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(8), 4446-4454.

JOKIPII, L. a JOKIPII, A. M. (1986). Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *New England Journal of Medicine*, *315*(26), 1643-1647.
JORDAN, C. N. (2005). *Encephalitozoon cuniculi: Diagnostic test and methods of inactivation* (Doctoral dissertation, Virginia Tech).

JOYEUX, C. a GAUD, J. (1945). Moroccan helminthological research. *Archives. Institut Pasteur du Maroc*, *3*(4), 111-143.

KATRIS, N. J., VAN DOOREN, G. G., MCMILLAN, P. J., HANSSEN, E., TILLEY, L., WALLER, R. F. (2014). The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathogens*, *10*(4), e1004074.

KAUPKE, A., KWIT, E., CHALMERS, R. M., MICHALSKI, M. M., RZEŻUTKA, A. (2014). An outbreak of massive mortality among farm rabbits associated with *Cryptosporidium* infection. *Research in Veterinary Science*, *97*(1), 85-87.

KEELING, P. J. a FAST, N. M. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Reviews in Microbiology*, *56*(1), 93-116.

KOLMODIN, L. A. a BIRCH, D. E. (2002). Polymerase chain reaction: basic principles and routine practice. *PCR Cloning Protocols*, 3-18.

KOTKOVÁ, M., SAK, B., KVÁČ, M. (2018). Differences in the intensity of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II and III-Comparison using quantitative real-time PCR. *Experimental Parasitology, 192*, 93-97.

KOTLER, D. P. a ORENSTEIN, J. M. (1999). Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *The Microsporidia and Microsporidiosis*, 258-292.

KOUDELA, B., KUCEROVA, S., HUDCOVIC, T. (1999). Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitologica*, *46*(3), 171-174.

KVÁČ, M., KESTŘÁNOVÁ, M., PINKOVÁ, M., KVĚTOŇOVÁ, D., KALINOVÁ, J., WAGNEROVÁ, P., VÍTOVEC, J., GEORGE, N. S., SAK, B. (2013). *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology, 191*(3-4), 218-227.

KVÁČ, M., MCEVOY, J., STENGER, B., CLARK, M. (2014). Cryptosporidiosis in other vertebrates. *Cryptosporidium: Parasite and Disease*, 237-323.

KVÁČ, M., TOMANOVÁ, V., SAMKOVÁ, E., KOUBOVÁ, J., KOTKOVÁ, M., HLÁSKOVÁ, L., MODRÝ, D., RYCHLÍK, I., SAK, B. (2016). *Encephalitozoon cuniculi* in raw cow's milk remains infectious after pasteurization. *Foodborne Pathogens and Disease, 13*(2), 77-79.

KVÁČ, M., VLNATÁ, G., JEŽKOVÁ, J., HORČIČKOVÁ, M., KONEČNÝ, R., HLÁSKOVÁ, L., MODRÝ, D., ROMEO, C., SAK, B. (2018). *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *European Journal of Protistology, 63*, 96-104.

KUČERA, O. a KUČEROVÁ, J. (2002). *Zajíc v přírodě a chov v zajetí.* Matice lesnická, Dobové spisky, Písek. ISBN 80-86271-10-2.

LASSER, K. H., LEWIN, K. J., RYNING, F. W. (1979). Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Human Pathology*, *10*(2), 234-240.

LAŠTŮVKA, Z. (2004). *Zoologie pro zemědělce a lesníky.* 3., dopl. vyd. Konvoj, Brno.ISBN 80-7302-065-3.

LEE, J. H. (2008). Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1664–1666.

LEARMONTH, J. J., IONAS, G., EBBETT, K. A., KWAN, E. S. (2004). Genetic characterization and transmission cycles of Cryptosporidium species isolated from humans in New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(7), 3973-3978.

LESAGE, C., JOUET, D., PATRELLE, C., GUITTON, J. S., DECORS, A., FERTÉ, H. (2014). *Protostrongylus pulmonalis* (Frölich, 1802) and *P. oryctolagi* Baboš, 1955 (Nematoda: Protostrongylidae), parasites of the lungs of European hare (*Lepus europaeus* L.) in France: morphological and molecular approaches. *Parasitology Research*, *113*, 2103-2111.

LETKOVÁ, V., KOČIŠOVÁ A., GOLDOVÁ, M. (2010). Základy helmintológie. Košice:Univerzita veterinárského lekárstva a farmácie v Košiciach. ISBN 978-80-8077-220-8.

LEVINE, J. F., LEVY, M. G., WALKER, R. L., CRITTENDEN, S. (1988). Cryptosporidiosis in veterinary students. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *193*(11), 1413-1414.

LI, X., NGUYEN, T., XIAO, C., LEVY, A., AKAGI, Y., SILKIE, S., ATWILL, E. R. (2020). Prevalence and genotypes of cryptosporidium in wildlife populations co-located in a protected watershed in the pacific northwest, 2013 to 2016. *Microorganisms*, *8*(6), 914.

LI, N., XIAO, L., ALDERISIO, K., ELWIN, K., CEBELINSKI, E., CHALMERS, R., CHECKLEY, W., COHEN, S., DALTON, C., HARRISON, L., JOHNSON, D., LAL, A., MACFARLANE, T., MATHEWSON, J., NATHAN, R., RAVIOLA, G., SMITH, H., TANNER, M., ZHOU, L., FENG, Y, (2014). Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases, 20*(2), 217-224.

LV, C., ZHANG L., WANG R., JIAN F., ZHANG S., NING C., WANG H., FENG C., WANG X., REN X., QI M., XIAO L. (2009): *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in China: prevalence and molecular characterization. Applied and Environmental Microbiology 75: 7692–7699.

MATSUBAYASHI, H., KOIKE, T., MIKATA, I., TAKEI, H., HAGIWARA, S. (1959). A case of Encephalitozoon-like body infection in man. *Archives of. Pathoogyl.*, *67*(2), 181-187.

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*(6), 1156-1160.

MELICHEROVÁ, J., ILGOVÁ, J., KVÁČ, M., SAK, B., KOUDELA, B., VALIGUROVÁ, A. (2014). Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology*, *141*(2), 287-303.

MERTIN, D. (2005). *Biologické aspekty chovu nutrie riečnej:(Myocastor coypus)*. Výskumný ústav živočíšnej výroby. ISBN 80-88872-47-2.

MILÁCEK, P. a VÍTOVEC, J. (1985). Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia parasitologica*. 32(1), 50

MOLINA, J.-M., TOURNEUR, M., SARFATI, C., CHEVRET, S., DE GOUVELLO, A., GOBERT, J.-G., BLAKAN, S., DEROUIN, F. (2002). *Fumagillin Treatment of Intestinal Microsporidiosis. New England Journal of Medicine, 346(25), 1963–1969.* doi:10.1056/nejmoa012924

MORGAN, U. M., XIAO, L., HILL, B. D., O'DONOGHUE, P., LIMOR, J., LAL, A., THOMPSON, R. C. A. (2000). Detection of the Cryptosporidium parvum "human" genotype in a dugong (Dugong dugon). *Journal of Parasitology, 86*(6), 1352-1354.

MÜLLER, J. (1841). Über eine eigentümliche krankhafte parasitische Bildung mit spezifisch organisierten Samenkörperchen. *Bericht der Preußischen Akademie der Wissenschaft*, 246-250.

NAGUIB, D., ROELLIG, D. M., ARAFAT, N., XIAO, L. (2021). Genetic characterization of Cryptosporidium cuniculus from rabbits in Egypt. *Pathogens, 10*(6), 775.

NÄGELI, C. (1857). Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen.[Abstract of report before 33. Versamml. Deutsch. Naturf. u. Aerzte. Bonn, 21 Sept.]. *Botanische Zeitung, 15*, 760-761.

NOLAN, M. J., JEX, A. R., HAYDON, S. R., STEVENS, M. A., GASSER, R. B. (2010). Molecular detection of *Cryptosporidium cuniculus* in rabbits in Australia. *Infection, Genetics and Evolution, 10*(8), 1179-1187.

OKHUYSEN, P. C., CHAPPELL, C. L., CRABB, J. H., STERLING, C. R., DUPONT, H. L. (1999). Virulence of three distinct *Cryptospovidium parvum* isolates for healthy adults. *The Journal of Infectious Diseases*, *180*(4), 1275-1281.

OPHOVEN, E. (2011). *Lovná zvěř: biologie, pobytové znaky, lov*. Slovart, Praha. ISBN 978-80-7391-466-0.

ORTIZ, J. J., AYOUB, A., GARGALA, G., CHEGNE, N. L., FAVENNEC, L. (2001). Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. *Alimentary Pharmacology &Therapeutics*, *15*(9), 1409-1415.

PANCIERA, R. J., THOMASSEN, R. W., GARNER, F. M. (1971). Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology, 8*(5-6), 479-484.

PAPÁČEK, M., MATĚNOVÁ, V., MATĚNA, J., SOLDÁN T. (2000). *Zoologie*. 3. upr. vyd. Scientia, Praha. ISBN 80-7183-203-0.

PASTEUR, L. (1870). *Etudes sur la maladie des vers à soie: 2.: Notes et documents* (Vol. 2). Gauthier-Villars.

PÁV, J. (1981) *Choroby lovné zvěře*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha. Lesnictví, myslivost a vodní hospodářství.

PECINA, P. a ČEPICKÁ, A. (1990) *Kapesní atlas chráněných a ohrožených živočichů: pomocná kniha pro biologické zájmové kroužky.* Státní pedagogické nakladatelství, Praha.

PEHRSON, Å. (1983). Caecotrophy in caged mountain hares (*Lepus timidus*). *Journal of Zoology, 199*(4), 563-574.

PLUTZER, J. a KARANIS, P. (2009). Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary Parasitology, 165*(3-4), 187-199.

PREDIGER, J., JEŽKOVÁ, J., HOLUBOVÁ, N., SAK, B., KONEČNÝ, R., ROST, M., ROST, M., McEVOY, J., RAJSKÝ, D., KVÁČ, M. (2021). Cryptosporidium sciurinum n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Eurasian red squirrels (Sciurus vulgaris). *Microorganisms, 9*(10), 2050.

PROCOP, G. W. (2007). Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. *Clinical Infectious Diseases, 45*(Supplement_2), S99-S111.

PULESTON, R. L., MALLAGHAN, C. M., MODHA, D. E., HUNTER, P. R., NGUYEN-VAN-TAM, J. S., REGAN, C. M., RAVELLI, A., CHALMERS, R. M.. (2014). The first recorded outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium cuniculus* (formerly rabbit genotype), following a water quality incident. *Journal of Water and Health*, *12*(1), 41-50.

PUTIGNANI, L. a MENICHELLA, D. (2010). Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, *2010*.

RAMIREZ, N. E., WARD, L. A., SREEVATSAN, S. (2004). A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and infection*, *6*(8), 773-785.

REDUKER, D. W., Speer, C. A., BLIXT, J. A. (1985). Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum*oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy 1. *The Journal of Protozoology*, *32*(4), 708-711.

RENGIFO-HERRERA, C., ORTEGA-MORA, L. M., GÓMEZ-BAUTISTA, M., GARCÍA-MORENO, F. T., GARCÍA-PÁRRAGA, D., CASTRO-URDA, J., PEDRAZA-DÍAZ, S. (2011). Detection and characterization of a Cryptosporidium isolate from a southern elephant seal (Mirounga leonina) from the Antarctic Peninsula. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(4), 1524-1527.

ROBERTSON, L. J., CAMPBELL, A. T., SMITH, H. V. (1993). In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, *106*(1), 13-19.

ROBINSON, G., ELWIN, K., CHALMERS, R. M. (2008). Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(11), 1800.

ROBINSON, G. a CHALMERS, R. M. (2010). The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. *Zoonoses and Public Health*, *57*(7-8), e1-e13.

ROČEK, Z. (2002). *Historie obratlovců: evoluce, fylogeneze, systém*. Academia, Praha. ISBN 80-200-0858-6.

ROSSIGNOL, J. F., HIDALGO, H., FEREGRINO, M., HIGUERA, F., GOMEZ, W. H., ROMERO, J. L., PADIERNA, J., GEYNE, A., AYERS, M. S. (1998). A double-'blind'placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhoea in AIDS patients in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *92*(6), 663-666.

RYAN, M. J., SUNDBERG, J. P., SAUERSCHELL, R. J., TODD JR, K. S. (1986). *Cryptosporidium* in a wild cottontail rabbit (*Sylvilagus floridanus*). Journal of Wildlife Diseases,*22*(2), 267.

RYAN, U. M., MONIS, P., ENEMARK, H. L., SULAIMAN, I., SAMARASINGHE, B., READ, C., BUDDLE, R., ROBERTSON, I., ZHOU, L., THOMSON, R. C A., XIAO, L. (2004). Cryptosporidium suis n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (Sus scrofa). *Journal of Parasitology*, *90*(4), 769-773.

RYŠAVÝ, B. (1989). *Základy parazitologie: vysokoškolská učebnice pro studenty přírodovědecké fakulty*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). ISBN 80-04-20864-9.

SAK, B., VECKOVÁ, T., BRDÍČKOVÁ, K., SMETANA, P., HLÁSKOVÁ, L., KICIA, M., HOLUBOVÁ, N., MCEVOY, J., KVÁČ, M. (2019). Experimental *Encephalitozoon cuniculi* Infection Acquired from Fermented Meat Products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(6), 394–398.

SANTIN, M. a FAYER, R. (2009). *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *56*(1), 34-38.

SHADDUCK J. A. a ORENSTEIN J. M. (1993). Comparative pathology of microsporidiosis. Archives of Pathology & Laboratory Medicine,*117*, 1215-1219.

SHIIBASHI, T., IMAI, T., SATO, Y., ABE, N., YUKAWA, M., NOGAMI, S. (2006). *Cryptosporidium* infection in juvenile pet rabbits. *Journal of Veterinary Medical Science*, *68*(3), 281-282.

SKŘIVAN, M., TŮMOVÁ E., SKŘIVANOVÁ, V. (2007) *Chov králíků a kožešinových zvířat*. 3. vyd., 2. dotisk. Česká zemědělská univerzita, Katedra speciální zootechniky, Praha.ISBN 978-80-213-0955-5.

SLAVIN D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.).Journal of Comparative Pathology, 65: 2662-2270.

SMITH, H. V. a ROSE, J. B. (1998). Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitology Today*, *14*(1), 14-22.

SMITH, N. H., CRON, S., VALDEZ, L. M., CHAPPELL, C. L., WHITE JR, A. C. (1998). Combination drug therapy for cryptosporidiosis in AIDS. *Journal of Infectious Diseases*, *178*(3), 900-903.

SMITH, R. K., VAUGHAN JENNINGS, N., HARRIS, S. (2005). A quantitative analysis of the abundance and demography of European hares *Lepus europaeus* in relation to habitat type, intensity of agriculture and climate. Mammal Review, *35*(1), 1-24
SNOWDEN, K. F., DIDIER, E. S., ORENSTEIN, J. M., SHADDUCK, J. A. (1998). Animal models of human microsporidial infections. *Comparative Medicine*, *48*(6), 589-592.

SLIFKO, T. R., SMITH, H. V., ROSE, J. B. (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, *30*(12-13), 1379-1393.

STENGER, B. L., HORČIČKOVÁ, M., CLARK, M. E., KVÁČ, M., ČONDLOVÁ, Š., KHAN, E., WIDMER, G., XIAO, L., GIDDINGS, C. W., PENNIL, CH., STANKO, M., SAK, B., MCEVOY, J. M. (2018). *Cryptosporidium* infecting wild

cricetid rodents from the subfamilies Arvicolinae and Neotominae. *Parasitology*, *145*(3), 326-334.

SUNNOTEL, O., LOWERY, C. J., MOORE, J. E., DOOLEY, J. S. G., XIAO, L., MILLAR, B. C., ROONEY, P. J., SNELLING, W. J. (2006). *Cryptosporidium*. *Letters in Applied Microbiology*, *43*(1), 7-16.

SVOBODA, M., SENIOR, D. F., DOUBEK, J., KLIMEŠ, J. (2008). *Nemoci psa a kočky*. Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat (ČAVLMZ).

TALABANI, H., SARFATI, C., PILLEBOUT, E., VAN GOOL, T., DEROUIN, F., MENOTTI, J. (2010). Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(7), 2651-2653.

TALAL, A. H., KOTLER, D. P., ORENSTEIN, J. M., WEISS, L. M. (1998). Detection of *Enterocytozoon bieneusi* in fecal specimens by polymerase chain reaction analysis with primers to the small-subunit rRNA. *Clinical Infectious Diseases*, *26*(3), 673-675.

TANG, Y., LI, N., SONG, M., ROELLIG, D. M., FENG, Y., XIAO, L. (2016). Development of a multilocus sequence typing tool for high-resolution subtyping and genetic structure characterization of *Cryptosporidium ubiquitum*. *Infection, Genetics and Evolution*, *45*, 256-261.

TENTER, A. M., BARTA, J. R., BEVERIDGE, I., DUSZYNSKI, D. W., MEHLHORN, H., MORRISON, D. A., ... CONRAD, P. A. (2002). The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal for Parasitology*, *32*(5), 595-616.

TREML, F., PIKULA, J., BANDOUCHOVA, H., HORAKOVA, J. (2007). European brown hare as a potential source of zoonotic agents. *Veterinární medicína*, Praha. 52(10), 451.

TROTZ-WILLIAMS, L. A., JARVIE, B. D., PEREGRINE, A. S., DUFFIELD, T. F., LESLIE, K. E. (2011). Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. *Veterinary Record*, *168*(19), 509-509.

TSOKANA, C. N., SOKOS, C., GIANNAKOPOULOS, A., BIRTSAS, P., VALIAKOS, G., SPYROU, V., ATHANASIOU, L. V., BURRIEL, A. R., BILLINIS, C. (2020). European Brown hare (*Lepus europaeus*) as a source of emerging and re-emerging pathogens of public health importance: A review. *Veterinary Medicine and Science*, *6*(3), 550-564.

TYZZER, E. E. (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *5*(1), 12-13.

TYZZER, E. E. (1910). An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of Medical Research*, *23*(3), 487.

TYZZER, E. E. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a Coccidium. *Archiv für Protistenkunde*, *26*, 394.

VÁVRA, J. (2017). Mikrosporidie: houby, co nevypadají jako houby, aneb Sestry říše Fungi? *Živa, Academia*, *65*(5), 257-261.

VÁVRA, J. a LARSSON, J. I. R. (2014). Structure of microsporidia. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, 1-70.

VECKOVÁ, T., SAK, B., SAMKOVÁ, E., HOLUBOVÁ, N., KICIA, M., ZAJĄCZKOWSKA, Ż., HLÁSKOVÁ, L., KVĚTOŇOVÁ, D., KVÁČ, M. (2021). Raw Goat's Milk, Fresh and Soft Cheeses as a Potential Source of *Encephalitozoon cuniculi*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 18(9), 661–667.

VERHOEF-VERHALLEN, E. (2007). *Divoká zvířata: encyklopedie*. Druhé vydání. Rebo, Čestlice. ISBN 978-80-7234-665-3.

VETTERLING, J. M., TAKEUCHI, A., MADDEN, P. A. (1971). Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. *The Journal of Protozoology*, *18*(2), 248-260.

VÍTOVEC, J., HAMADEJOVÁ, K., LANDOVÁ, L., KVÁČ, M., KVĚTONˇOVÁ, D., SAK, B. (2006). Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre-and post-weaned Pigs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B, 53*(5), 239-243.

VOLF, P. a HORÁK, P. (2007). Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha. ISBN 978-80-7387-008-9

WEBER R., BRYAN R. T., SCHWARTZ D. A., OWEN R. L. (1994). Human microsporidial infections. Clinical Microbiology Reviews. 7: 426–461.

WEISBURGER, W. R., HUTCHEON, D. F., YARDLEY, J. H., ROCHE, J. C., HILLIS, W. D., CHARACHE, P. (1979). Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. *American Journal of Clinical Pathology*, *72*(3), 473-478.

WETZEL, D. M., SCHMIDT, J., KUHLENSCHMIDT, M. S., DUBEY, J. P., SIBLEY, L. D. (2005). Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infection and Immunity*, *73*(9), 5379-5387.

WITTNER, M. a WEISS, L. M. (Eds.). (1999). *The microsporidia and microsporidiosis* (Vol. 2, pp. 71-133). Washington, DC: ASM press.

WOLK D. M., SCHNEIDER S. K., WENGENACK N. L., SLOAN L. M., ROSENBLATT J. E. (2002). Real-time PCR method for detection of Encephalitozoon intestinalis from stool specimens. Journal of Clinical Microbiology. 40: 3922–3928.

WRIGHT, J. H.a CRAIGHEAD, E. M. (1922). Infectious motor paralysis in young rabbits. *The Journal of Experimental Medicine*, *36*(1), 135.

XIAO, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, *124*(1), 80-89.

XIAO, L. a FAYER, R. (2008). Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, *38*(11), 1239-1255.

XIAO, L. a ARYAN, U. M. (2004). Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *17*(5), 483-490.

XIAO, L., ALDERISIO, K., LIMOR, J., ROYER, M., LAL, A. A. (2000). Identification of species and sources of Cryptosporidium oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and environmental microbiology*, *66*(12), 5492-5498.

XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U., UPTON, S. J. (2004). Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical microbiology reviews*, *17*(1), 72-97.

XIAO L., MORGAN U.M., LIMOR J., ESCALANTE A., ARROWOOD M., SHULAW W., THOMPSON R.C., FAYER R., LAL A.A. (1999b): Genetic diversity within Cryptosporidium parvum and related Cryptosporidium species. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3386–3391.

ZACHOVALOVÁ, A. (2005). Mikrobiologie a parazitologie. *Tauferova střední odborná škola Veterinární*, *59*, 65.

ZHANG, W., SHEN, Y., WANG, R., LIU, A., LING, H., LI, Y., CAO, J., ZAHNG, X., SHU, J., ZHANG, L. (2012). *Cryptosporidium cuniculus* and *Giardia duodenalis* in rabbits: genetic diversity and possible zoonotic transmission. *PLoS One*, *7*(2), e31262.

ZHANG, Z., SU, D., MENG, X., LIANG, R., WANG, W., LI, N., GUO, Y., GUO, A., ZHAO, Z., FENG, Y. (2022). Cryptosporidiosis outbreak caused by *Cryptosporidium parvum* subtype IIdA20G1 in neonatal calves. *Transboundary and Emerging Diseases*, *69*(2), 278-285.

ZHU, G., KEITHLY, J. S., PHILIPPE, H. (2000). What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*(4), 1673-1681.

Internetové zdroje

VODŇANSKÝ, M. (2002) *Příčiny úbytku zajíců: co dělat pro zlepšení situace*. [online] Myslivost: Stráž myslivosti [cit. 2023-03-04]. Dostupné z: https://www.myslivost.cz/Casopis-Myslivost/Myslivost/2002/Kveten---2002/PRICINY-UBYTKU-ZAJICU

Seznam obrázků

Obrázek 1: Dva druhy zaječího trusu (www.zverokruh-shop.cz. 2023)…… 13

Obrázek 2. Schéma spory mikrosporidie (Keeling et Fast, 2002)……..23

Obrázek 3. Vývojový cyklus kryptosporidií (Fayer et Xiao, 2007)…….……..31

Obrázek 4. Působnost záchranných stanic pro živočichy v ČR, (www.zvirevnouzi.cz, 2023)……...38

Obrázek 5. Mapa lokalit sběru vzorků, QR kód pro online přístup……38

Obrázek 6. Kladogram fylogenetických vztahů *Cryptosporidium* spp. detekovaných v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidiína základě částečné nukleotidové sekvence genu pro SSU……..47

Obrázek 7. Kladogram fylogenetických vztahů *Cryptosporidium* spp. detekovaných v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro gp60 ……48

Obrázek 8. Kladogram fylogenetických vztahů *Enterocytozoon bieneusi* detekovaných v této práci s ostatními a genotypy *E. bieneusi* na základě úplné nukleotidové sekvence genu pro ITS ……....50

Obrázek 9. Kladogram fylogenetických vztahů *Encephalitozoon* spp. detekovaných v této práci s ostatními a genotypy *Encephalitozoon* spp.na základě úplné nukleotidové sekvence genu pro ITS ……...51

Seznam tabulek

Tabulka 1. Seznam nukleotidových sekvencí primerů a jejich nasedacích teplot použitých v této práci……..……41, 42

Tabulka 2. Seznam primerů a proby použitých v této práci pro RT-PCR kvantifikující *Encephalitozoon* spp. ……..45

Seznam použitých zkratek

dH_2O – deionizovaná voda pro přípravu roztoků

gp60 - 60 kDa glykoprotein

ITS (Internal Transcribed Spacer) – nástroj pro identifikaci organismů dle nekódující sekvence DNA

MAFFT - algoritmus pro porovnávání sekvencí a tvorbu fylogenetických stromů

Mbp - milion párů bází

MKCD - původce multifokální klínovité chronické intersticiální nefritidy

OPG - jednotka pro vyjádření množství oocyst v trusu zvířat

PCR (Polymerase Chain Reaction) - molekulárně biologická metoda, která slouží k amplifikaci specifického segmentu DNA (nebo RNA).