

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Prevalence a diverzita kryptosporidií infikujících
kožešinová zvířata**

Vypracovala: Klára Kellnerová

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

České Budějovice, 2015

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce na téma: **Prevalence a diverzita kryptosporidií infikujících kožešinová zvířata**, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných zemědělskou fakultou) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 15. 4. 2015

.....
Klára Kellnerová

Mé poděkování patří především doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky, trpělivost a vstřícnost, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Také bych dále ráda poděkovala celému kolektivu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i. za jejich ochotnou pomoc a milé jednání. Mé poděkování patří též všem chovatelům, kteří mi poskytli možnost odebrat u nich vzorky.

Tato práce byla finančně podpořena z projektu GAČR 15-01090S (řešitel doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

ABSTRACT

Cílem této práce bylo vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikujících kožešinová zvířata, konkrétně u norka amerického, lišky stříbrné a činčily vlnaté. Celkem bylo vyšetřeno 370 vzorků trusu pocházejících od 340 norků amerických, 18 lišek stříbrných a 12 činčil vlnatých. Zatímco mikroskopické vyšetření všech vzorků trusu neprokázalo přítomnost oocyst kryptosporidií, pomocí molekulárních metod amplifikujících malou ribozomální podjednotku rRNA a 60kDa glykoprotein kryptosporidií byly detekovány 3 pozitivní norci. Následné fylogenetické analýzy prokázaly přítomnost *C. ubiquitum* XIIa1 subtypu, který byl u masožravců popsán vůbec poprvé. Nebyla zjištěna korelace mezi kryptosporidiovými infekcemi a průjmovým onemocněním.

KLÍČOVÁ SLOVA: *Cryptosporidium*; norci; lišky; činčily; mikroskopie; PCR

SUMMARY

The object of this thesis was evaluation of occurrence and prevalence of *Cryptosporidium* infection in fur animals, mainly American mink, fox and chinchilla. A total 370 individual specimens originated from mink (n = 340), fox (n = 18) and chinchilla (n = 12) were collected. While microscopy examination did not proved any presence of *Cryptosporidium* oocyst in fecal samples, molecular tolls based on amplification of small ribosomal subunit and 60 kDa glycoprotein of *Cryptosporidium* revealed three positive samples in minks. Following phylogeny analyses of both loci showed presence of *C. ubiquitum* of the XIIa1 family subtype in all positive samples. The XIIa1 family subtype was detected in Carnivores for the first time. No correlation between *Cryptosporidium* infection and presence of diarrhea was observed in this thesis.

KEY WORDS: *Cryptosporidium*; minks; foxes; chinchillas; microscopy; PCR

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární přehled	9
2.1. Historie kryptosporidií.....	9
2.2. Taxonomie kryptosporidií	9
2.3. Vývojový cyklus.....	10
2.4. Přenos infekce	12
2.5. Kryptosporidióza	12
2.6. Terapie.....	14
2.7. Kryptosporidie a kryptosporidióza kožešinových zvířat	14
2.7.1. Lišky.....	14
2.7.2. Norci a kuny	15
2.7.3. Fretky	15
2.7.4. Nutrie.....	15
2.7.5. Činčily.....	15
2.7.6. Králíci.....	16
2.8. Chov kožešinových zvířat	16
2.8.1. Technologie chovu kožešinových zvířat.....	16
3. Cíle	18
4. Materiál a metodika	19
4.1. Charakteristika sledovaných chovů.....	19
4.2. Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření	19
4.3. Vyšetření vzorků trusu na přítomnost kryptosporidií.....	19
4.4. Barvení oocyst anilin carbol methyl violetí (Miláček et Vítovec 1985)	19
4.5. Izolace DNA.....	20
4.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	21
4.7. Gelová elektroforéza	23
4.8. Sekvenování	23
4.9. Genotypizace a fylogenetické analýzy	24
5. Výsledky a diskuze.....	25
5.1. Výskyt a prevalence	25
5.2. Genotypizace	26
5.3. Zoonotický potenciál detekovaných kryptosporidií	26

5.4. Klinické příznaky	26
6. Závěr	29
7. Literatura	30

1. Úvod

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou jedni z několika parazitických prvoků patřících do kmene Apicomplexa. Tito prvoci jsou obligátní intracelulární paraziti infikující široké spektrum obratlovců, včetně člověka (Ziegler et al. 2007). Zástupci rodu *Cryptosporidium* infikují převážně epiteliální buňky gastrointestinálního traktu, ale také dýchací cesty. U imunodeficitních jedinců mohou infikovat i další sliznice (Wang et al. 2014).

Kryptosporidie jsou jedním z nejvýznamnějších parazitárních původců způsobujících průjemová onemocnění u lidí na světě, patří mezi čtyři nejčastější příčiny středních až těžkých průjemových onemocnění u dětí v rozvojových zemích a představují významné nebezpečí pro HIV pozitivní pacienty (Parsons et al. 2015)

Oocysty jsou hostiteli do prostředí vylučovány plně infekční, jsou velmi odolné a zůstávají infekce schopné po velmi dlouhou dobu. Kryptosporidie mohou být na vnímavé hostitele přenášeny buď přímým kontaktem nebo nepřímo prostřednictvím konzumace kontaminované potravy nebo vody (Ziegler et al. 2007).

V současné době je kryptosporidiím a jimi vyvolané kryptosporidióze čím dále častěji věnována větší pozornost v průmyslově vyspělých zemích, zatímco v mnoha rozvojových zemích, kde způsobují nezávažnější problémy, jsou opomíjeny (Eibach et al. 2015).

Kromě lidské kryptosporidiózy, která je z pochopitelných důvodů nejčastěji v zájmu vědeckých a lékařských týmů, představují infekce vyvolané těmito parazity u hospodářsky významných zvířat nemalý problém (Gatei et al. 2003; Katsumata et al. 2000; McGuigan 2005).

Kožešinová zvířata, jež jsou velmi často chována na farmách pro svoji srst, představují významný zdroj kožešin pro kožedělný průmysl. Stejně jako ostatní zvířata jsou kožešinová zvířata hostiteli celé řady parazitů, včetně kryptosporidií.

Vzhledem k tomu, že není v současné době mnoho zpráv o výskytu a prevalenci kryptosporidií u kožešinových zvířat je tato práce věnována právě této problematice.

2. Literární přehled

2.1. Historie kryptosporidií

Zástupci rodu *Cryptosporidium* byli poprvé zjištěny v žaludcích pitvaných myší Tyzzerem v roce 1907 (Tyzzer 1907). Ernest Edward Tyzzer pojmenoval rod *Cryptosporidium* a popsal nalezený druh jako *Cryptosporidium muris*. Později publikoval podrobnější popis životního cyklu, včetně nákresů a mikrofotografií, a poznamenal, že pozoroval podobné organismy připojené k epitelu tenkého střeva u králíků (Tyzzer 1910, 1912). Všiml si podobných fází jako ve střevě myši a pojmenoval druh *C. parvum*. Tento druh se však lišil, protože infikoval tenké střevo, nikoliv žaludek, a protože oocysty byly menší (Fayer 2010; Tyzzer 1912).

Až do počátku 80. let 20. století nebyly kryptosporidie považovány za významné patogeny. Zájem o tyto parazity se zvýšil po prvních prokazatelných kryptosporidiových infekcích lidí (Lasser et al. 1979; Nime et al. 1976; Weisburger et al. 1979) a následně se dramaticky zvýšil po masivní epidemii v důsledku kontaminace pitné vody v Milwaukee (Wisconsin, USA) v roce 1993, kdy bylo postiženo více než 400 000 osob (Mac Kenzie et al. 1994) a s nástupem pandemie AIDS se kryptosporidie ukázaly jako život ohrožující patogeny HIV pozitivních osob (Dillingham et al. 2002). Tyto události odstartovaly intenzivní výzkum, který trvá až do dnešních dnů.

2.2. Taxonomie kryptosporidií

Rod *Cryptosporidium* je jednou z bazálních linií kmene Apicomplexa. Dříve byly na základě vývojového cyklu řazeny mezi kokcidie (Fayer et al. 1997). Nicméně na základě fylogenetických analýz genu kódujícího malou ribozomální podjednotku rRNA (SSU rDNA) jsou kryptosporidie dnes považovány za příbuzné gregarinám (Carreno et al. 1999) s nimiž je spojuje společná nepřítomnost plastidového genomu (Zhu et al. 2000) a antigenní příbuznost (Bull et al. 1998).

V současné době je uznáno celkem 27 platných druhů kryptosporidií (tabulka 1) a dále je známa celá řada genotypů, jež se od sebe liší nejen na molekulární úrovni, ale i hostitelskou specifitou (Xiao et Fayer 2008; Kváč et al. 2013a). Je více než pravděpodobné, že většina genotypů bude v budoucnu popsána jako samostatné druhy.

Tabulka 1. Seznam platných druhů *Cryptosporidium*

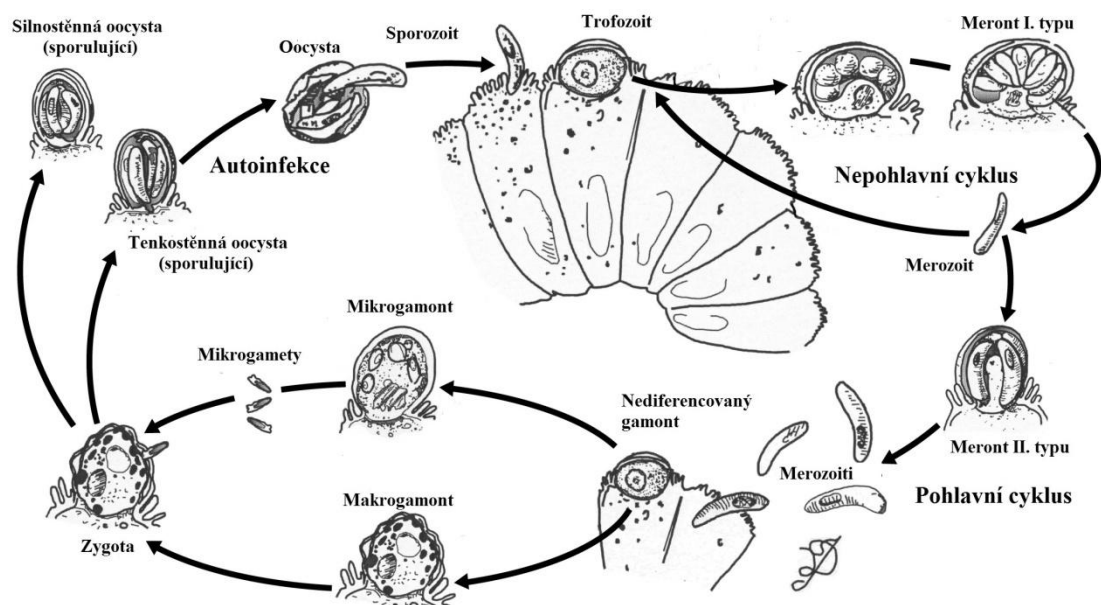
Druh	Lokalizace	Hostitel	Reference
<i>C. andersoni</i>	slez	skot	Lindsay et al. 2000
<i>C. baileyi</i>	bursa Fabricii	drůbež	Current et al. 1986
<i>C. bovis</i>	tenké střevo	skot	Fayer et al. 2005
<i>C. canis</i>	tenké střevo	psi	Fayer et al. 2001
<i>C. cuniculus</i>	střevo	králík	Robinson et al. 2010
<i>C. erinacei</i>	střevo	ježek	Kváč et al. 2014
<i>C. fayeri</i>	střevo	klokani	Ryan et al. 2008
<i>C. felis</i>	tenké střevo	kočky	Iseki 1989
<i>C. fragile</i>	žaludek	obojživelníci	Jirků et al. 2008
<i>C. galli</i>	žláznatý žaludek	ptáci	Ryan et al. 2003
<i>C. hominis</i>	tenké střevo	člověk	Morgan-Ryan et al. 2002
<i>C. huwi</i>	žaludek	ryby	Ryan et al. 2015
<i>C. macropodum</i>	střevo	klokani	Power a Ryan 2008
<i>C. meleagridis</i>	tenké střevo	krocan	Sréter et al. 2000
<i>C. molnari</i>	žaludek, tenké střevo	ryby	Alvarez-Pellitero a Sitjá-Bobadilla 2002
<i>C. muris</i>	žaludek	hlodavci	Tyzzer 1910
<i>C. parvum</i>	tenké střevo	savci	Tyzzer 1912
<i>C. ryanae</i>	střevo	skot	Fayer et al. 2008
<i>C. scrofarum</i>	střevo	prasata	Kváč et al. 2013
<i>C. serpentis</i>	žaludek	plazi	Levine 1980
<i>C. suis</i>	tlusté střevo	prasata	Ryan et al. 2004
<i>C. tyzzeri</i>	tenké střevo	myš	Ren et al. 2012
<i>C. ubiquitum</i>	střevo	ovce, kozy	Li et al. 2014
<i>C. varanii</i>	střevo	plazi	Pavlásek a Ryan 2008
<i>C. viatorum</i>	střevo	člověk	Elwin et al. 2012
<i>C. wrairi</i>	tenké střevo	morčata	Vetterling et al. 1971
<i>C. xiaoi</i>	střevo	ovce	Fayer et al. 2009

2.3. Vývojový cyklus

Životní cyklus kryptosporidií je monoxenní, tedy dokončují svůj cyklus pouze v jednom hostiteli v obdobných fázích jako například kokcidie rodu *Eimeria* a *Isospora*. Oocysty obsahující čtyři infekční sporozoity jsou nejčastěji vylučovány stolicí, respektive trusem infikovaných hostitelů (Xiao et Fayer 2008). Excystace z požitých oocyst se spouští podmínkami ve střevě, případně v žaludku a dochází k uvolnění pohyblivých sporozoitů, kteří aktivně napadnou epiteliální buňky gastrointestinálního traktu. V případě extraintestinálních infekcí i epiteliální buňky jiných sliznic. Sporozoiti jsou připojeni na buňku a obklopeny mikroklky, čímž se

nezanořují do cytoplazmy, ale zůstávají uloženy epiplazmaticky v parazitoformním saku (PS) (Chalmers et Davies 2010). Předpokládá se, že membrána PS chrání parazita před imunitním systémem hostitele a extracelulární prostředí umožňuje jeho vývoj (Carey et al. 2003). Následuje asexuální cyklus, zahrnující diferenciaci na trofozoity, meronta I. typu dělicího se na 6-8 merozoitů I. typu. Uvolnění merozoiti I. typu infikují sousední epitelové buňky, a buď se vyvinou do trofozoitů a asexuální cyklus se opakuje nebo do merontů II. typu. Meront II. typu produkuje čtyři merozoity, kteří přecházejí do sexuální části cyklu. Merozoiti II. typu se mění na makrogamonty a mikrogamonty. Mikrogamonti se stanou mnohojadernými a uvolní volné mikrogamety do lumen a oplodní makrogamety za vzniku zygoty. Následuje meióza, kdy se v zygotě diferencují čtyři sporozoiti. Oocysty sporulují *in situ* a jsou plně infekční ihned po vyloučení z těla hostitele (obrázek 1; Carey et al. 2003). Je možná infekce i v dalších místech ústrojí, jako žaludeční epitel, žlučovod, játra, slinivka břišní a dýchací ústrojí (Chalmers et Davies 2010).

Obrázek 1. Schématické znázornění životního cyklu kryptosporidií (<http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>, upraveno).



2.4. Přenos infekce

Oocysty jsou nejčastěji přenášeny fekálně-orální cestou prostřednictvím přímého kontaktu s infikovaným hostitelem, a nepřímé kontaminace potravin a vody. Byly hlášeny případy přenosu z člověka na člověka mezi členy rodiny, sexuálními partnery, dětmi ve školkách a pacienty nemocnic (Current et Garcia 1991; Koch et al. 1985; Xiao 2010).

Epidemiologické studie potvrdily zoonotický přenos zahrnující domácí zvířata, hospodářská zvířata, a náhodné infekce veterinárních pracovníků (Gait et al. 2008; Grinberg et al. 2011; Robertson et al. 2006). Potravinu pěstované v půdě a hnojené hnojem by mohly být považovány za možný zdroj nákazy, nicméně, kontaminovaná voda představuje hlavní zdroj infekce pro člověka, neboť oocysty kryptosporidií mohou zůstat životaschopné ve vodě po dobu více než 140 dní, a jsou velmi odolné vůči většině běžných dezinfekčních prostředků (Ramirez et al. 2004). V USA byl parazit identifikován v 80-97 % všech povrchových vod (řeky, jezera, rybníky, atd). Studie ukázaly, že až 97 % z povrchových vod a 54 % z upravovaných (filtrovaných a chlorovaných) vod obsahují malý počet oocyst kryptosporidií (LeChevallier et al. 1991a,b).

2.5. Kryptosporidióza

Kryptosporidióza je klinické onemocnění vyvolané kryptosporidiiemi projevující se obvykle jako gastroenteritida. Příznaky a projevy závisí na místě infekce, nutričním a imunitním stavu hostitele (Chalmers et Davies 2010). Obvykle mezi příznaky patří vodnaté průjmy s různou závažností, křeče v břiše, ztráta chuti k jídlu, nevolnost, zvracení a zvýšená tělesná teplota (Ng-Hublin et al. 2013). Příležitostně mohou být pozorovány i respirační poruchy (Wang et al. 2014). Průjem obvykle spontánně vymizí (Segura 2015). Kryptosporidióza může přejít do chronické fáze a ohrozit život v případě nepřítomnosti kompetentní imunitní odpovědi (Rašková et al. 2012). Na rozdíl od řady kryptosporidiových infekcí zvířat, postihuje kryptosporidióza lidí všechny věkové skupiny, nicméně nejčastěji se vyskytuje u dětí a imunosuprimované populace (Segura 2015).

U imunokompetentních osob může onemocnění trvat několik dní až týdnů a je eliminováno buněčnou imunitní odpovědí (Hunter et al. 2004). Pro děti mladší 5 let,

starší osoby, nebo osoby s oslabeným imunitním systémem, může nemoc být chronická, vysilující a může vést k těžké dehydrataci a podvýživě.

Většina lidských infekcí je způsobena dvěma druhy - *C. hominis* a *C. parvum*. V menší míře jsou lidé infikováni druhy *C. meleagridis*, *C. felis* a *C. canis* (Ng-Hublin et al. 2013). Ostatní druhy a genotypy kryptosporidií byly detekovány jen v ojedinělých případech (tabulka 2). Kryptosporidióza většiny lidí je nejčastěji způsobena jediným druhem, nicméně smíšené infekce nejsou neobvyklé (Rašková et al. 2012).

Tabulka 2. Seznam kryptosporidií infekčních pro člověka (Ortega et Kváč 2013)

Druh/genotyp	Riziko pro člověka	Hlavní zdroj infekce
<i>C. hominis</i>	vysoké	člověk
<i>C. parvum</i>	vysoké	skot, člověk
<i>C. canis</i>	střední	pes
<i>C. felis</i>	střední	kočka
<i>C. meleagridis</i>	střední	ptáci
<i>C. viatorum</i>	střední/vysoké	člověk
<i>C. andersoni</i>	nízké	skot
<i>C. cuniculus</i>	nízké	člověk
<i>C. erinacei</i>	nízké	ježek
<i>C. fayeri</i>	nízké	klokan
<i>C. muris</i>	nízké	hlodavci
<i>C. scrofarum</i>	nízké	prase
<i>C. suis</i>	nízké	prase
<i>C. tyzzeri</i>	nízké	hlodavci
<i>C. ubiquitum</i>	nízké	skot, hlodavci
<i>C. wrairi</i>	nízké	morče
chipmunk genotype	nízké	zemní veverka
horse genotype	nízké	kůň
monkey genotype	nízké	opice
skunk genotype	nízké	skunk

2.6. Terapie

Hlavním problémem týkající se kryptosporidiózy je nedostatek účinného prostředku pro prevenci a léčbu této nemoci. Vzhledem k tomu, že jsou oocysty vysoce odolné proti vlivům okolního prostředí a mnohým dezinfekčním prostředkům, hygienická opatření samy o sobě obvykle nestačí spolehlivě eliminovat oocysty tak, aby se zabránilo infekci (Xiao et al. 2006).

Bylo testováno více jak 200 látek proti kryptosporidióze. Některé vykazují slibné účinky, ale žádný z nich nebyl schopen trvale snížit klinické příznaky nebo zcela eliminovat infekci. Nicméně použití některých léků může snížit vylučování oocyst. Terapie zahrnuje antikryptosporidiální látky, imunizaci a podpůrnou léčbu (Shahiduzzaman et Dauschies 2012).

2.7. Kryptosporidie a kryptosporidióza kožešinových zvířat

Významná kožešinová, farmově chovaná zvířata můžeme rozdělit do dvou základních skupin, a to na **i)** masožravá kožešinová zvířata (liška obecná, liška stříbrná, liška polární, norek a fretka) a **ii)** býložravá kožešinová zvířata (nutrie, činčila a králíci). Vyjma výše uvedených zvířat je pro kožešinu loveno velké množství volně žijících savců.

2.7.1. Lišky

Kryptosporidie byly detekovány u dvou rodů pravých lišek: *Vulpes* a *Urocyon*. Většina dosud publikovaných popisů je založena na mikroskopické detekci oocyst v trusu nebo na přítomnosti protilátek v krvi odstřelených lišek. Current (1989) popsal výskyt *Cryptosporidium* sp. u lišky šedé (*U. cinereoargenteus*) v USA. Na Slovensku byla zjištěna 38,7 % (24/62) prevalence u lišek obecných (*V. vulpes*) (Ravaszová et al. 2012), nicméně nebyla provedena genotypizace. Nagano et al. (2007) popsal výskyt druhu *C. parvum* u 2 lišek v Irsku, celková prevalence v této studii byla pouze 8,1 %. Obdobně nízký výskyt kryptosporidií u lišek obecných byl zaznamenán v Norsku a v Anglii, kde bylo *Cryptosporidium* sp. detekováno u 2,2 % (6/269), respektive 8,7 % (2/23) lišek (Hamnes et al. 2007; Sturdee et al. 1999). *Cryptosporidium canis* a *Cryptosporidium* muskrat genotype I byly identifikovány u blíže nespecifikovaných lišek v Marylandu, USA (Zhou et al. 2004).

2.7.2. Norci a kuny

První záznam o výskytu kryptosporidií u kuny skalní (*Martes foina*) pochází z roku 1999. Rademacher et al. (1999) našli oocysty kryptosporidií o velikosti 3-5 µm u kuny chované v zajetí trpící průjmami. U hranostajů (*Mustela erminea*) v USA byly detekovány smíšené infekce *Cryptosporidium* shrew genotype (známé také jako W5 genotype) a W18 genotype (Feng et al. 2007) a *Cryptosporidium* sp. (Ziegler et al. 2007a).

Co se týká norků, oocysty o velikosti 4,5-5,5 µm byly popsány z 24,2 % (8/33) v zajetí chovaných norků amerických (*Mustela vison*) ve Španělsku. Molekulární analýzy prokázaly přítomnost genotypu blízkého příbuzného *Cryptosporidium ferret* genotype (Gómez-Couso et al. 2007). V Číně byl u farmově chovaných norků amerických nalezen nový genotyp: *Cryptosporidium* mink genotype (Wang et al. 2008).

2.7.3. Fretky

Rehg et al. (1988) popsal subklinické kryptosporidiové infekce u 40 % fretek chovaných ve výzkumném zařízení v Tennessee, USA. Následné studie prokázaly, že různé druhy fretek mohou být hostiteli kryptosporidií. *Cryptosporidium ferret* genotype byl detekován u tchoře černonohého (*Mustela nigripes*) a fretky domácí (*Mustela putorius furo*) v USA a Japonsku (Abe et Iseki 2003; Sulaiman et al. 2000; Xiao et al. 1999).

V roce 1985 publikovali Gómez-Villamandos et al. (1985) případy fatální kryptosporidiózy fretek spojené s anorexií, depresemi a průjmami. Zvířata hynula během 48-72 hodin po nástupu klinických příznaků. Bohužel, přesný původce (druh kryptosporidie) nebyl určen.

2.7.4. Nutrie

Jediná dosud publikovaná zpráva o výskytu kryptosporidií pochází z roku 2003, kdy bylo *Cryptosporidium* sp. detekováno u nutrie říční (*Myocastor coypus*) (Ryan et al. 2003)

2.7.5. Činčily

Činčily patří spolu s morčaty a kapybarami mezi první hlodavce, kteří kolonizovali Jižní Ameriku před více než 40 miliony let (Antoine et al. 2012).

Přestože jsou činčily velmi často využívány jako kožešinová zvířata, byly kryptosporidie u činčily vlnité (*Chinchilla laniger*) popsány pouze jedenkrát (Yamini et Raju 1986).

2.7.6. Králíci

Králíci jsou hlavními hostiteli zoonotického druhu *C. cuniculus*. Nicméně přenos z farmově chovaných králíků na člověka nebyl nikdy prokázán (Smith et al 2010).

Tento druh představuje jediného zástupce rodu *Cryptosporidium*, který byl nalezen u králíků v Austrálii a Číně (Nolan et al. 2010, 2013; Shi et al. 2010; Zhang et al. 2012).

2.8. Chov kožešinových zvířat

Jedná se o faremní chov zvířat, chovaných především či výhradně pro produkci kožešiny.

Dominujícím farmářsky chovaným zvířetem je norek, neboť poptávka po kožkách z tohoto zvířete je značně vysoká (Skřivan et al. 1976).

2.8.1. Technologie chovu kožešinových zvířat

Na kožešinových farmách se využívá klecový chov zvířat, neboť omezuje možnost znečištění srsti. Klece se budují ze samonosného, tzv. bodovaného pletiva (obrázek 2).

Klece jsou umístěny dnem asi 50-60 cm nad zemí. Mezi dvěma nosníky kolny je 6-7 klecí, obvykle připevněných na železném prutu, zavěšeném na bočním opěrném železe nosníku. Ke kolnému sloupu modulů jsou navařeny nosníky, na něž jsou uloženy na dřevěných hranolech budníky, do kterých jsou vestavena sítěná hnízda z hustého pletiva. Mezi jednotlivými klecemi jsou 5-7 cm mezery bránící při poměrně velkých okách klecí vzájemnému pokousání zvířat (Skřivan et al. 1976).

Dle vyhlášky č. 208/2004 Sb. o minimálních standardech pro ochranu hospodářských zvířat se stanovují pro faremně chovaná kožešinová zvířata následující parametry klecí bez budníku.

Pro farmový chov norků

- jedno dospělé zvíře plocha 2550 cm²
- jedna samice s mláďaty do odstavu 2550 cm²
- mláďata po odstavu – pro 2 ks 2550 cm²
- minimální výška klece 45 cm

Pro farmový chov lišek

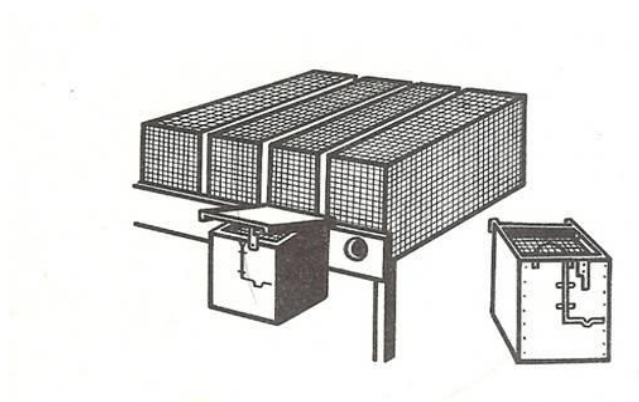
- jedno dospělé zvíře plocha 8000 cm²
- jedna samice s mláďaty do odstavu 20000 cm²
- mláďata po odstavu – pro 2 ks 12000 cm²
- minimální výška klece 70 cm

Pro farmový chov činčil

- jedno dospělé zvíře plocha 5000 cm²
- jedna samice s mláďaty do odstavu 5000 cm²
- mládě po odstavu 3330 cm²
- minimální výška klece 100 cm

Obrázek 2. Klec pro norky

(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=198).



3. Cíle

- Vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikujících kožeshinová zvířata, konkrétně u norka amerického, lišky stříbrné a činčily vlnaté.
- Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp kryptosporidií.
- Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů kryptosporidií.
- V případě silných infekcí popsat morfologii a morfometrii oocyst kryptosporidií.

4. Materiál a metodika

4.1. Charakteristika sledovaných chovů

Vzorky trusu byly odebrány v období roku 2014, převážně na kožešinových farmách. Kromě vzorků trusu norka amerického a lišek stříbrných chovaných na farmách, byly odebrány vzorky činčil vlnatých od soukromého chovatele. S ohledem na přání chovatelů bude v této práci zachována anonymita chovatelů a jednotlivé farmy budou uváděny pod čísly.

4.2. Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření

Odběr trusu na kožešinových farmách byl prováděn ze země pod klecemi zvířat. U soukromého chovatele činčil se sbíral čerstvě vyloučený trus v klecích zvířat. Vyloučené exkrementy se potom jednorázově sbíraly do plastových kelímků. Kelímky byly opatřeny unikátním kódem a následně byly uskladněny v chladu při teplotě + 4 až +8 °C.

4.3. Vyšetření vzorků trusu na přítomnost kryptosporidií

Všechny získané vzorky byly mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií pomocí specifického barvení (kapitola 4.4) a molekulárními metodami na přítomnost specifické DNA kryptosporidií (kapitoly 4.5.-4.9).

4.4. Barvení oocyst anilin carbol methyl violetí (Miláček et Vítovec 1985)

Zásobní roztoky

- Roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti; 1 ml anilinu; 1 g fenolu; 30 ml 96 % alkoholu; 70 ml dH₂O).
- Roztok tartrazinu (1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové).
- 2% kyselina sírová.

Pracovní postup

- Špejlí rozetřít vzorek trusu na podložní sklíčko a fixovat metanolem v plameni.
- Vzorek barvit roztokem methylvioleti po dobu 30 minut.
- Opláchnout pod tekoucí vodou.

- Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 2 minut.
- Opláchnout pod tekoucí vodou.
- Dobarvit roztokem tartrazinu po dobu 1-2 minut.
- Opláchnout pod tekoucí vodou.
- Nechat uschnou při laboratorní teplotě a následně prohlédnout mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Výsledek

Oocysty se barví modrofialově na žlutooranžovém pozadí. Preparáty byly vyšetřeny mikroskopem OLYMPUS BX51 při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

4.5. Izolace DNA

Izolace byla provedena pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex).

Součásti kitu

- Proteinase K lyofilizát: rozpustit přidáním 1,5 ml deionizované PCR vody. Po rozpuštění skladovat při -20°C.
- Elution Buffer: odpipetovat do ependorfy (200 µl/1 vzorek) a inkubovat předem při 70°C.
- Lysis Buffer P.
- Binding Buffer A: naředit přidáním 21 ml 98% isopropanolu.
- Promývací pufry Wash I a Wash II.
- Kolony se sběrnými zkumavkami.
- InviAdsorb zkumavky.

Pracovní postup

- Vzorek trusu (200-400 mg) dát do Safe-Lock-Tube, přidat skleněné zirkonové kuličky o průměru 0,5 mm a 0,8-1,2 ml Lysis Buffer P, zhomogenizovat a rozbít 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s Fast Prepem (Fast Prep 24 Instrument, MP Bio);
- Inkubovat v termobloku 10 minut při 95°C, protřepat během inkubace.

- Centrifugovat 1 minutu při 11 000 g.
- Supernatant přenést do InviAdsorb-Tube, zvortexovat, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě a následně centrifugovat 3 minuty při 13 400 g.
- Supernatant přenést do čistých 1,5 ml ependorfek, centrifugovat 3 minuty při 13 400 g.
- Do čistých ependorfek napipetovat 25 µl Proteinase K a 400 µl supernatantu, zvortexovat.
- Inkubovat v termobloku 10 minut při 70°C, protřepat během inkubace.
- Připipetovat 200 µl Binding Buffer A, zvortexovat.
- Přenést veškerý objem do Spin Filter + Tube (kolona se sběrnou mikrozkuvkou), inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a poté centrifugovat 1 minutu při 11 000 g.
- Vylít odpad z ependorfek, napipetovat 500 µl Wash I a centrifugovat 1 minutu při 11 000 g.
- Vylít odpad z ependorfek, napipetovat 700 µl Wash II a centrifugovat 1 minutu při 11 000 g.
- Vylít odpad a opět centrifugovat 4 minuty při 13 400 g.
- Kolonu dát na čistou ependorfku, napipetovat 200 µl předehřátého Elution Buffer D na kolonu, inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 11 000 g.
- Skladovat v mrazicím boxu při teplotě -20°C.

4.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost specifické DNA kryptosporidií byla testována pomocí nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou ribosomální podjednotku rRNA (Jiang et al. 2005) a 60kDA glykoprotein (Li et al. 2014).

DNA byla amplifikována v termocykleru za použití programu:

- Počáteční denaturace po dobu 3 minuty při 94 °C;
- 35 cyklů zahrnující denuraci 45 s při 94 °C;
- nasedací teploty primerů – tabulka 4
- extenze 60 s při 72 °C;
- finální extenze 7 minut při 72 °C.

Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 2 µl primárního PCR produktu. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *C. parvum* a *C. ubiquitum* subtyp XIId (vzorek pocházející z přirozeně infikovaného jelena). Reakční směs PCR protokolu je uvedena v tabulce 3 a sety primerů pro amplifikaci v tabulce 4.

Tabulka 3. Reakční směs primární a sekundární reakce pro PCR protokol pro amplifikaci části genu kódující malou ribozomální podjednotku *Cryptosporidium* spp.

PRIMÁRNÍ REAKCE			SEKUNDÁRNÍ REAKCE		
	Koncentrace	Objem (µl)		Koncentrace	Objem (µl)
H₂O	-----	12,70	H₂O	-----	13,10
MgCl₂	3 mM	1,20	MgCl₂	3 mM	1,20
10× buffer	-----	2,00	10× buffer	-----	2,00
dNTP	200 nM	0,40	dNTP	200 nM	0,40
Forward	200 mM	0,40	Forward	10 µM	0,40
Reverse	200 mM	0,40	Reverse	200 mM	0,40
BSA	10 mg/ml	0,40	-----	-----	
Taq	1U	0,50	Taq	1U	0,50
DNA	-----	2,00	DNA	-----	2,00
SUM	-----	20,00	SUM	-----	20,00

Tabulka 4. Sety primerů pro amplifikaci genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU) *Cryptosporidium* spp. a 60kDA glykoprotein (GP60) *C. ubiquitum*

SSU	
Primární reakce	55 °C
F1	TTCTAGAGCTAATACATGCG
R1	CCCATTTCCTTCGAAACAGGA
Sekundární reakce	55 °C
F2	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG
R2	CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA
GP60	
Primární reakce	58 °C
F1	TTTACCCACACATCTGTAGCGTCG-
R1	ACGGACGGAATGATGTATCTGA
Sekundární reakce	55 °C
F2	ATAGGTGATAATTAGTCAGTCTTTAAT
R2	CCAAAAGCGGCTGAGTCAGCATC

4.7. Gelová elektroforéza

Výsledný sekundární PCR produkt byl detekován na 1% agarózovém gelu s přídatkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (302 nm) transiluminátorem (Ultra-Lum Inc, USA) a dokumentován (High Performance UV Transilluminator, Biotech, ČR).

Chemikálie

50× TAE pufr (242 g tris báze, 47,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA, pH=8,00).

- Agaróza.
- Ethidium bromid.
- 100 bp DNA ladder.

Pracovní postup

- Smíchat agarózu s TAE pufrem.
- Nechat rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit na teplotu cca 50 °C pod tekoucí vodou.
- Přidat ethidium-bromid, promíchat.
- Do formy nalít gel, vložit hřeben a nechat ztuhnout.
- Po ztuhnutí vyjmout hřeben a vložit gel do elektroforetické vany s TAE pufrem.
- Vyjmout hřeben a do 1. jamky pipetovat 5 µl Ladder, do ostatních 18 µl produktu sekundární PCR.
- Spustit elektroforézu při napětí 80 V na dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA.
- Vizualizovat DNA fragmenty za pomoci UV transiluminátoru.

4.8. Sekvenování

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů v komerčních laboratořích.

4.9. Genotypizace a fylogenetické analýzy

Nukleotidové sekvence získané v této studii byly analyzovány programem Chromas Pro (www.technilysium.com.au/chromas.html) a alignovány pomocí programů ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/SlustalIX/>) a BioEdit se sekvencemi uloženými v databázi GenBank. Metodou Neighbor-Joining byly vypočteny fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií. Byl použit dvouparametrový distanční model dle Kimury. Na základě 1000 opakování byl získán bootstrapový konsenzus výsledných stromů. Ke konstrukci fylogenetických stromů byl použit program MEGA 6.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Výskyt a prevalence

Celkem bylo vyšetřeno 370 vzorků trusu pocházejících od norků amerických (n = 340), lišek stříbrných (n = 18) a činčil vlnitých (n = 12) (tabulka 5).

Mikroskopické vyšetření neprokázalo přítomnost oocyst kryptosporidií v žádném z testovaných vzorků. Molekulárními metodami byla prokázána přítomnost specifické DNA kryptosporidií u 3 norků v chovu 5 (tabulka 5).

U činčil nebyli v této práci detekováni žádní pozitivní jedinci. Vzhledem k tomu, že v případě činčil byl uveřejněn pouze jediný nález kryptosporidií ve světě (Yamini et Raju 1986) a další studie nebyly provedeny, nelze na základě našich výsledků vyslovit žádné zobecňující závěry.

Taktéž nebyly nalezeny žádné pozitivní vzorky pocházející od farmově chovaných lišek. Přestože lišky jsou hostitelé minimálně dvou různých kryptosporidií (Zhou et al. 2004), všechny dosud popsané nálezy pocházejí od divoce žijících lišek. Obdobně jako u činčil, nelze na základě naší prvotní studie vyslovit žádný zobecňující závěr.

Celková prevalence kryptosporidiových infekcí u norků v této práci (méně než 1 %) je výrazně nižší ve srovnání s výskytem kryptosporidií u farmově chovaných norků ve Španělsku, kde byla detekována 24,2% prevalence (Gómez-Couso et al. 2007).

Tabulka 5. Počet odebraných a pozitivních vzorků na jednotlivých farmách

Farma	Norek americký		Liška stříbrná		Činčila vlnatá	
	mikroskopicky pozitivní/ vyšetřené	PCR pozitivní/ vyšetřené	mikroskopicky pozitivní/ vyšetřené	PCR pozitivní/ vyšetřené	mikroskopicky pozitivní/ vyšetřené	PCR pozitivní/ vyšetřené
1	0/20	0/20	–	–	–	–
2	0/170	0/170	0/7	0/7	–	–
3	0/50	0/50	–	–	–	–
4	0/50	0/50	–	–	–	–
5	0/50	3/50	0/10	0/10	–	–
6	–	–	0/1	0/1	–	–
7	–	–	–	–	0/12	0/12
Celkem	0/340	3/340	0/18	0/18	0/12	0/12

5.2. Genotypizace

Specifická DNA kryptosporidií genu kódujícího malou ribozomální podjednotku rRNA byla úspěšně amplifikována u 3 vzorků z 370 vyšetřených. Sekvenční analýzy s následnými fylogenetickými analýzami prokázaly přítomnost *Cryptosporidium ubiquitum* ve všech pozitivních vzorcích. Námi získané sekvence byly 100 % identické se sekvencí *C. ubiquitum* (EF362479) dříve známé také jako *Cryptosporidium cervine* genotype 1 (obrázek 3). Tento druh kryptosporidie byl v minulosti detekován u celé řady savčích hostitelů zahrnující člověka, ovce, kozy, yaky, barasingy, impaly, koně, mývaly, bobry, zemní a stromové veverka, myšice, sviště nebo dikobrazy (Fayer et al. 2010; Li et al. 2014). Vzhledem k hostitelské nespecifitě *C. ubiquitum* není nález u norků překvapivý.

Následná subtypizace *C. ubiquitum* na genu kódujícím gp60 byla úspěšná ve dvou ze tří pozitivních vzorků. Fylogenetická analýza prokázala příslušnost obou úspěšně amplifikovaných izolátů k alelické rodině „XIIa“ (obrázek 4). Podle studie Li et al. (2014) lze zástupce alelické rodiny XIIa dále rozdělit do subtypů 1-3. Naše izoláty spadají do skupiny 1. Tento subtyp byl dříve nalezen u ovcí v Jižní a Severní Americe, Číně a divokých přežvýkavců v Zoologických zahradách (Li et al. 2014). Detekce této alelické rodiny u norků je vůbec prvním nálezem u masožravců. Jediným dosud známým hostitelem *C. ubiquitum* z řádu masožravců je mýval, která však byl infikován *C. ubiquitum* XIIId.

5.3. Zoonotický potenciál detekovaných kryptosporidií

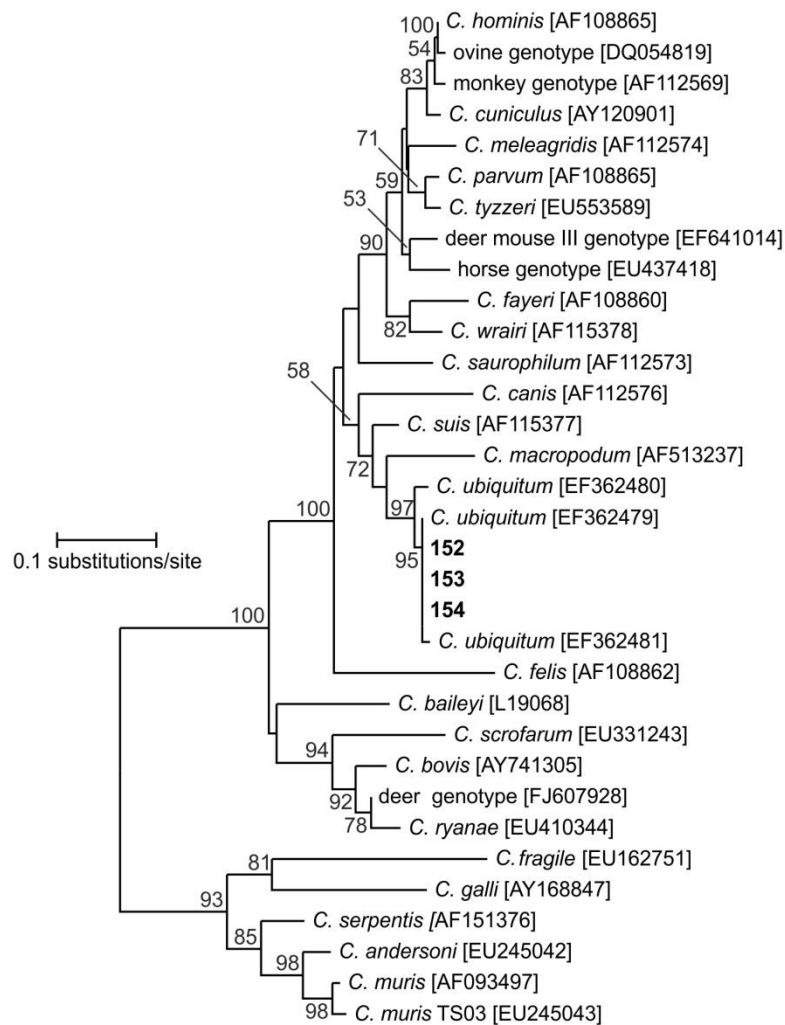
Cryptosporidium ubiquitum je považováno za druh infekční pro člověka (Fayer et al. 2010). Na základě subtypizace byly u lidí detekovány subtypy XIIb, XIIc a XIIId (Li et al. 2014). Námi detekovaný subtyp XIIa byl považován za specifický pro přežvýkavce, ale v této studii popsáný nález u norků výrazně posouvá naše znalosti o hostitelské specifitě jednotlivých subtypů. Není tedy vyloučeno, že v budoucnu bude u lidí detekován subtyp XIIa, zejména pak u osob pracujících v blízkém kontaktu s domácími a volně žijícími přežvýkavci.

5.4. Klinické příznaky

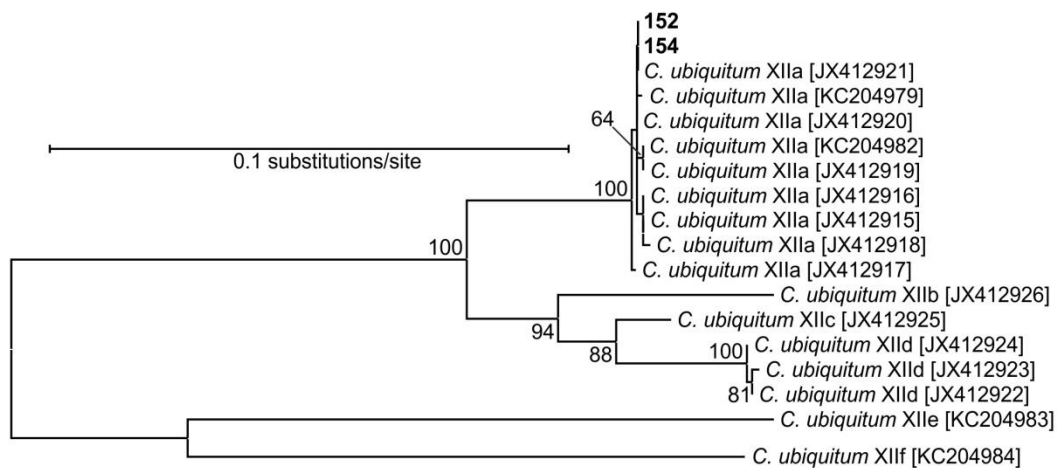
Z celkového počtu 340 vzorků pocházejících od norků byl zaznamenán průjem u 28,8 % (n = 98) zvířat. U 36 zvířat s průjmy byl navíc detekován hlen a krev v trusu.

Na rozdíl od statisticky průkazné korelace mezi infekcí *C. ubiquitum* a průjmy u farmově chovaných přežvýkavců čeledi Cervidae a Caprinae (Robertson et al. 2014), žádné ze zvířat pozitivní na přítomnost kryptosporidie *C. ubiquitum* netrpělo průjmem, ani jinými klinickými příznaky charakteristickými pro kryptosporidiové infekce. Krom výše uvedeného, u lišek a činčil nebyly průjmy zaznamenány.

Rozdíly v průběhu infekcí vyvolané *C. ubiquitum* mohou být ovlivněny hostitelem. Negativní výsledky mikroskopické detekce ukazují na velmi nízkou intenzitu infekce, což je v souladu s výsledky Skerrett et Holland (2001), kteří detekovali bezpříznakové infekce u jelenů.



Obrázek 3: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z norků s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU), vytvořený metodou neighbor-joining (1000× bootstrap). Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny.



Obrázek 4: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z norků s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu 60kDa glykoprotein, vytvořený metodou neighbor-joining (1000× bootstrap). Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny.

6. Závěr

- Byla detekována velmi nízká prevalence kryptosporidií u norků amerických.
- Byly nalezeny 3 případy infekce *C. ubiquitum* u norků amerických.
- Izoláty *C. ubiquitum* náležely do stejné glykoproteinové rodiny XII, subtypu „a“.
- Nebyl pozorován vztah mezi kryptosporidiovými infekcemi vyvolanými *C. ubiquitum* a klinickým onemocněním norků.

7. Literatura

- Abe N., Iseki M. (2003):** Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from ferrets in Japan. *Parasitology Research*, 89: 422–424.
- Alvarez-Pellietro P., Sitja-Bobadilla A. (2002):** *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*, 32: 1007–1021.
- Antoine P.O., Marivaux L., Croft D.A., Billet G., Ganerod M., Jaramillo C., Martin T., Orliac M.J., Tejada J., Altamirano A.J., Duranthon F., Fanjat G., Rousse S., Gismondi R.S. (2012):** Middle Eocene rodents from Peruvian Amazonia reveal the pattern and timing of caviomorph origins and biogeography. *Proceedings Biological Sciences*, 279: 1319–1326.
- Bull S., Chalmers R., Sturdee A.P., Curry A., Kennaugh J. (1998):** Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Veterinary Parasitology*, 77: 195–197.
- Carey C.M., Lee H., Trevors J.T. (2003):** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, 38: 818–862.
- Carreno R.A., Martin 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.
- Current W.L. (1989):** *Cryptosporidium* spp. In: Genta RM, Walzer PD (Eds.) *Parasitic infections in the compromised host*. Marcel Dekker, New York, pp 281–341.
- Current W.L., Garcia L.S. (1991):** Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 325–358.
- 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: 289–296.

- Dillingham Rebecca A., Lima Aldo A., Guerrant Richard L. (2002):** Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 4: 1059–1066.
- Eibach D., Krumkamp R., Al-Emran H.M., Sarpong N., Hagen R.M., Adu-Sarkodie Y., Tannich E., May J. (2015):** Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. among Children in Rural Ghana. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9: e0003551. [oi:10.1371/journal.pntd.0003551](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003551).
- Elwin K., Hadfield S.J., Robinson G., Crouch N.D., Chalmers R.M. (2012):** *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *International Journal for Parasitology*, 42: 675–682.
- Fayer R. (1997):** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, CRC Press, Boca Raton, FL, 270 pp.
- Fayer R. (2010):** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124: 90–97.
- Fayer R., Santín M. (2009):** *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, 164: 192–200.
- Fayer R., Santín M., Macarisin D. (2010):** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, 172: 23–32.
- Fayer R., Santín M., Trout J.M. (2008):** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156: 191-198.
- Fayer R., Santín M., Xiao L. (2005):** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology*, 91: 624–629.
- Fayer R., Trout J.M., Xiao L., Morgan U.M., Lai A.A., Dubey J.P. (2001):** *Cryptosporidium canis* n. sp. From domestic dogs. *Journal of Parasitology*, 87: 1415–1422.
- Feng Y., Ortega Y., He G., Das P., Xu M., Zhang X., Fayer R., Gatei W., Cama V., Xiao L. (2007):** Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology*, 144: 1–9.
- Gait R., Soutar R.H., Hanson M., Fraser C., Chalmers R. (2008):** Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. *Veterinary Record*, 162: 843–845.

- Gatei W., Greensill J., Ashford R.W., Cuevas L.E., Parry C.M., Cunliffe N.A., Beeching N.J., Hart C.A. (2003):** Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1458–1462.
- Gómez-Couso H., Méndez-Hermida F., Ares-Mazas E. (2007):** First report of *Cryptosporidium parvum* ‘ferret’ genotype in American mink (*Mustela vison* Shreber 1777). *Parasitology Research*, 100: 877–879.
- Gómez-Villamandos J.C., Carrasco L., Mozos E., Herva’s J. (1995):** Fatal Cryptosporidiosis in Ferrets (*Mustela putorius furo*): a morphopathologic study. *The Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 26: 539–544.
- Grinberg A., Pomroy W.E., Squires R.A., Scuffham A., Pita A., Kwan E. (2011):** Retrospective cohort study of an outbreak of cryptosporidiosis caused by a rare *Cryptosporidium parvum* subgenotype. *Epidemiology and Infections*, 139: 1542–1550.
- Hannes I.S., Gjerde B.K., Forberg T., Robertson L.J. (2007):** Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Veterinary Parasitology*, 144: 222–233.
- <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html> - staženo dne: 10.3.2015.
- Hunter P.R., Hughes S., Woodhouse S., Raj N., Syed Q., Chalmers R.M., Verlander N.Q., Goodacre J. (2004):** Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 504–510.
- Chalmers R.M., Davies A.P. (2010):** Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124: 138–146.
- Iseki M., Maekawa T., Moriya K., Uni S., Takada S. (1989):** Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitology Research*, 75: 218–222.
- Jiang J., Alderisio K.A., Singh A., Xiao L. (2005):** Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 1135–1141.

- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Krřízek J., Modrý D., Šlapeta J. (2008):** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*, 55: 81–94.
- Katsumata T., Hosea D., Ranuh I.G., Uga S., Yanagi T., Kohno S. (2000):** Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 62: 70–72.
- Koch K.L., Phillips D.J., Aber R.C., Current W.L. (1985):** Cryptosporidiosis in hospital personnel. *Annals of Internal Medicine*, 102: 593.
- Kváč M., Kestránová M., Pinková M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B. (2013a):** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology*, 191: 218–227.
- Kváč M., McEvoy J., Loudová M., Stenger B., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Rašková V., Moriarty E., Rost M., Macholán M., Piálek J. (2013b):** Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *International Journal for Parasitology*, 43: 805–817.
- Kváč M., Saková K., Květoňová D., Kicia M., Weselovska M., McEvoy J., Sak B. (2014):** Gastroenteritis caused by the *Cryptosporidium* hedgehog genotype in a immunocompetent man. *Journal of Clinical Microbiology*, 52: 347–349.
- Lasser K.H., Lewin K.J., Rynning F.W. (1979):** Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Human Pathology*, 10: 234–240.
- LeChevallier M.W., Norton W.D., Lee R.G. (1991a):** Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Applied Environmental Microbiology*, 57: 2610–2616.
- LeChevallier M.W., Norton W.D., Lee R.G. (1991b):** *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. *Applied Environmental Microbiology*, 57: 2617–2621.
- Levine N.D. (1980):** Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology*, 66: 830–834.
- Li N., Xiao L., Alderisio K., Elwin K., Cebelinski E., Chalmers R., Santín M., Fayer R., Kváč M., Ryan U., Sak B., Stanko M., Guo Y., Wang L., Zhang L., Cai J., Roelling D., Feng Y. (2014):** Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a

- Zoonotic Pathogen Emerging in Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 20: 217–224.
- Lindsay D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R., Blagburn B.L. (2000):** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47: 91–95.
- MacKenzie W.R., Hoxie N.J., Proctor M.E., Gradus M.S., Blair K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addiss D.G., Fox K.R., Rose J.B., Davis J.P. (1994):** A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, 331: 161–167.
- McGuigan C. (2005):** *Cryptosporidium* outbreak after a visit to a wildlife centre in northeast Scotland: 62 confirmed cases. *EuroSurveillance*, 10: E050428.2.
- Morgan-Ryan U.M., Fall A., Ward L.A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R.C., Olson M., Lal A., Xiao L. (2002):** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49: 433–440.
- Ng-Hublin J.S.Y., Combs B., MacKenzie B., Ryana U. (2013):** Human Cryptosporidiosis Diagnosed in Western Australia: a Mixed Infection with *Cryptosporidium meleagridis*, the *Cryptosporidium* Mink Genotype, and an Unknown *Cryptosporidium* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7):2463–5.
- Nime F.A., Burek J.D., Page D.L., Holscher M.A., Yardley J.H. (1976):** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70: 592–598.
- 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*, 10:1179–1187.
- Nolan M.J., Jex A.R., Koehler A.V., Haydon S.R., Stevens M.A., Gasser R.B. (2013):** Molecular-based investigation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from animals in water catchments in Southeastern Australia. *Water Research*, 47: 1726–1740.

- Ortega Y. R., Kváč M. (2013):** Foodborne protozoa. In: Labbé R. G. and García S. (Eds.): Guide to Foodborne Pathogens, Second Edition. John Wiley&Sons, Ltd. Chapter 19, 330–316.
- Parsons M.B., Travis D., Lonsdorf E.V., Lipende I., Roellig D.M.A., Kamenya S., Zhang H., Xiao L., Gillespie T.R. (2015):** Epidemiology and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Humans, Wild Primates, and Domesticated Animals in the Greater Gombe Ecosystem, Tanzania. PLoS Neglected Tropical Diseases, 10: e0003529.
- Pavlásek I., Ryan U. (2008):** *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. Experimental Parasitology, 118: 434–437.
- Power M.L., Ryan U.M. (2008):** A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropul giganteus*). Journal of Parasitology, 94: 1114–1117.
- Rademacher U., Jakob W., Bockhardt I. (1999):** *Cryptosporidium* infection in beech martens (*Martes foina*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 30: 421–422.
- Ramirez N.E., Ward L.A., Srinand S.S. (2004):** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microbes and Infection, 6: 773–785.
- Rašková V., Květoňová D., Sak B., McEvoy J., Edwinson A., Stenger B., Kváč M. (2012):** Human Cryptosporidiosis Caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* Isolates Presumably Transmitted from Wild Mice. Journal of Clinical Microbiology, 51: 360–362.
- Rehg J.E., Gigliotti F., Stokes D.C. (1988):** Cryptosporidiosis in ferrets. Laboratory Animal Science, 38: 155–158.
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning C., Jian F., Wang R., Lv C., Wang Q., Arrowood M.J., Xiao L. (2012):** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). Experimental Parasitology, 130: 274–281.
- Robertson L., Gjerde B., Forberg T., Haugejorden G., Kielland C. (2006):** A small outbreak of human cryptosporidiosis associated with calves at a dairy farm in Norway. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 23: 810–813.

- Robertson L.J., Björkman C., Axén C., Fayer R. (2014):** Cryptosporidiosis in Farmed Animals, In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.) *Cryptosporidium*: parasite and disease. Springer, pp. 149–236.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S.J., Katzer F., Bartley P.M., Hunter P.R., Nath M., Innes E.A., Chalmers R.M. (2010):** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, 40: 1539–1548.
- Ryan U.M., Monis P., Enemark H.L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R.C., Xiao L. (2004):** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*, 90: 769–773.
- Ryan U.M., Papparini A., Tonq K., Yanq R., Gibson-Kueh S., O'Hara A., Lymbery A., Xiao L. (2015):** *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*, 150: 31–35.
- Ryan U.M., Power M., Xiao L. (2008):** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal of Eucaryotic Microbiology*, 55: 22–26.
- Ryan U.M., Xiao L., Read C., Sulaiman I.M., Monis P., Lal A.A., Fayer R., Pavlasek I. (2003):** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology*, 89: 809–813.
- Segura R., Prim N., Montemayor M., Valls M.E., Muñoz C. (2015):** Predominant Virulent IbA10G2 Subtype of *Cryptosporidium hominis* in Human Isolates in Barcelona: A Five-Year Study. *PLoS One*, 10: e0121753.
- Shahiduzzaman Md., Dauschies A. (2012):** Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Veterinary Parasitology*, 188: 203–214.
- Shi K., Jian F., Lv C., Ning C., Zhang L., Ren X., Dearen T.K., Li N., Qi M., Xiao L. (2010):** Prevalence, genetic characteristics, and zoonotic potential of *Cryptosporidium* species causing infections in farm rabbits in China. *J Clin Microbiol* 48: 3263–3266.

- Skerrett H.E., Holland C.V. (2001):** Asymptomatic shedding of *Cryptosporidium* oocysts by red deer hinds and calves. *Veterinary Parasitology*, 94: 239–246.
- Skřivan M., Erlebach A., Faltus J., Hanák J., Kukla F., Mouka J., Stejskal J., Uhlířová Z. (1976):** Chov kožešinových zvířat, Vydalo Státní zemědělské nakladatelství v Praze, 313 s.
- Smith R.P., Chalmers R.M., Mueller-Doblies D., Clifton-Hadley F.A., Elwin K., Watkins J., Paiba G.A., Hadfield S.J., Giles M. (2010):** Investigation of farms linked to human patients with cryptosporidiosis in England and Wales. *Preventive Veterinary Medicine*, 94: 9–17.
- Sréter T., Kovács G., da Silva A.J., Pieniazek N.J., Széll Z., Dobos-Kovács M., Márialigeti K., Varga I. (2000):** Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 735–738.
- Sturdee A.P., Chalmers R.M., Bull S.A. (1999):** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Veterinary Parasitology*, 80: 273–280.
- Sulaiman I.M., Morgan U.M., Thompson R.C., Lal A.A., Xiao L. (2000):** Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2385–2391.
- Tyzzar E.E. (1907):** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 5: 12–13.
- Tyzzar 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: 394–414.
- Tyzzar E.E. (1912):** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde*, 26: 394–412.
- Vetterling J.M., Takeuchi A., Madden P.A. (1971):** Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. *The Journal of Protozoology*, 18: 248–260.

- Wang L., Xue X., Li J., Zhou Q., Yu Y., Du A. (2014):** Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. *Parasite*, 21: 36.
- Wang R., Zhang L., Ning C., Feng Y., Jian F., Xiao L., Lu B., Ai W., Dong H. (2008):** Multilocus phylogenetic analysis of *Cryptosporidium andersoni* (Apicomplexa) isolated from a bactrian camel (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasitology Research*, 102: 915–920.
- 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: 473–478.
- Xiao L. (2010):** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124: 80–89.
- Xiao L., Fayer R. (2008):** Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38: 1239–1255.
- Xiao L., Limor J.R., Li L., Morgan U., Thompson R.C., Lal A.A. (1999):** Presence of heterogeneous copies of the small subunit rRNA gene in *Cryptosporidium parvum* human and marsupial genotypes and *Cryptosporidium felis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46: 44–45S.
- Xiao, L., Alderisio K., Jiang J. (2006):** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: effect of the number of samples and analytic replicates on test results. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5942–5947.
- Yamini B., Raju N.R. (1986):** Gastroenteritis associated with a *Cryptosporidium* sp. in a chinchilla. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 189: 1158–1159.
- Zhang W., Shen Y., Wang R., Liu A., Ling H., Li Y., Cao J., Zhang X., Shu J., Zhang L. (2012):** *Cryptosporidium cuniculus* and *Giardia duodenalis* in rabbits: genetic diversity and possible zoonotic transmission. *PLoS One*, 7: e31262.

- Zhou L., Kassa H., Tischler M.L., Xiao L. (2004):** Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). Applied and Environmental Microbiology, 70: 4211–4215.
- Zhou L., Fayer R., Trout J.M., Ryan U.M., Schaefer F.W., 3rd and Xiao L. (2004):** Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. Applied and Environmental Microbiology, 70: 7574–7577.
- Zhu G., Keithly J.S., Philippe H. (2000):** What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50: 1673–1681.
- Ziegler P.E., Wade S.E., Schaaf S.L., Chang Y.F., Mohammed H.O. (2007):** *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York City watershed. Journal of Wildlife Disease, 43: 586–596.