

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA**  
**Zemědělská fakulta v Českých Budějovicích**

Katedra biologických disciplín

Studijní program: Zemědělská specializace  
Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Bakalářská práce:

**Vnímavost prasat k různým druhům a genotypům  
kryptosporidií**

Vypracovala:

**Michaela Kestránová**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: „**Vnímavost prasat k různým druhům a genotypům kryptosporidií**“ vypracovala na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

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

**V Českých Budějovicích dne**

.....

**Michaela Kestránová**

Ráda bych tímto poděkovala doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady, a trpělivost při zpracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům laboratoře veterinární a humánní protistologie jmenovitě RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. a RNDr. Daně Květoňové za vytvoření skvělé atmosféry a veškerou pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za veškerou pomoc a podporu.

Tato studie byla finančně podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LH11061) a grantovou agenturou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (022/2010/Z). Izoláty z divokých myší byly získány v rámci projektu Grantové agentury České republiky (206/08/0640).

## **Abstrakt:**

Prasata ve věku 3-4 a 8 týdnů věku (tři zvířata v každé skupině) byla per orálně infikována *Cryptosporidium muris*, *C. tyzerri*, *C. suis* a *Cryptosporidium pig* genotype II dávkou  $1 \times 10^7$  oocyst / zvíře. Prasata inokulovaná druhem *C. tyzerri* nebo *C. muris* nevykazovala žádné klinické příznaky onemocnění a v průběhu 30 dní po infekci nebyla zjištěna žádná infekce zmíněnými druhy. Během pitvy nebyly zjištěny žádné makroskopické změny na vnitřních orgánech. Vývojová stádia kryptosporidií nebyla v gastrointestinálním traktu detekována ani histologickými a PCR metodami. Infektivita těchto izolátů byla ověřena na SCID myších, které začaly vylučovat oocysty od 4 do 8 DPI. Experimentální infekce prokázaly vnímavost obou věkových kategorií prasat k druhu *C. suis*. Zatímco parazitologické, molekulárně genetické a histologické vyšetření prokázalo vnímavost 8 týdenních prasat k infekci *Cryptosporidium pig* genotype II, 4 týdenní selata nebyla k této infekci vnímavá. Vývojová stádia obou kryptosporidií, *C. suis* *Cryptosporidium pig* genotype II, byla detekována jak v tenkém, tak i tlustém střevě. Na základě našich zjištění můžeme konstatovat, že prasata nejsou vnímavá k infekci *C. tyzerri* a *C. muris*, druh *C. suis* není věkově specifický a *Cryptosporidium pig* genotype II není infekční pro selata před odstavem.

**Klíčová slova:** Prasata; *Cryptosporidium*; Experimentální infekce; Věková specifita

## **Summary:**

Three-four and 8 week old pigs (three animals per isolate) were inoculated with *Cryptosporidium muris*, *C. tyzerri*, *C. suis* and *Cryptosporidium pig* genotype II at a dose of  $1 \times 10^7$  oocysts per animal. Pigs inoculated with *C. muris* or *C. tyzerri* showed no detectable infection and no clinical symptoms of cryptosporidiosis during 30 days post infection (DPI), and no macroscopic changes were detected in the digestive tract after necropsy. Any developmental stages were detected in gastrointestinal tract tissue neither by histology nor PCR throughout the duration of the experiment. The infectivity of these isolates was verified on SCID mice, in which oocysts shedding started from 4 to 8 DPI. Experimental infection revealed susceptibility of both 4 and 8 week old pigs to *C. suis*. While parasitological, molecular and histology examination confirmed susceptibility of 8 week old pigs to

*Cryptosporidium* pig genotype II, 4 week old pigs were not being infected with this genotype. Both *C. suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II were detected in small and large intestine. Based on our findings, it can be concluded that pigs are not susceptible to *C. muris* or *C. tyzzeri* infection, *C. suis* does not have age specificity and *Cryptosporidium* pig genotype II is not infectious for pre-weaned pigs.

**Key words:** Pigs; *Cryptosporidium* spp.; Experimental infection; Age specificity

## OBSAH

<b>1. Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Cíle</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Literární přehled</b> .....	<b>10</b>
3.1. Historie .....	10
3.2. Systematika .....	11
3.3. Vývojový cyklus kryptosporidií.....	11
3.4. Přenos kryptosporidií .....	13
3.5. Určení a diagnostika.....	13
3.6. Druhy a genotypy kryptosporidií prasat .....	13
3.6.1. Specifické druhy kryptosporidií infikující prasata .....	14
3.6.1.1. <i>Cryptosporidium</i> pig genotypII.....	14
3.6.1.2. <i>Cryptosporidium suis</i> .....	14
3.6.2. Nеспецифické druhy kryptosporidií infikující prasata .....	15
3.6.2.1. <i>Cryptosporidium muris</i> .....	15
3.6.2.2. <i>Cryptosporidium tyzzeri</i> .....	16
3.6.2.3. <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	16
3.6.2.4. <i>Cryptosporidium meleagridis</i> .....	17
3.6.2.5. <i>Cryptosporidium hominis</i> .....	17
<b>4. Materiál a metodiky</b> .....	<b>19</b>
4.1. Paraziti .....	19
4.2. Hostitelé .....	19
4.3. Chov zvířat.....	19
4.4. Purifikace oocyst pro experimentární infekce .....	19
4.4.1. Sacharózový gradient .....	20
4.4.2. Cesium chloridový gradient .....	21
4.5. Design experimentálních infekcí .....	21
4.6. Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření.....	21
4.7. Barvení nátěru trusu dle Miláčka a Vítovce .....	22
4.8. Izolace DNA .....	23
4.9. Molekulární detekce kryptosporidií.....	24
4.9.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	24
4.9.2. Sekvence .....	25
4.9.3. Fylogenetická analýza .....	26
4.10. Histologické vyšetření .....	26
4.10.1. <i>Cryptosporidium</i> imunofluorescenční test.....	26
<b>5. Výsledky</b> .....	<b>28</b>

5.1. Infektivita a patogenita <i>Cryptosporidium tyzzeri</i> a <i>Cryptosporidium muris</i> pro 3-4 a 8 týdenní selata.....	29
5.2. Infektivita a patogenita <i>Cryptosporidium</i> pig genotype II pro 3-4 a 8 týdenní selata .....	29
5.3. Infektivita a patogenita <i>Cryptosporidium suis</i> pro 3-4 a 8 týdenní selata .....	31
<b>6. Diskuse .....</b>	<b>32</b>
<b>7. Závěry .....</b>	<b>34</b>
<b>8. Přehled použité literatury.....</b>	<b>35</b>
<b>9. Uplatnění výsledků .....</b>	<b>47</b>





## 1. ÚVOD

Poprvé byly kryptosporidie popsány E. E. Tyzzerem v roce 1907, který našel tyto prvky ve sliznici žaludku laboratorních myší (*Mus musculus*) (Tyzzer 1907).

V současné době existuje 28 uznaných druhů rodu *Cryptosporidium* (Fayer a kol. 2000; Morgan a kol. 2000; Carreno a kol. 2001, Šlapeta 2012), které se vyskytují po celém světě (Johnson a kol. 2008) a infikují široký okruh obratlovců (Beach 2008) zahrnující ryby (Hoover a kol. 1981), obojživelníky, plazy (Levine 1980; Jirků a kol. 2008), ptáky (Slavin 1955) a savce včetně člověka (Meisel a kol. 1976; Nime a kol. 1976). Kryptosporidie infikují gastrointestinální trakt (Jeníková a kol. 2011) a v některých případech orgány dýchacího a vylučovacího aparátu (Goodstein a kol. 1989). Onemocnění způsobené těmito parazity se nazývá kryptosporidióza a patří mezi oportunní infekce a zoonózy. Patogenita zástupců rodu *Cryptosporidium* se liší podle druhů a souvisí s věkem a imunitním systémem hostitele. Infikovaní jedinci vykazují široké spektrum klinických příznaků. Nejčastěji se kryptosporidióza projevuje jako průjemové onemocnění spojené s dehydratací a úbytkem hmotnosti (Xiao a kol. 2004b).

Infikovaní hostitelé vylučují infekční oocysty ve výkalech, ale na rozdíl od cyst giardií jsou oocysty vylučovány nepřetržitě a můžou být uvolňovány po celou dobu patentní periody (Jeníková a kol. 2011).

## 2. CÍLE

Cílem této bakalářské práce je:

- Na základě experimentálních infekcí různých věkových kategorií prasat (3 a 8 týdnů) vyhodnotit vnímavost k *C. muris*, *C. tyzzeri*, *Cryptosporidium* pig genotype II a *C. suis*.
- Srovnat výsledky s předchozími publikacemi a pracemi

## 3.LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1. HISTORIE

Ernest Edward Tyzzer byl první který rozpoznal, jasně popsal a zveřejnil zprávu o parazitech často se nacházejících v buňkách žaludečního epitelu myší (Tyzzer 1907). V roce 1910 popsal parazita podrobněji a navrhol jako *Cryptosporidium* jako nový rod a *C. muris* jako typový druh (Tyzzer 1910).

V roce 1912 Tyzzer popsal další nový druh jako *Cryptosporidium parvum* a prokázal že *C. parvum* se vyvíjí pouze v tenkém střevě experimentálně infikovaných myší a že oocysty *C. parvum* byly menší než *C. muris* (Tyzzer 1912).

Jiné druhy kryptosporidií byly pojmenovány podle hostitelské specifičnosti. Například oocysty nalezené v trusu ovcí byly pojmenovány *Cryptosporidium agni* (Barker a Carbonell 1974), jiné ve výkalech člověka byly pojmenovány *Cryptosporidium garnhami* (Bird 1981) nebo *Cryptosporidium enteritis* (Qadripur a Kloze 1985). Nicméně tyto a několik dalších popisů druhů postrádaly taxonomické údaje, které by je jasně rozlišovaly. Proto se staly neplatnými.

Zájem o kryptosporidie zůstával nízký až do počátku 70. let 20 století kdy bylo zjištěno, že kryptosporidie byly spojeny s průjmovým onemocněním u skotu (Panciera a kol. 1971; Meutin a kol. 1974). V roce 1976, byly popsány první dva případy kryptosporidiózy u lidí. U 3-leté dívky a 39-letého imunosuprimovaného pacienta. U obou případů pacienti popisovali těžké vodnaté průjmy. Diagnostika byla provedena pomocí mikroskopického vyšetření a střevní biopsie (Nime a kol. 1976; Meisel a kol. 1976). Třetí případ nákazy člověka byl hlášen u 9-letého chlapce s vrozenou hypogamaglobulinémií (Lasser a kol. 1979) Čtvrtý případ byl hlášen v roce 1970, u 52-letého pacienta, s IgA deficitem, sníženou imunitou a po transplantaci ledvin (Weisburger a kol. 1979).

Mezi roky 1970 až 1990 se v literatuře objevily zprávy o 159 případech kryptosporidiózy u imunokompetentních pacientů a 71 případů u imunodeficitních pacientů (Casemore a kol. 1985). Jasná souvislost mezi skotem a infekcí lidí byla prokázána ve 26 případech, ale přenos ze zvířete na člověka nebyl prokázán v žádném ze 71 případů u imunodeficitních pacientů (Casemore a Jackson 1984). V roce 1980 bylo již zveřejněno téměř 1200 zpráv o výskytu kryptosporidií. Tento nárůst následoval v roce 1982, zpráva z Centra pro kontrolu nemocí (CDC) v USA,

popisující 21 mužů s AIDS (syndrom získaného selhaní imunity), kteří měli závažné vleklé průjmy způsobené parazity rodu *Cryptosporidium*. (Anonymous 1982).

V roce 1993 zájem opět dramaticky vzrostl v souvislosti s masivní infekcí z vody v Milwaukee (Wisconsin, USA), při níž bylo nakaženo dle odhadů více než 403,000 osob (MacKenzie a kol. 1994). V tehdejší Československu byl výskyt kryptosporidií vůbec poprvé zaznamenán u dvou nuceně poražených 14-ti denních býčků v jižních Čechách v roce 1979 (Pavlásek 1981).

### 3.2. SYSTEMATIKA

Všichni zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou jednobuněční intracelulární paraziti. Kryptosporidie jsou eukaryotičtí prvoci, což znamená, že většina jejich DNA je uložena v jádře, které je obklopené dvojitou membránou. Rod *Cryptosporidium* je jedním z více než 300 rodů, které zahrnují 4800 pojmenovaných druhů z kmene Apicomplexa, který je pojmenován podle tzv. apikálního komplexu, což je soubor organel na předním konci zoitů. Dříve byly kryptosporidie řazeny k rodu *Eimeria*, ale molekulární analýzy prokázaly užší vztah k gregarinám (Carreno a kol. 1999).

### 3.3. VÝVOJOVÝ CYKLUS KRYPTOSPORIDIÍ

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

Kryptosporidiové infekce ve většině případů probíhají v gastrointestinálním traktu (Guselle a kol. 2003). Parazit se však může vyvíjet také v orgánech dýchacího a vylučovacího aparátu (Goodstein a kol. 1989), v játrech, pankreatu a žlučníku (Kahn a kol. 1987; Hinnant a kol. 1989). Životní cyklus kryptosporidií je monoxenní a je rozdělen do čtyř hlavních fází - excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie (Valigurová a kol. 2008) (obrázek 1).

**Excystace** začíná požitím oocysty vhodným hostitelem. Jakmile je oocysta uvnitř těla, prvním krokem k infekci je otevření oocysty na jednom pólu, jehož prostřednictvím opustí oocystu čtyři infekční sporozoiti (Fayer a kol. 1990), kteří napadají epiteliální buňky (Valigurová a kol. 2008). Sporozoiti se přemění na jednojaderné trofozoity. Jádro trofozoita se rozdělí a dochází k nepohlavnímu rozmnožování (merogonie).



### 3.4. PŘENOS KRYPTOSPORIDIÍ

Přenos je možný několika cestami, a to: z osoby na osobu, kontaktem se zájmovými a hospodářskými zvířaty a požitím kontaminovaných potravin či kontaminované pitné vody (Tangermann a kol. 1991; Beach 2008; MacKenzie a kol. 1994; Griffiths 1998; Nichols 2008; Ortega a Cama 2008).

Oocysty kryptosporidií jsou vysoce odolné a mohou přežít různé filtrace pitné vody a chemické ošetření, jako je například proces chlorování (Dolejš 2004). Ke kontaminaci surovin pro výrobu potravin může dojít při zavlažování kontaminovanou vodou (Thurston-Enriquez et al. 2002).

### 3.5. URČENÍ A DIAGNOSTIKA

Dříve se k diagnostice používala biopsie střevní tkáně (Keusch et al. 1995). Tento způsob se ovšem neukázal jako nejlepší způsob diagnostiky, proto byly vyvinuty metody pro detekci oocyst přímo z trusu.

Nejčastěji se používá specifické barvení nátěru trusu nebo stolice (Miláček a Vítovec 1985). V současné době je detekce kryptosporidií založena na molekulárních metodách, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR) s následnou sekvenací PCR produktu nebo PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Jeníková a kol. 2011).

### 3.6. DRUHY A GENOTYPY KRYPTOSPORIDIÍ INFIKUJÍCÍ PRASATA

Prasata jsou běžně infikována dvěma druhy kryptosporidií a to *Cryptosporidium suis* a *Cryptosporidium pig* genotyp II (Jeníková a kol. 2011). Kromě výše zmíněných druhů a genotypů, které se u prasat vyskytují přirozeně, byla experimentálně prokázána vnímavost prasat k infekci *C. hominis* a *C. meleagridis* (Akiyoshi a kol. 2003a, b) Také byly zaznamenány další druhy kryptosporidií jako například *C. parvum*, *C. muris* a *C. tyzzeri* (Morgan a kol. 1999a).

Studie, které byly provedeny jasně prokázaly vztah mezi výskytem kryptosporidií a věkem prasat, jako je tomu například u skotu (Langkjaer a kol. 2007; Johnson a kol. 2008).

Přestože je dobře známo, že prasata i jiní hostitelé jsou náchylní k smíšené infekci několika druhy kryptosporidií (Akiyoshi a kol. 2003c; Tanriverdi a kol.

2003; Cama a kol. 2006), nicméně bylo zaznamenáno pouze několik zpráv o smíšené infekci kryptosporidií u prasat (Kváč a kol. 2009a).

### **3.6.1. Specifické druhy kryptosporidií infikující prasata**

V roce 1998 byly popsány dva nové genotypy infikující prasata, *Cryptosporidium* pig genotype I (Morgan a kol. 1999a) a o čtyři roky později *Cryptosporidium* pig genotype II (Ryan a kol. 2003). Na základě molekulárních analýz a biologických vlastností byl genotyp I ustanoven jako samostatný druh a pojmenován *Cryptosporidium suis* (Ryan a kol. 2004).

#### **3.6.1.1. *Cryptosporidium suis***

Tento druh je v současné době nejvíce popisovanou kryptosporidií prasat po celém světě. Typickým hostitelem *Cryptosporidium suis* je prase, ale experimentálně byla k tomuto druhu prokázána vnímavost u telat (Enemark a kol. 2003). Také byl popsán případ, kdy se tímto druhem nakazil člověk (Xiao a kol. 2002). Bylo prokázáno, že *C. suis* není infekční pro myši (Morgan a kol. 1999b). Nejčastěji se tento druh kryptosporidie vyskytuje u selat (Kváč a kol. 2009a). Přestože byly zaznamenány klinické příznaky kryptosporidie vyvolané *C. suis* u dvoudenních, experimentálně infikovaných selat (Enemark a kol. 2003) a u selat před odstavením (Mišič a kol. 2003), většina případů spontánních ale i experimentálních infekcí není provázena žádnými klinickými příznaky (Enemark a kol. 2003; Zintl a kol. 2007).

#### **3.6.1.2. *Cryptosporidium* pig genotype II**

O tomto genotypu kryptosporidií prasat je známo málo. Nejčastěji se vyskytuje u starších prasat (Langkjaer a kol. 2007). Tento druh kryptosporidie byl izolován z prasat ze západní Austrálie, v průmyslových odpadních vodách v Sydney či v prasečí kejďe z irských farem a u sajícího selete v Norsku (Ryan a kol. 2003, 2005; Xiao a kol. 2006; Hammes a kol. 2007). Jeho lokalizace v zažívacím traktu ani tvar či velikost oocyst nebyly doposud dostatečně popsány.

Infekce způsobená *Cryptosporidium* pig genotyp II probíhá převážně bez zjevných klinických příznaků (Langkjaer a kol. 2007).

### 3.6.2. Nespecifické druhy kryptosporidií infikující prasata

Kromě výše zmíněných druhů a genotypů, které se u prasat vyskytují přirozeně, byla experimentálně prokázána vnímavost prasat k infekci *C. hominis* (Pereira a kol. 2002) a *C. meleagridis* (Akiyoshi a kol. 2003a). Také byly zaznamenány ojedinělé případy přirozených infekcí *C. muris* (Xiao a kol. 2006; Kváč a kol. 2009a), *C. tyzzeri* (*C. mouse* genotyp I) (Chen a Huang 2007). *Cryptosporidium parvum*, druh s nízkou hostitelskou specifitou, jež byl na selata úspěšně experimentálně přenesen byl až do roku 1998 považován za jediného původce infekce u prasat (Morgan a kol. 1998). V současné době víme, že *C. parvum* se u prasat vyskytuje jen ojediněle (Kváč a kol. 2009b).

#### 3.6.2.1. *Cryptosporidium muris*

*Cryptosporidium muris* je druh infikující žaludeční epitel svých hostitelů, přičemž typickým hostitelem jsou hlodavci (Tyzzer 1907,1912; Fayer 1990). Přenos je možný na myši, ale ne však na křivky (Iseki a kol. 1989). *Cryptosporidium muris* byl také hlášen u křečků, alžírských myší, damana skalního, veverek, horských koz, opic, velbloudů, burunduka páskovaného, prasat a psů (Chalmers a kol. 1997; Xiao a kol. 1999; Morgan a kol. 2000; Torres a kol. 2000; Dubey a kol. 2002; Warren a kol. 2003; Zintl a kol. 2007; Lupo a kol. 2008). Tento druh byl popsán i jako příčina kryptosporidiózy u 7 lidí ve Francii, Keně, Thajsku a Peru (Guyot a kol. 2001; Gatei a kol. 2002; Tiangtip a Jongwutiwes, 2002; Palmer a kol. 2003; Muthusamy a kol. 2006). U prasat byl výskyt hlášen ojediněle a to u dospělých prasat při porážce (Kváč a kol. 2009a), v prasečí kejďě na farmách v Irsku, Číně a jinde ve světě (Xiao a kol. 2006; Chen a Huang 2007; Zintl a kol. 2007) a v odpadních lagunách z chovných zařízení (Jenkins a kol. 2010). Vyjma nálezu kolektivu autorů Kváč a kolektiv (2009a) se jedná o nálezy z netříděných materiálů, kam se mohli dostat hlodavci a mohlo dojít ke kontaminaci jejich trusem. Proto jednoznačně nelze určit, zda jde o přirozenou infekci. Oocysty podobné *C. muris* byly v několika zemích hlášeny u skotu, avšak bez genetického nebo experimentálního potvrzení (Xiao a kol. 2004a). Patologie této kryptosporidie je nepatrná, pouze v některých závažných případech infekce dochází k dilataci žaludečních žláz, nikoliv ale k zánětu (Iseki a kol. 1989).



### 3.6.2.2. *Cryptosporidium tyzzeri*

*Cryptosporidium tyzzeri* (dříve *Cryptosporidium mouse* genotype I) bylo poprvé popsáno ve střevě myši domácí (*Mus musculus*). Dále byla tato kryptosporidie popsána u hraboše polního (*Microtus arvalis*), norníka rudého (*Myodes glareolus*) (Bajer a kol. 2003; Morgan a kol. 1999b), u krys a bizonů v Portugalsku, Velké Británii a USA (Xiao a Fayer 2008; Xiao a Feng 2008). Existují i záznamy o výskytu u levharta skvrnitého (*Panthera pardus*), takina indického (*Budorcas taxicolor*), pandy červené (*Ailurus fulgens*), paovce hřivnaté (*Ammotragus lervia*) (Lv a kol. 2009) a u netopýřů (Dubey a kol. 1998). Oocysty *C. tyzzeri* byly zjištěny i u některých studenokrevných obratlovců jako například u hadů a ještěrek. V těchto případech se však předpokládá, že se jednalo o pasáž, která se do těla hostitele dostala společně s kontaminovanou potravou (Xiao a kol. 2004b).

Druh *C. tyzzeri* je infekční pro člověka, Jedinou molekulárně doloženou infekcí *C. tyzzeri* u člověka byla infekce dětí v Kuwaitu (Sulaiman a kol. 2005), nicméně původce infekce byl chybně označen za druh *C. parvum*. V roce 2007 byly nalezeny oocysty u dítěte v Indii. Možnost, že se mohlo jednat o *C. tyzzeri* bylo pouze potvrzeno pomocí RFLP analýzy SSU. Je však možné, že se jednalo o *C. meleagridis*, jehož velikost je při PCR-RFLP metodách shodná a navíc *C. meleagridis* infikuje lidi poměrně často (Ajajampur a kol. 2007).

### 3.6.2.3. *Cryptosporidium parvum*

*Cryptosporidium parvum* je nejrozšířenější druh kryptosporidie s nejnižší hostitelskou specifitou. Vnímavost jednotlivých hostitelů k tomuto druhu byla v řadě případů popsána experimentálně. Poprvé byl tento druh nalezen u myši (Tyzzer 1912). Předpokládá se, že je infekční pro většinu savců u kterých je ve velké míře nalézán (de Graaf a kol. 1999, Fayer a kol. 2000). Nejčastěji bývají infikováni tímto druhem přežvýkavci (de Graf a kol. 1999), konkrétně skot především telata do dvou měsíců věku (Santín a kol. 2004; Santín a Trout 2007). Průběh kryptosporidiózy u telat je charakterizován různým stupněm morbidity, ale všeobecně nízkou mortalitou. Patologické změny zažívacího traktu jsou charakterizovány atrofií mikrokloků, lokálním odumřením a ztrátou epitelálních buněk zánětlivé infiltrace v *lamina propria*. (Thompson a kol. 2005). Přestože parazit nejvíce napadá jejunum a ileum, může být silně infikováno i tlusté střevo, aniž by probíhala infekce v tenkém střevě,

kde parazit způsobuje enteritidy, atrofii klků a jejich postupné zkracování (Clayton a kol. 1994; Lumadue a kol. 1998).

*Cryptosporidium parvum* je také nejčastější kryptosporidii infikující člověka (Xiao a kol. 2004a,b). U imunodeficientních pacientů končí infekce většinou smrtí. Imunitní systém je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících průběh a léčbu nákazy (Nimri a Batchoun 1994; Current a Garsia 1991).

Přestože bylo popsáno velké množství prací o patogenitě *C. parvum*, přirozené infekce prasat byly popsány jen v ojedinělých případech (Morgan a kol. 1999a; Zintl a kol. 2007; Kváč a kol. 2009b), i když vnímavost prasat k *C. parvum* byla experimentálně potvrzena (Tzipori a kol. 1982, Vítovec a Koudela 1992). U experimentálně infikovaných prasat dávkou  $5 \times 10^6$  oocyst *C. parvum* byl pozorován v průběhu prvních 4 dnů po infekci průjem s následným samovyléčením. Naopak při dávce  $2,5 \times 10^5$  oocyst nebyly pozorovány žádné klinické příznaky. U gnotobioticky chovaných prasat byl klinický průběh infekce vážnější s výraznou dehydratací organismu (Vítovec a Koudela 1992).

#### **3.6.2.4. *Cryptosporidium meleagridis***

Poprvé byl tento druh popsán v roce 1955 (Slavin 1955) a první infekce u kuřat způsobena rodem *Cryptosporidium* byla zaznamenána v roce 1980 (Pavlásek 1985). Typickými hostiteli *C. meleagridis* jsou ptáci, především drůbež (Morgan a kol. 2001). Tento patogen napadá gastrointestinální trakt především tenké střevo u krůt (Slavin 1955) a infekce se projevuje průjmem bez ztráty hmotnosti a silnějších klinických příznaků (Tůmová a kol. 2002). Tato kryptosporidie je třetí nejčastější nalézající se u člověka (Pedraza-Diaz a kol. 2001).

Přirozené infekce prasat tímto druhem nebyly prozatím publikovány, experimentálně avšak byla prokázána ke *C. meleagridis* vnímavost. U infikovaných prasat byly pozorovány mírné klinické příznaky jako například slabé průjmy bez známek dehydratace (Akiyoshi a kol. 2003a).

#### **3.6.2.5. *Cryptosporidium hominis***

*Cryptosporidium hominis* je druh specializující se na člověka. Nejprve byl považován za genotyp *C. parvum* a byl pojmenován jako *C. parvum* human genotype. Později na základě molekulárních a biologických rozdílů byl ustanoven jako nový druh pojmenován jako *Cryptosporidium hominis* (Morgan a Ryan a kol.

2002). Experimentálně není *C. hominis* infekční pro myši, potkany, kočky, psy a dobytek, ale je infekční pro jehňata a selata (Xiao a kol 2002). V nedávné době byla *C. hominis* popsána u skotu a koz (Park a kol. 2006), duonga (Morgan a kol. 2000). U makaka byla nalezena varianta *C. hominis* a byla pojmenována *Cryptosporidium monkey* genotyp (Xiao a kol. 2002). Přirozená infekce *C. hominis* u prasat zatím nebyla popsána nicméně byl tento druh experimentálně přenesen a infekce u prasat měla nižší intenzitu infekce, mírnější klinické příznaky a kratší periodu než infekce druhem *C. parvum* (Xiao a kol. 2004c).

## **4. MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1. PARAZITI**

Pro experimentální infekci byly použity dva kmeny *Cryptosporidium tyzzeri* a jeden kmen *C. muris*. Oocysty *C. tyzzeri* izolát CR2090 byly izolovány z divokých myší (*Mus musculus musculus*) chycených v Buškovicích a Hůrce (*Mus musculus domesticus*, izolát CR4293). *Cryptosporidium muris* HZ206 pochází z přirozeně infikovaných divokých myší (*M. m. musculus*; lokalita Buškovice). Oocysty *C. tyzzeri* a *C. muris* byly pasážovány v SCID myších. Oocysty *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotyp II byly získány z přirozeně infikovaných 4 týdenních, respektive 9 týdenních prasat chovaných v komerčních chovech.

### **4.2. HOSTITELÉ**

Infektivita každého použitého druhu kryptosporidií byla testována vždy na 3 kusech prasat plemene bílé ušlechtilé dvou věkových kategorií (3-4 a 8 týdenní zvířata). Prasata pocházela z chovu v podniku Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, který je dlouhodobě zcela prostý kryptosporidií. Jako kontrolní skupina byly použity osm týdnů staré SCID myši. SCID myši byly chovány v uživatelském zařízení Parazitologického ústavu, Biologické centrum Akademie věd České republiky, v.v.i.

### **4.3. CHOV ZVÍŘAT**

Prasata byla individuálně umístěna samostatně v kotcích (5m<sup>2</sup>) s betonovou podlahou a zdmi v oddělené budově. Voda a krmení bylo k dispozici *ad libitum*. Kotce byly 2× denně čištěny. Každá skupina myší byla umístěna samostatně v běžných plastových chovných nádobách a krmena sterilním krměním pro hlodavce a pitnou vodou *ad libitum*.

### **4.4. PURIFIKACE OOCYST**

Vzorek trusu byl rozmělněn s deionizovanou vodou v třecí misce, přefiltrován přes sítko do 100 ml zkumavky a centrifugován při 1350 g po dobu 20 minut. Supernatant byl odsán a sediment obsahující oocysty kryptosporidií následně

přečištěn na sacharózovém (Arrowood a Sterling 1987) a cesium-chloridovém gradientu (Arrowood a Donaldson 1996).

#### **4.4.1. Sacharózový gradient (Arrowood a Sterling 1987)**

##### ZÁSOBNÍ ROZTOKY:

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

##### POSTUP:

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

#### 4.4.2. Cesium chloridový gradient (Arrowood a Donaldson 1996)

##### ZÁSOBNÍ ROZTOKY:

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

##### POSTUP:

- Oocysty přečištěné na sacharózovém gradientu centrifugovat 10 minut při 1450 g.
- Sediment resuspendovat v PBS.
- Do 2 ml zkumavky napipetovat 1ml CsCl a na něj navrstvit 0,5 ml suspenze oocyst v PBS.
- Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g
- Na rozhraní CsCl a PBS jsou koncentrovány oocysty
- Odebrat prstenec obsahující oocysty do čisté zkumavky, doředit PBS.
- Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
- Odebrat supernatant a pelet rozmíchat v PBS.
- Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
- Odebrat supernatant, pelet rozmíchat s přibližně 200  $\mu$ l PBS.
- Oocysty uchovávat při 4 °C v PBS.

#### 4.5. DESIGN EXPERIMENTÁLNÍCH INFEKČÍ

Každé zvíře bylo infikováno perorálně (tři zvířata na izolát) dávkou  $1 \times 10^7$  oocyst *C. muris* nebo  $1 \times 10^7$  oocyst *C. tyzzeri* nebo  $1 \times 10^6$  oocyst *C. suis* nebo  $1 \times 10^6$  oocyst *Cryptosporidium* pig genotype II resuspendovaných v 20 ml deionizované vody. Jako pozitivní kontrola byly pro každý experiment použity vždy 3 SCID myši infikované dávkou  $1 \times 10^6$  oocyst ve 200  $\mu$ l destilované vody příslušného druhu kryptosporidií. Infektivita kryptosporidií pro prasata a myši byla sledována po dobu 30 dnů po infekci (DPI) (kapitola 4.6.).

#### 4.6. ODBĚR VZORKŮ PRO PARAZITOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Odběry vzorků byly prováděny v pravidelných intervalech po 12 hodinách po dobu 30 DPI. Vzorky trusu byly odebírány ihned po vykání zvířete, ukládány do

sterilních plastových kelímků označených číslem zvířete, datumem a časem odběru. Ihned po odběru byl proveden nátěr trusu pro následné mikroskopické vyšetření a izolace DNA. Zbylý vzorek byl uchováván při 4 °C pro další zpracování.

#### **4.7. BARVENÍ NÁTĚRU TRUSU DLE MILÁČKA A VÍTOVCE**

**Barvení oocyst kryptosporidií anilin-karbol-methyl-violetí dle Miláčka a Vítovce (1985)**

##### ZÁSOBNÍ ROZTOKY:

##### **Roztok anilin-karbol-methyl violet'**

- 0,6 g methyl violeti
- 1 ml anilinu
- 1 g fenolu
- 30 ml 96% alkoholu
- 70 ml deionizované vody

##### **Roztok tartrazinu**

- 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

##### **Kyselina sírová**

- 2% kyselina sírová

##### PRACOVNÍ POSTUP:

- Vzorky výkalů tence natřít na podložní sklíčko, fixovat methanolem v plameni
- Barvit anilin-karbol-methyl violetí po dobu 30 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 2 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Dobarvit tartrazinem po dobu 2 minut.
- Omýt tekoucí vodou.
- Osušit, následně vyšetřit pod světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Vždy byl prohlédnut celý preparát.

## VÝSLEDKY BARVENÍ

Oocysty se barví modrofialově na žlutooranžovém pozadí.

### **4.8. IZOLACE DNA**

Extrakce DNA z trusu pomocí kitu PSP spin Stool DNA kit (Invitex)

Materiál: 200 mg čerstvého trusu

Izolační kit:

Proteinase K lyofylizát: rozpustit přidáním 1,5 ml deionizované PCR vody. Po rozpuštění skladovat při -20 °C.

#### PRACOVNÍ POSTUP:

- Materiál dát do Safe-Lock-Tube, přidat skleněné kuličky a 0,8 - 1,2 ml Lysis Buffer P a rozbít 1 minutu při rychlosti 5,5 m / v přístroji Fast Prep-24.
- Inkubace 10 minutu / 95 °C v termobloku.
- Centrifugovat 1 minutu / 16 000 g.
- Přenést veškerý supernatant do InviAdsorb-Tube, 15 s vortex, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat 3 minuty / 16 000 g.
- Supernatant přepipetovat do čistých ependorfech, centrifugace 3 minuty / 16 000 g.
- Do čistých ependorfech napipetovat 25 µl Proteinase K a přidat 400 µl supernatantu, promíchat
- Inkubovat 10 minut / 70 °C.
- Připipetovat 400 µl Binding Buffer P, vortex.
- Přepipetovat veškerý objem do Spin Filter + Tube, inkubace 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugace 1 min./ 16.000 g
- Vylít odpad z ependorfech, napipetovat 500 µl Wash I, centrifovat 1 minutu / 16.000 g.
- Vylít odpad z ependorfech, napipetovat 800 µl Wash II, centrifovat 1 minutu / 16000 g.
- Vylít odpad a opět centrifugovat 3 minuty / 16 000 g.



- Na kolonu dát čistou ependorfku, napipetovat 200 µl Elution Buffer D (předeřátého na 70 °C) na kolonu, inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě, centrifovat 1 minutu / 8 000 g.

## 4.9. MOLEKULÁRNÍ DETEKCE KRYPTOSPORIDIÍ

### 4.9.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

#### CHEMIKÁLIE:

- deoxyribonukleosid trifosfáty (200 µM dNTP's, 10 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- Taq purple DNA polymeráza (1 U / µl, Top-Bio, ČR)
- PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, ČR)
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Top-Bio, ČR)
- bovinní sérový albumin (BSA 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, ČR)
- primery (10 µM, Generi Biotech, ČR)
- 

#### **Primery – SSU (nasedací teplota)**

##### PRIMÁRNÍ – RODOVĚ SPECIFICKÉ

- F 5'- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG - 3' (55 °C)
- R 5'- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA - 3' (55 °C)

##### SEKUNDÁRNÍ – RODOVĚ SPECIFICKÉ

- F 5'- GGA AGG GTT GAT TTT ATT AGA TAA - 3' (55 °C)
- R 5'- CTC ATA AGG TGC TAG AGG AGT A -3' (55 °C)

##### SEKUNDÁRNÍ – *CRYPTOSPORIDIUM SUIS* SPECIFICKÝ

- F 5 - CATAATAACTTTACGGATCACATTTTT - 3 (62 °C)
- R 5 - CTC AAAGTAAAATTTTCATATACTAATAAAAAT (62 °C)

##### SEKUNDÁRNÍ – *CRYPTOSPORIDIUM* PIG GENOTYPE II SPECIFICKÝ

- F 5 - GCGGATCACGTTATGTGACAT -3 (62 °C)
- R 5 - TTCCACATACTGTAAAGTAATGTG - 3 (62 °C)

## Primery – GP60

### PRIMÁRNÍ

- F 1 - ATA GTC TCC GCT GTA TTC (50 °C)
- R 1 - GGA AGG AAC GAT GTA TCT (50 °C)

### SEKUNDÁRNÍ

- F 2 - TCC GCT GTA TTC TCA GCC (50 °C)
- R 2 - GCA GAG GAA CCA GCA TC (50 °C)

Detekce všech druhů a genotypů kryptosporidií byla prováděna pomocí amplifikace části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU) za použití rodově specifických primerů (Jiang a kol. 2005). Druh *C. tyzzeri* byl detekován dle nested PCR protokolu amplifikujícího část genu pro GP60 (Alves a kol. 2003) a *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II metodou popsanou Jeníkovou a kolektivem (2011). DNA izolovaná ze vzorku stolice obsahující oocysty *C. hominis* byla použita jako pozitivní kontrola. Celkový objem jednotlivých reakčních směsí byl pro primární a sekundární PCR reakci 20 µl (tabulka 2). Vzorky byly vizualizovány v 1 % agarózovém gelu.

**Tabulka 2.** PCR protokol pro amplifikaci SSU rRNA a GP60

primární reakce			sekundární reakce		
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-----	11,3 µl	<b>H<sub>2</sub>O</b>	-----	12,1 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1,2 µl	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1,2 µl
<b>10× buffer</b>	-----	2,0 µl	<b>10× buffer</b>	-----	2,0 µl
<b>dNTP</b>	10 mM	0,4 µl	<b>dNTP</b>	10 mM	0,4 µl
<b>forward</b>	10 µM	0,4 µl	<b>forward</b>	10 µM	0,4 µl
<b>reverse</b>	10 µM	0,4 µl	<b>reverse</b>	10 µM	0,4 µl
<b>BSA</b>	10 g/l	0,8 µl	-----	-----	0,8 µl
<b>taq</b>	1 U/1µl	0,5 µl	<b>taq</b>	1 U/1µl	0,5 µl
<b>DNA</b>	-----	3,0 µl	<b>DNA</b>	-----	3,0 µl
<b>celkem</b>	-----	<b>20,0 µl</b>	<b>celkem</b>	-----	<b>20,0 µl</b>

### 4.9.2. Sekvenace

Sekundární produkty z PCR byly sekvenovány za použití sekundárních primerů. K přípravě vzorků k sekvenaci byl použit ABI BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing kit a ABI3130. Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi

uloženými v databázi GeneBank pomocí programu ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>). Sekvence izolátů kryptosporidií získaných z infikovaných hostitelů byly porovnávány s těmi, které byly použity pro infekci.

#### **4.9.3. Fylogenetická analýza**

Fylogenetické vztahy druhů a genotypů kryptosporidií byly vypočteny Neighbor-Joining metodou (Saitou a Nei 1987) založenou na 2-parametrickém distančním modelu dle Kimury (Kimura 1980). Bootstrapový konsenzus výsledného stromu byl získán na základě 1000 opakování. Pro konstrukci stromů byl použit program TREECON verze 1.3b.

### **4.10. HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ**

Všechna zvířata zařazena do experimentu byla po 30 dnech poražena. Ihned po usmrcení zvířete byly odebrány části žaludku (*pars pylorica* 5 cm a 10 cm od pyloru, sliznice z *plicae spirales curvatura minor et major*, a sliznice z *fundus* a *cardia*) a střeva (duodenum, přední, střední a zadní jejunum, ileum, caecum, colon, a rektum) a fixovány 10% formaldehydem. Vzorky byly zpracovány pro histologii standardními histologickými metodami. Tkáňové řezy byly barveny hematoxylinem-eosinem, Wolbachovou modifikací Giemsova barvení a druhově nescifickou fluorescenční protilátkou proti stěně oocyst kryptosporidií (*Cryptosporidium* IF Test, Crypto cel, Medac).

#### **4.10.1. *Cryptosporidium* imunofluorescenční test**

##### CHEMIKÁLIE:

- Crypto cell reagent
- Mouting fluid
- PBS

##### PRACOVNÍ POSTUP:

- Na sklíčko s odparafinovaným histologickým řezem kápnout 20 µl Crypto cell

##### Reagentu

- Inkubace sklíčka ve vlhké komůrce 30 minut / 37 °C
- Opatrně omýt sklíčko 1 minutu v PBS

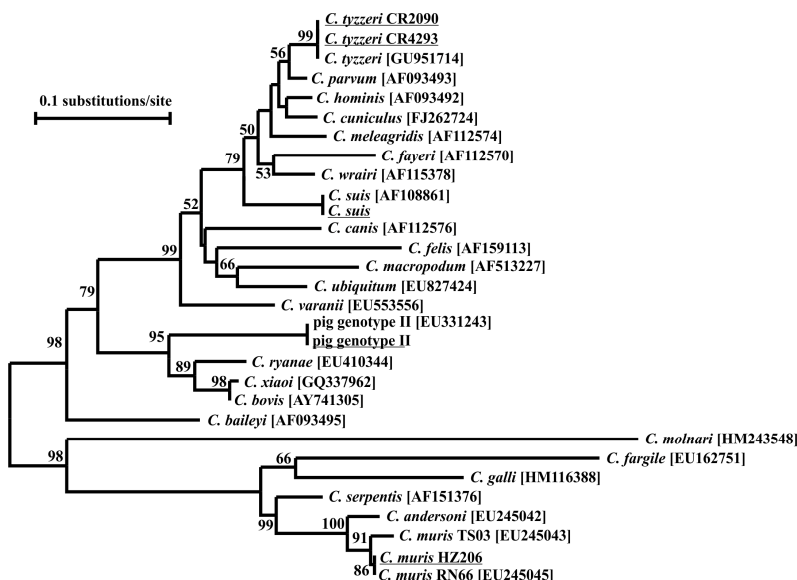
- Sklíčko osušit
- Kápnout 20  $\mu$ l mouting fluid
- Přiložit krycí sklíčko
- Prohlížet (UV filtr 520 nm)

## 5. VÝSLEDKY

Všechna prasata a myši byly před infekcí negativní jak na přítomnost oocyst kryptosporidií detekovaných mikroskopicky, tak i na přítomnost specifické DNA kryptosporidií testovanou nested PCR za použití rodově specifických primerů amplifikujících část genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA).

Analýza částečných sekvencí SSU rRNA *C. muris* HZ206, *C. tyzzeri* CR4293 a CR2090, *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II použitých v této studii prokázala 100% identitu s referenčními sekvencemi z *C. muris* RN66 (GenBank č. EU24505), *C. tyzzeri* respektive *Cryptosporidium* mouse genotyp I (AF115378), *C. suis* (AF108861) a *Cryptosporidium* pig genotype II (EU827424) (obrázek 1). Sekvence genu pro GP60 získaných z *C. tyzzeri* CR4293 a CR2090 klastrovaly se subtypy *C. tyzzeri* IXb a IXa, respektive se 100% podporou (obrázek 2).

Veškerá kontrolní zvířata (myši) byla vnímavá jak k infekci *C. muris*, tak k *C. tyzzeri*. SCID myši infikované druhem *C. muris* začaly vylučovat oocysty 7-8 DPI, zatímco myši infikované druhem *C. tyzzeri* 4-5 DPI. Sekvence SSU získané z reizolovaných pozitivních vzorků infikovaných myši byly totožné se sekvencemi izolátů použitých pro infekci. U SCID myši inokulovaných *C. suis* nebo *Cryptosporidium* pig genotype II nebyly v trusu detekovány žádné oocysty ani specifická kryptosporidiová DNA v průběhu celého experimentu.

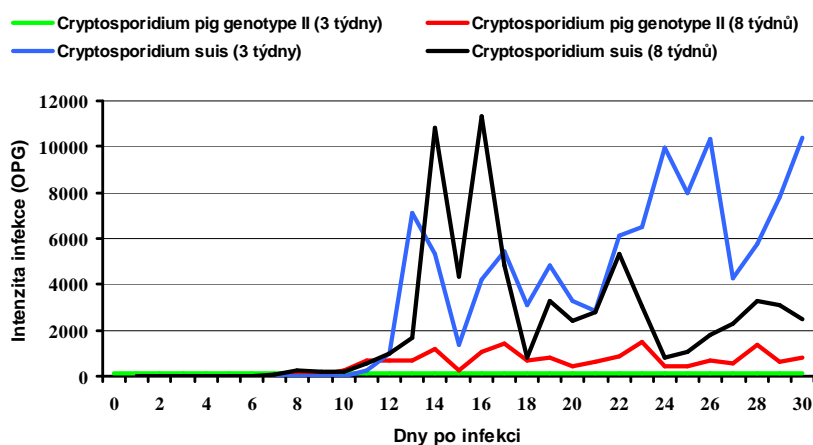


**Obrázek 1.** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií použitých v této studii (potrženo) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genů kódujících malou ribozomální podjednotku (SSU) vytvořený metodou neighbor-joining v programu Treecon; 1000× bootstrap; znázorněny hodnoty podpory větví více než 50 %.



DPI, první záchyt oocyst pomocí standardních koprologických metod byl zaznamenán 7-8 DPI. Nebyl zjištěn rozdíl v začátku vylučování oocyst ani mezi jednotlivými věkovými kategoriemi, ani v rámci jedné kategorie. Jak 3, tak i 8 týdenní prasata vylučovala oocysty po celou dobu sledování, tedy 30 DPI (graf 1). Molekulární analýza prokázala větší počet pozitivních vzorků než mikroskopické vyšetření (tabulka 1). Zatímco intenzita infekce *C. suis* u 3 týdenních selat dosahovala průměrné hodnoty 10 000 OPG, 8 týdenní selata vylučovala v průměru 2 500 oocyst na gram trusu (graf 1). Histologické a PCR vyšetření prokázalo, že infekce *C. suis* je lokalizována ve všech částech tenkého a tlustého střeva s predilekcí v tlustém střevě

**Graf 1.** Intenzita infekce *Cryptosporidium suis* a *Cryptosporidium pig* genotypu II u obou věkových kategorií na základě mikroskopického vyšetření



**Tabulka 3.** Frekvence výskytu oocyst kryptosporidií v obou věkových kategoriích na základě mikroskopického vyšetření

Kategorie	Počet odebraných vzorků	Počet pozitivních vzorků (%)	
		mikroskopie	PCR
3 týdenní	180	130 (72,2 %)	160 (88,8 %)
8 týdenní	180	109 (60,5 %)	154 (85,5 %)
<b>Celkem</b>	<b>360</b>	<b>239 (66,0 %)</b>	<b>314 (87,2 %)</b>

Srovnání mikroskopického vyšetření a molekulární detekce ukázalo, že mikroskopie je méně spolehlivá, pomocí PCR bylo detekováno více pozitivních vzorků.

### 5.3. INFEKTIVITA A PATOGENITA *Cryptosporidium* pig genotype II PRO 3 A 8 TÝDENNÍ SELATA

V průběhu celé doby experimentu nebyly v trusu 3 týdenních selat detekovány žádné oocysty, ani nebyla zjištěna přítomnost specifické DNA. Histologické a PCR vyšetření částí zažívacího traktu těchto zvířat neprokázalo přítomnost žádných vývojových stádií kryptosporidií. Naproti tomu u 8 týdenních zvířat byla přítomnost specifické DNA *Cryptosporidium* pig genotype II zaznamenána 3-4 DPI a oocysty byly mikroskopicky detekovány v 6 DPI. Z celkového počtu 180 vyšetřených vzorků bylo 79 mikroskopicky pozitivních na přítomnost oocyst a ve 164 byla PCR metodami prokázána specifická DNA (tabulka 4). Všechna vnímavá zvířata vylučovala oocysty po celou dobu experimentu. Intenzita infekce se pohybovala od 200 do 1500 OPG (graf 1) Histologické vyšetření prokázalo přítomnost vývojových stádií ve všech částech střev s predilekcí v distálních částech tenkého střeva.

**Tabulka 4.** Frekvence výskytu oocyst kryptosporidií v obou věkových kategoriích na základě mikroskopického vyšetření

Kategorie	Počet odebraných vzorků	Počet pozitivních vzorků (%)	
		mikroskopie	PCR
3 týdenní	180	0	0
8 týdenní	180	79 (43,8 %)	164 (91,1 %)
Celkem	360	79 (43,8 %)	164 (91,1 %)



## 6. DISKUSE

S rozšířeným používáním citlivých nástrojů na detekci rodu *Cryptosporidium* ve výkalech zvířat, je důležité rozlišovat hostitele, kterými kryptosporidie mechanicky projdou aniž by je nakazily od těch, kteří jsou plně vnímaví k infekci, tedy v jejich organismu je kompletně ukončen vývojový cyklus. V minulosti byl hlášen u různých druhů hadů, ještěrek a ryb výskyt nescifických druhů kryptosporidií, následně byla hypotéza o pasáži potvrzena u řady případů (Crawshaw a Mehren, 1987; Upton, 1990; Graczyk a kol. 1996; Xiao a kol. 2004b). Hypotéza o mechanickém transportu byla následně prokázána řadou experimentálních infekcí, které prokázaly, že hadi nejsou vnímaví k infekci *C. muris* (myši), *C. andersoni* (telata), *C. muris*-like (velbloud), *C. wrairi* (morče), *C. baileyi* (drůbež) nebo *C. meleagridis* (krůty) (Graczyk a Cranfield, 1998). Mechanickým transportem lze také vysvětlit výskyt *C. muris* a *C. andersoni* u lelkouna sovího (*Podargus strigoides*) a koroptve korunkaté (*Rollulus roulroul*) (Ng a kol. 2006). Ve většině případů po vyřazení různých složek potravy, myši, kuřata, došlo k zastavení vylučování oocyst (Xiao a kol. 2004b). Zjištěné oocysty ve výkalech ještěrů a hadů tedy pouze mechanicky prošly tělem predátora aniž by ho infikovaly. *Cryptosporidium muris* a *C. tyzzeri* byly nedávno zjištěny ve výkalech prasat v České republice (Kváč a kol. 2009a) a v Číně (Chen a Huang 2007). Jiní autoři uvádějí přítomnost *C. muris* v prasečí kejďě (Xiao a kol. 2006) a oba druhy, *C. muris* i *C. tyzzeri*, v odpadních lagunách chovných zařízení (Jenkins a kol. 2010). Nicméně, vnímavost prasat k *C. muris* a *C. tyzzeri*, jehož hlavním hostitelem jsou hlodavci (Feng a kol. 2011; Ren a kol. 2012), zůstal nejasný. Naše hypotéza, že přítomnost *C. muris* a *C. tyzzeri* v prasečích výkalech nebyla aktivní infekce byla experimentálně ověřena. Žádný z použitých myších druhů kryptosporidií nevyvolal u inokulovaných prasat aktivní infekci a na základě série histologických, koprologických a molekulárních vyšetření můžeme konstatovat, že prasata, nejsou k infekci *C. muris* a *C. tyzzeri* vnímavá. Ve světle našich zjištění je pravděpodobné, že předchozí údaje o výskytu *C. muris* a *C. tyzzeri* ve výkalech prasat byly způsobeny mechanickým průchodem bez infikace zvířete. Je také pravděpodobné, že vysoký výskyt *C. muris* (90 % izolátů) a přítomnost *C. tyzzeri* v odpadních lagunách chovných zařízení (Jenkins a kol. 2010) bylo způsobeno kontaminací trusem hlodavců. Vzhledem k bohaté přítomnosti synantropních hlodavců na farmách, by detekce těchto kryptosporidií v odpadních lagunách neměla být překvapující.

Prasata mohou být infikována několika druhy a genotypy kryptosporidií (Morgan a kol. 1999; Ryan a kol. 2003, 2004; Xiao a kol. 2006; Zintl a kol. 2007). Nicméně dva druhy *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II, jsou specifické pro prasata a jsou běžně detekovány (Langkjaer a kol. 2007; Suárez-Luengas a kol. 2007; Zintl a kol. 2007). Ačkoliv obě prasečí kryptosporidie byly nalezeny u různých věkových kategoriích (Kváč a kol. 2009b), na základě podrobné analýzy dat byla vyslovena hypotéza o věkové specifitě *Cryptosporidium* pig genotype II (Jeníková a kol. 2011). Do současné doby se předpokládalo, že druh *C. suis* je infekční jak pro selata před odstavem, tak i po odstavu a postrádá věkovou specifitu, jak je například známo u žaludečních kryptosporidií přežvýkavců či hlodavců (Kváč a kol. 2008). Naproti tomu, *Cryptosporidium* pig genotype II se zdá být věkově specifický, infikující pouze zvířata starší 6 týdnů věku. Tyto výsledky byly podpořeny řadou prací v nichž byl tento genotyp nalezen pouze u zvířat ve věku 2-6 měsíců (Suárez-Luengas a kol. 2007; Johnson a kol. 2008). Nicméně potřebný důkaz ve formě experimentální infekce dosud chyběl. Naše práce bezpochyby prokázala, že *C. suis* je schopno infikovat všechny věkové kategorie prasat, zatímco *Cryptosporidium* pig genotype II bylo infekční pouze pro prasata starší 8 týdnů věku. V souladu s předchozími výsledky Jeníkové a kolektivu (2011) jsme jednoznačně prokázali, že prasata infikovaná *Cryptosporidium* pig genotype II vylučují do prostředí výrazně menší množství oocyst. Tato skutečnost v minulosti vedla k chybné interpretaci výsledků získaných pouze na základě PCR založené na amplifikaci SSU pomocí rodově specifických primerů. Vedle věkové specifity jsme prokázali, že mladší kategorii prasat jsou vnímavější k infekci *C. suis* a vylučují do prostředí větší počet oocyst. Toto zjištění koresponduje s výsledky epidemiologických studií (Vítovec a kol. 2006; Jeníková a kol. 2011). Přestože jsou oocysty kryptosporidií vylučovány v průběhu patentní periody kontinuálně, při infekci druhem *C. suis* jsme zaznamenali částečné intermitentní vylučování charakterizované výrazným poklesem nebo nárůstem počtu oocyst v gramu trusu vyšetřovaného zvířete. Tyto výsledky odpovídají zjištění, které publikovali Vítovec a kolektiv (2006).

Námi získané výsledky jsou celosvětově unikátní a dávají velmi dobrý podklad pro přejmenování *Cryptosporidium* pig genotype II na samostatný druh. Navíc potvrzení věkové specifity *Cryptosporidium* pig genotype II spolu s faktem, že dosud nebyla proti kryptosporidiím vyvinuta účinná chemoterapeutika, otevírá nové možnosti ve studiu imunitní odpovědi a přirozených bariér chránících hostitele před infekcí kryptosporidiemi.

## 7. ZÁVĚRY

- *Cryptosporidium muris* a *Cryptosporidium tyzzeri* nejsou infekční pro žádnou ze zkoumaných věkových kategorií prasat.
- *Cryptosporidium suis* je infekční pro obě věkové kategorie prasat
- *Cryptosporidium* pig genotyp II je dle našich výsledků infekční pouze pro zvířata starší 8 týdnů.
- Třítýdenní selata jsou vnímavější k infekci *C. suis*.
- Kryptosporidióza u prasat není spojena s průjemovým onemocněním

## 8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- AJJAMPUR S. S., GLADSTONE B. P., SELVAPANDIAN D., MULIYIL J. P., WARD H., KANG G. 2007:** Molecular and spatial epidemiology of cryptosporidiosis in children in a semi-urban community in south India. *J. Clin. Microbiol.* 45: 915–920.
- AKIYOSHI D. E., DILO J., PEARSON C., CHAPMAN S., TUMWINE J., TZIPORI S. 2003a:** Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. *Infect. Immun.* 71: 1828–1832.
- AKIYOSHI D. E., MOR S., TZIPORI S. 2003b:** Rapid displacement of *Cryptosporidium parvum* type 1 by type 2 in mixed infections in piglets. *Infect. Immun.* 71: 5765–5771.
- ALVES M., XIAO L., SULAIMAN I., LAL A. A., MATOS O., ANTUNES F. 2003:** Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2744–2747.
- ANONYMOUS. 1982:** Cryptosporidiosis, assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Morbid. Mortal. Wkly. Rpt.* 31: 89–102.
- ARROWOOD M. J., DONALDSON K. 1996:** Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43:89S
- ARROWOOD M. J., STERLING C. R. 1987:** Isolation of *Cryptosporidium* oocyst and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.* 73: 314–319.
- BAJER A., CACCIÒ S., BEDNARSKA M., BEHNKE J. M., PIENIAZEK N. J., SINSKI E. 2003:** Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents Poland. *J. Parasitol.* 89: 1053–1055.
- BARKER I. K., CARBONELL P. L. 1974:** *Cryptosporidium agni* sp.n. from lambs, and *Cryptosporidium bovis* sp.n. from a calf, with observations on the oocyst. *Z Parasitenkd* 44: 289–298.
- BEACH M. 2008:** Waterborne: recreational water. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 335–370.

- BIRD R G. 1981:** Protozoa and viruses. Human cryptosporidiosis and concomitant viral enteritis. In: Canning, E.U. (Ed.), A Presentation Volume to P.C.C. Garnham Parasitological Topics. Society of Protozoologists Special Publication, pp. 39–47.
- CAMA V. A., GILMAN R. H., VIVAR A., TICONA E., ORTEGA Y., BERN C., XIAO L. 2006:** Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1025–1028.
- CARRENO R. A., MARTIN D. S., BARTA J. R. 1999:** *Cryptosporidium* is more closely related to the grenadines than to coccidia as shown by phylogenetic analyses of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85: 899–904.
- CASEMORE D. P., JACKSON F. P. 1984:** Hypothesis: cryptosporidiosis in human beings is not primarily a zoonosis. *J. Infect.* 9: 153–156.
- CASEMORE D. P., SANDS R. L., CURRY A. 1985:** *Cryptosporidium* species a “new” human pathogen. *J. Clin. Pathol.* 38: 1321–1336.
- CLAYTON F., HELLER T., KOTLER D. P. 1994:** Variation in the enteric distribution of cryptosporidia in acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Clin. Pathol.* 102: 420–425.
- CRAWSHAW G. J., MEHREN K. G. 1987:** Cryptosporidiosis in zoo and wild animals, in *Erkrankungen der Zootiere, Verhandlungsbericht des 29. Int. Symp. über die Erkrankungen der Zootiere von 20. Ippen, R., Schroder, H.D. (Eds.), Akad. Verlag, Berlin, pp. 353–362.*
- CURRENT W. L., GARCIA L. S. 1991:** Cryptosporidiosis. *Clin. J. Microbiol.* 4: 325–358.
- CURRENT W. L., REESE N. C. 1986:** A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J. Protozool.* 33: 98–108.
- CURRENT W. L., UPTON S. J., HAYNES T. B. 1986:** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplex, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool.* 33: 289–296.
- DE GRAAF D. C., VANOPDENBOSCH E., ORTEGA-MORA L. M., ABBASSI H., PEETERS J. E. 1999:** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 29: 1269–1287.
- DOLEJŠ P. 2004:** *Cryptosporidium* a *Giardia* – přehled vodárenské problematiky za první desetiletí po událostech v Milwaukee (USA). Sborník konference s mezinárodní účastí Pitná voda, SvF STU Bratislava 2004. s. 89–94.

- DUBEY J. P., HAMIR A. N., SONN R. J., TOPPER M. J. 1998:** Cryptosporidiosis in a bat (*Eptesicus fuscus*). *J. Parasitol.* 84: 622–623.
- DUBEY J. P., MARKOVITS J. E., KILLARY K. A. 2002:** *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet. Pathol.* 39: 363–371.
- ENEMARK H. L., AHRENS P., BILLE-HANSEN V., HEEGAARD P. M., VIGRE H., THAMSBORG S. M., LIND P. 2003:** *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the ‘porcine’ genotype. *Parasitology* 126: 407–416.
- FAYER R. 1997.** The general biology of *Cryptosporidium*. In *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–41.
- FAYER R., MORGAN U. M., UPTON S. J. 2000:** *Cryptosporidium* as a parasitic zoonotic. *Inter. J. Parasitol.* 30: 1305–1321
- FAYER R., SPEER C. A., DUBEY J. P. 1990:** General biology of *Cryptosporidium*, in *Cryptosporidiosis of Man and Animals*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–29.
- FAYER R., UNGAR B. L. P. 1986:** *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50: 458–483.
- FENG Y., LAL A. A., LI N., XIAO L. 2011:** Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.* 127: 238–242.
- GATEI W., ASHFORD R. W., BEECHING N. J., KAMWATI S. K., GREENSILL J., HART C. A. 2002:** *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 204–206.
- GRACZYK T. K., CRANFIELD M. R. 1998:** Experimental transmission of *Cryptosporidium* oocyst isolates from mammals, birds, and reptiles to captive snakes. *Vet. Res.* 29: 187–195.
- GRACZYK T. K., FAYER R., CRANFIELD M. R. 1996:** *Cryptosporidium parvum* is not transmissible to fish, amphibia, or reptiles. *J. Parasitol.* 82: 748–751.
- GRIFFITHS J. K. 1998:** Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Adv. Parasitol.* 40: 37–85.

- GOODSTEIN R. F., COLOMBO C. S., ILLFELDER M. A., SKAGGS R. E. 1989:** Bronchial and gastrointestinal cryptosporidiosis in AIDS. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 89: 195–197.
- GUSELLE N. J., APPELBEE A. J., OLSON M. E. 2003:** Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet. Parasitol.* 113: 7–18.
- GUYOT K., FOLLET-DUMOULIN A., LELIEVRE E., SARFATI C., RABODONIRINA M., NEVEZ G., CAILLIEZ J. C., CAMUS D., DEI-CAS E. 2001:** Molecular characterization of I isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3472–3480.
- HAMNES I. S., GJERDE B. K., FORBERG T., ROBERTSON L. J. 2007:** Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Vet. Parasitol.* 144: 222–233.
- HINNANT K., SWARTZ A., ROTTERDAM H., RUDSK C. 1989:** Cytomegaloviral and cryptosporidial cholecystitis in two patients with AIDS. *Am. J. Surg. Pathol.* 13: 57–60.
- HOOVER D. M., HOERR F. J., CARLTON W. W., HINSOMAN E. J., FERGUSON H. W. 1981:** Enteric cryptosporidiosis in nasotang, *Naso liturata*. *J. Fish Dis.* 4: 425–428.
- CHALMERS R. M., STURDEE A. P., BULL S. A., MILLER A., WRIGHT S. E. 1997:** The prevalence *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol. Res.* 83: 478–482.
- CHEN F., HUANG K. 2007:** Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* in pigs in eastern China. *Zoonos. Pub. Heal.* 54: 393–400.
- ISEKI M., MAEKAWA T., MORIYA K., UNI S., TAKADA S. 1989:** Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75: 218–222.
- JENÍKOVÁ M., NĚMEJC K., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., KVÁČ M. 2011:** New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. *Vet. Parasitol.* 176: 120–125.
- JENKINS M. B., LIOTTA J. L., LUCIO-FORSTER A., BOWMAN D. D. 2010:** Concentrations, viability, and distribution of *Cryptosporidium* genotypes in

- lagoons of swine facilities in the Southern Piedmont and in coastal plain watersheds of Georgia. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 5757–5763.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1135–1141.
- JIRKŮ M., VALIGUROVÁ A., KOUDELA B., KRÍŽEK J., MODRÝ D., ŠLAPETA J. 2008:** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol.* 55: 81–94.
- JOHNSON J., BUDDLE R., REID S., ARMSON A., RYAN U. M., 2008:** Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. *Exp. Parasitol.* 119: 418–421.
- KAHN D. G., GARFINKLE J. M., KIONOFF D. C., PEMBROOK L. J., MORROW D. J. 1987:** Cryptosporidial and cytomegaloviral hepatitis and cholecystitis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 111: 879–881.
- KEUSCH G. T., HAMER D., JOE A., KELLEY M., GRIFFITHS J., WARD H., 1995:** "Cryptosporidia--who is at risk?" *Schweiz. Med. Wochenschr.* 125: 899–908.
- KIMURA M. 1980:** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
- KVÁČ M., HANZLÍKOVÁ D., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D. 2009a:** Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 160: 319–322.
- KVÁČ M., SAK B., HANZLÍKOVÁ D., KOTILOVÁ J., KVĚTOŇOVÁ D. 2009b:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. *Parasitol. Res.* 104: 425–428.
- KVÁČ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., DITRICH O., HOFMANNOVÁ L., MODRÝ D., VÍTOVEC J., XIAO L. 2008:** Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Vet. Parasitol.* 153: 363–367.



- LANGKJAER R. B., VIGRE H., ENEMARK H. L., MADDOX-HYTTEL C. 2007:** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitol.* 134: 339–350.
- LASSER K. H., LEWIN K. J., RYNING F. W. 1979:** *Cryptosporidial* enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Hum. Pathol.* 10: 234–240.
- LEVINE N. D. 1980:** Some corrections of *coccidian* (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66: 830–834.
- LUMADUE J. A., MANABE Y. C., MOORE R. D., BELITSOS P. C., SEARS C. L., CLARK D. P. 1998:** A clinicopathologic analysis of AIDS-related *cryptosporidiosis*. *AIDS.* 12: 2459–2466.
- LUPO P. J., LANGER-CURRY R. C., ROBINSON M., OKHUYSEN P. C., CHAPPELL C. L. 2008:** *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78: 917–921.
- 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:** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7692–7699.
- 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. 1994:** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331: 161–167.
- MEISEL J. L., PERERA D. R., MELIGRO C., RUBIN C. E. 1976:** Overwhelming watery diarrhea associated with a *cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterol.* 70: 1156–1160.
- MEUTIN D. J., VAN KRUININGEN H. J., KEIN D. H. 1974:** *Cryptosporidiosis* in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165: 914–917.
- MILÁČEK P., VÍTOVEC J. 1985:** Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32: 50.

- MIŠIČ Z., KATIČ -RADIOJEVIČ S., KULIŠIČ Z. 2003:** *Cryptosporidium* infections in nursing, weaning and post-weaned piglets and sows in the Belgrade district. *Acta Vet.* 5–6: 361–366.
- MORGAN U. M., BUDDLE R., ARMSON A., ELLIOT A., THOMPSON R. C. A. 1999a:** Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs. *Aust. Vet. J.* 77: 44–47.
- MORGAN-RYAN U. M., FALL A., WARD L. A., HIJJAWI N., SULAIMAN I., FAYER R., THOMPSON R. C., OLSON M., LAL A., XIAO L. 2002:** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 433–440.
- MORGAN U. M., MONIS P. T., XIAO L. H., LIMOR J., SULAIMAN I., RAIDAL S., O'DONOGHUE P., GASSER R., MURRAY A., FAYER R., BLAGBURN B. L., LAL A. A., THOMPSON R. C. A. 2001:** Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.* 31: 289–296.
- MORGAN U. N., STURDEE A. P., SINGLETON G., GOMEZ M. S., GRACENTA M., TORRES J., HAMILTON S. G., WOODSIDE D. P., THOMPSON R. C. A. 1999b:** The *Cryptosporidium* “mouse” genotype is conserved across geographic areas. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1302–1305.
- MORGAN U. M., XIAO L., MONIS P., IRWIN P. J., FAYER R., FALL A., DENHOLM K. M., LIMOR J., LAL A. A., THOMPSON R. C. A. 2000:** *Cryptosporidium* in domestic dogs—the dog genotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2220–2223.
- MUTHUSAMY D., RAO S. S., RAMANI S., MONICA B., BANERJEE I., ABRAHAM O. C., MATHAI D. C., PRIMROSE B., MULIYIL J., WANKE C. A., WARD H. D., KANG G. 2006:** Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *J. Clin. Microbiol.* 44: 632–634.
- NG J., PAVLÁSEK I., RYAN U. 2006:** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7548–7553.
- NICHOLS G. 2008.** Epidemiology. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 79–118.

- 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.
- NIMRI F. L., BATCHOUN R. 1994:** Prevalence of *Cryptosporidium* species in elementary school children. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1040–1042.
- ORTEGA Y., CAMA V. 2008:** Foodborne transmission. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 289–304.
- PALMER C. J., XIAO L., TERASHIMA A., GUERRA H., GOTUZZO E., SALDIAS G., BONILLA J. A., ZHOU L., LINDQUIST A., UPTON S. J. 2003:** *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen recovered from a human in Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 1174–1176.
- PANCIERA R. J., THOMASSEN R. W., GARNER F. M. 1971:** *Cryptosporidial* infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 479–484.
- PARK J. H., GUK S. M., HAN E. T., SHIN E. H. KIM J. L., CHAI J. Y. 2006:** Genotype analysis of *Cryptosporidium* spp. prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* 44: 27–33.
- PAVLÁSEK I. 1981:** First record of *Cryptosporidium* sp. in calves in Czechoslovakia. *Folia Parasitol.*, 28:187–199.
- PAVLASEK, I. 1985:** První nález spontanní kryptosporidiové infekce kočky domácí v ČSSR. *Veterinářství* 35: 3.
- PEDRAZA-DIAZ S., AMAR C. F. L., MCLAUHLIN J., NICHOLS G. L., COTTON K. M., GODWIN P., IVERSEN A. M., MILNE L., MULLA J. R., NYE K., PANIGRAHL H., VENN S. R., WIGGINS R., WILLIAMS M., YOUNG E. R. 2001:** *Cryptosporidium meleagridis* from humans: Molecular analysis and description of affected patients. *J. Infect.* 42: 243–250.
- PEREIRA S. J., RAMIREZ N. E., XIAO L., WARD L. A. 2002:** Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *J. Infect. Dis.* 186: 715–718.
- QADRIPUR S. A., KLOSE L. 1985:** *Cryptosporidium enteritidis*. Occurrence in southern Lower Saxony. Study of urticaria as an example. *Dermatol. Monatsschrift* 171: 438–442.

- 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*). Exp. Parasitol. 130: 274–281.
- RYAN U. M., MONIS P., ENEMARK H. L., SULAIMAN L., SAMARASHINGHE B., READ C., BUDDLE R., ROBERTSON I., ZHOU L., THOMPSON R. C., XIAO L. 2004:** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). J. Parasitol. 90: 769–773.
- RYAN U., READ C., HAWHINS P., WARNECKE M., SWANSON P., GRIFFITH M., DEERE D., CUNNINGHAM M., COX P. 2005:** Genotypes of *Cryptosporidium* from Sydney water catchment areas. J. Appl. Microbiol. 98: 1221–1229.
- RYAN U. M., SAMARASINGHE B., READ C., BUDDLE J. R., ROBERTSON I. D., THOMPSON R. C. 2003:** Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3970–3974.
- SANTIN, M., TROUT, J.M., 2007:** Livestock. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 451–483.
- SAITOU N., NEI M. 1987:** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406–425.
- SANTÍN M., TROUT J. M. 2008:** A longitudinal study of *cryptosporidiosis* in dairy cattle from birth to 2 years of age. Vet. Parasitol. 155: 15–23.
- SANTÍN M., TROUT J. M., FAYER R. 2004:** Prevalence *Enterocytozoon bienusi* in postweaned dairy calves in the eastern United States. Parasitol. Res. 93: 287–289.
- SLAVIN D. 1955:** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). J. Comp. Pathol. 65: 262–266.
- SUAREZ-LUENGAS L., CLAVEL A., QUILEZ J., GONI-CEPERO M. P., TORRES E., SANCHEZ-ACEDO C., DEL CACHO E. 2007:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). Vet. Parasitol. 148: 231–235.
- SULAIMAN I. M., HIRA P. R., ZHOU L., AL-ALI F. M., AL-SHELAHI F. A., SHWEIKI H. M., IQBAL J., KHALID N., XIAO L. 2005:** Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. J. Clin. Microbiol. 43: 2805–2809.

- TANGERMANN R. H., GORDON S., WIESNER P., KRECKMAN L. 1991:** An outbreak of *cryptosporidiosis* in a day-care center in Georgia. *Am. J. Epidemiol.* 133: 471–476.
- TANRIVERDI S., ARSLAN M. O., AKIYOSHI D. E., TZIPORI S., WIDMER G. 2003:** Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130: 13–22.
- THOMPSON R. C., OLSON M. E., ZHU G., ENOMOTO S., ABRAHAMSEN M. S., HIJJAWI N. S. 2005:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 59: 77–158.
- THURSTON-ENRIQUEZ J. A., WATT P., DOWD S. E., ENRIQUEZ R., PEPPER I. L., GERBA C. P. 2002:** Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J. Food Prot.* 65: 378–382.
- TIANGTIP R., JONGWUTIWES S. 2002:** Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health* 7: 357–364.
- TORRES J., GRACENEA M., GOMEZ M.S., ARRIZABALAGA A., GONZALEZ-MORENO O. 2000:** The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Vet. Parasitol.* 92: 253–260.
- TŮMOVA E., SKŘIVAN M., MAROUNEK M., PAVLÁSEK I. LEDVINKA Z. 2002:** Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Avian Dis.* 46: 203–207.
- TYZZER E. E., 1907:** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 5: 12–13.
- TYZZER E. E. 1910:** An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23: 487–511.
- TYZZER E. E. 1912:** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394–412.

- TZIPORI S., SMITH M., MAKIN T., HALPIN C. 1982:** Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from calf faeces. *Vet. Parasitol.* 11: 121–126.
- UPTON S. J. 1990:** *Cryptosporidium* spp. in lower vertebrates, In: Dubey J. P., Speer C. A., Fayer R. (Eds.), *Cryptosporidiosis of Man and Animals*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 149–156.
- VALIGUROVÁ A., JIRKŮ M., KOUDELA B., GELNAR M., MODRÝ D., ŠLAPETA J. 2008:** *Cryptosporidia*: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *Int. J. Parasitol.* 38: 913–22.
- VÍTOVEC J., HAMADEJOVÁ K., LANDOVÁ L., KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B. 2006:** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in preand post-weaned pigs. *J. Vet. Med.* 53: 239–243.
- VÍTOVEC J. A KOUDELA B. 1992:** Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. *Vet. Parasitol.* 43: 25–36.
- WARREN K. S., SWAN R. A., MORGAN-RYAN U. M., FRIEND J. A., ELLIOT A. 2003:** *Cryptosporidium muris* infection in bilbies (*Macrotis lagotis*). *Aust. Vet. J.* 81: 739–741.
- 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. *Am. J. Clin. Pathol.* 72: 473–478.
- XIAO L., BERN C., ARROWOOD M., SULAIMAN I., ZHOU L., KAWAI V., VIVAR A., LAL A. A., GILMAN R. H. 2002:** Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. *J. Infect. Dis.* 185: 1846–1848.
- XIAO L., ESCALANTE H., YANG C. F., SULAIMAN I., ESCALANTE A., MONTALI R. J., FAYER R., LAL A. A. 1999:** Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1578–1583.
- XIAO L., FAYER R. 2008:** Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* 38: 1239–1255.
- XIAO L., FAYER R., RYAN U., UPTON S. J. 2004c:** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:72–97.

- XIAO L., FENG Y. 2008:** Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52: 309–323.
- XIAO L., MOORE J. E., UKOH U., GATEI W., LOWERY C. J., MURPHY T. M., DOOLEY J. S., MILLAR B. C., ROONEY P. J., RAO J. R. 2006:** Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4461–4463.
- XIAO L., RYAN U. M. 2004a:** *Cryptosporidiosis*: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17: 483–490.
- XIAO L., RYAN U. M., GRACZYK T. K., LIMOR J., LI L., KOMBERT M., JUNGE R., SULAIMAN I. M., ZHOU L., ARROWOOD M. J., KOUDELA B., MODRY´ D., LAL A. A. 2004b:** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 891–899.
- XIAO L., SULAIMAN I. M., RYAN U. M., ZHOU L., ATWILL E. R., TISCHLER M. L., ZHANG X. C., FAYER R. 2000:** Host adaptation and host–parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int. J. Parasitol.* 32: 1773–1785.
- ZINTL A., NEVILLE D., MAGUIRE D., FANNING S., MULCAHY G., SMITH H. V., DE WAAL T. 2007:** Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. *Parasitol.* 134: 1575–1582.

## 9. UPLATNĚNÍ VÝSLEDKŮ

Část této práce byla uveřejněna v časopise *Experimental Parasitology* - Kváč M., Kestřánová M., Květoňová D., Kotková M., Ortega Y., McEvoy J., Sak B. *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Experimental Parasitology* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.016>