

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Živočišné biotechnologie

Katedra: Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Vedoucí katedry: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Diverzita kryptosporidií infikujících hlodavce podčeledi
Arvicolinae v České republice

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

Autor: Bc. Ivana Hájková

České Budějovice, duben 2013

Souhrn

V roce 2012 byl sledován výskyt *Cryptosporidium* v České republice u podčeledi Arvicolinae, za účelem zjištění prevalence a porozumění úlohy divokých hlodavců v souvislosti s přenosem tohoto parazita – na lidi a hospodářská zvířata. Celkově bylo odebráno 152 vzorků trusu, 129 od hrabošů polních (*Microtus arvalis*) a 23 od norníků rudých (*Clethrionomys glareolus*) z 9 různých lokalit. Všechny vzorky byly vyšetřeny na přítomnost *Cryptosporidium* sp. pomocí specifického barvení anilin-carbol-methyl violetí a pomocí molekulárních metod. Při odběru vzorků byl zjišťován věk a pohlaví zvířat, rovněž i konzistence trusu. Mikroskopické vyšetření odhalilo přítomnost oocyst *Cryptosporidium* sp. u 2 vzorků hraboše polního a 2 vzorků norníka rudého. Molekulární genotypizace byla provedena na základě PCR amplifikace genů kódující malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) a aktin. Specifická DNA kryptosporidií byla detekována v deseti vzorcích, z toho 4 z hraboše polního a 6 z norníka rudého, včetně těch mikroskopicky pozitivních. U žádného pozitivního zvířete nebyly pozorovány klinické příznaky kryptosporidiózy. Sekvenční a následné fylogenetické analýzy prokázaly přítomnost 2 nových genotypů *Cryptosporidium* izolovaných z norníka rudého a 2 genotypů izolovaných z hraboše polního, fylogeneticky odlišných od dosud známých druhů a genotypů. V budoucnu je třeba prověřit hostitelskou specifitu pomocí experimentálních infekcí.

Klíčová slova: *Cryptosporidium*; hrabošovité; prevalence; PCR; fylogenetika

Abstract

In order to examine the prevalence of *Cryptosporidium* in wild Arvicolinae in the Czech Republic and understand the role that wild rodents play in the transmission of this parasite to humans and livestock, 152 faecal samples from 129 common voles (*Microtus arvalis*) and 23 bank voles (*Clethrionomys glareolus*) were collected on 9 localities in 2012. All samples were examined for presence of *Cryptosporidium* sp. using both the aniline-carbol-methyl violet staining method and molecular tools. The age, sex and faecal consistency were noted at the time of sampling. Microscopical examination revealed the presence *Cryptosporidium* sp. oocysts in 2 samples originated from common voles and 2 samples from bank voles. Genotyping was done through PCR amplification and characterization of the SSU rRNA and actin loci. *Cryptosporidium* specific DNA was detected in 10 samples (4 from common voles and 6 from bank voles) including those microscopically positive. *Cryptosporidium* infection was not linked to diarrhoea. Sequence and following phylogeny analyses revealed two new *Cryptosporidium* genotypes originated from bank voles and two new genotype from common vole, phylogenetically distinct from known species and genotypes. The host specificity needs to be verified by experimental infection in the future.

Key words: *Cryptosporidium*; Arvicolinae; prevalence; PCR; phylogeny

Touto cestou bych ráda poděkovala celému kolektivu Laboratoře Veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za ochotu, pomoc a přátelské jednání, především pak mému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady. Dále pak chci poděkovat všem, co mi byli nápomocni při sběru vzorků.

Tato studie byla finančně podpořena grantovou agenturou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (011/2013/Z) a grantovým projektem Ministerstva školství, tělovýchovy a mládeže Kontakt II (LH11061).

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma „Diverzita kryptosporidií infikujících hlodavce podčeledi Arvicolinae v České republice“ jsem vypracovala samostatně 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 1. 5. 2013

.....

Bc. Ivana Hájková

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Literární přehled.....	8
2.1 Historie	8
2.2 Taxonomické zařazení.....	9
2.3. Vývojový cyklus.....	9
2.4. Hostitelská specifita	12
2.5. Způsoby přenosu	12
2.6. Klinické příznaky kryptosporidiózy	12
2.7. Terapie kryptosporidiózy a její tlumení	13
2.8. Kryptosporidióza hlodavců	14
2.9. Charakteristika odchycených zvířat	16
2.9.1 Hraboš polní (<i>Microtus arvalis</i>)	16
2.9.2. Norník rudý (<i>Clethrionomys glareolus</i>)	17
3. Cíle.....	18
4. Metodika a materiál.....	19
4.1. Charakteristika lokalit	19
4.2. Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření	20
4.3. Barvení oocyst kryptosporidií anilin-karbol-methyl-violetí dle Miláčka a Vítovce (1985).....	20
4.4. Izolace DNA.....	21
4.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	22
4.6. Gelová elektroforéza	24
4.7. Příprava vzorků k sekvenaci.....	25
4.8. Sekvence a fylogenetická analýza	25
4.9. Statistická analýza	25
5. Výsledky	26
5.1. Vliv věku, pohlaví a konzistence trusu na výskyt kryptosporidiózy.....	27
5.2. Genotypizace a fylogenetické analýzy	27
5.3. Intenzita infekce v závislosti na genotypu kryptosporidie	29
6. Diskuze	30
7. Závěr.....	33
8. Seznam použité literatury.....	34

1. Úvod

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou jednobuněční paraziti s epitelulární lokalizací infikující převážně gastrointestinální trakt celé řady obratlovců, včetně člověka. Ačkoli byl rod *Cryptosporidium* popsán již na začátku 20. století, celosvětového významu se mu dostalo až v osmdesátých letech spolu s popisem prvních lidských infekcí, pandemií AIDS a zvyšujícím se výskytem kontaminací vody a potravin vedoucí k vzniku rozsáhlých epidemií (Casemore et al. 1985). Infekční stádia, oocysty, jsou velmi odolná nepříznivým podmínkám prostředí a přežívají velmi dlouhou dobu. Ve vhodných podmínkách, např. ve vlhké půdě nebo v povrchové vodě si mohou zachovat svou infekčnost až šest měsíců (Fayer et al. 1998). Navíc jsou ihned po vyloučení z těla hostitele plně infekční a jsou spolu s výkaly infikovaných zvířat uvolňovány do životního prostředí ve velkém množství. Nemoc způsobenou těmito parazity nazýváme kryptosporidióza. Může mít akutní, subakutní nebo chronický průběh. Infekce je často doprovázena silným průjemovým onemocněním spojeným s úbytkem hmotnosti a dehydratací (Xiao et al. 2004). Vzhledem k široké hostitelské specifitě a všudypřítomnosti oocyst v životním prostředí se mohou lidé nakazit hned několika způsoby, požitím kontaminované potravy, vodou a v neposlední řadě přímým kontaktem s infikovaným jedincem (Fall et al. 2003).

Člověk je vnímavý minimálně k 20 různým druhům a genotypům kryptosporidií a divoká zvířata, zejména hlodavci představují významný přírodní rezervoár (Bajer et al. 2003; Chalmers et al. 1997; Morgan et al. 1999; Webster a Macdonald 1995).

2. Literární přehled

2.1 Historie

Jako první popsal rod *Cryptosporidium* Ernest Edward Tyzzer v roce 1907. Prvoka, kterého našel v žaludečním epitelu myši (*Mus musculus*) pojmenoval jako *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907, 1910). O pět let později popsal nový druh *C. parvum*, parazitující v tenkém střevě laboratorní myši (Tyzzer 1912). Během následujících devadesáti let bylo na seznam hostitelů *C. parvum* přidáno více než 150 savců a to především na základě morfologie oocyst (Fayer et al. 2000). Molekulární analýzy prokázaly výskyt dvou genotypů – genotyp 1 přenášený se z člověka na člověka a genotyp 2, který se přenáší mezi zvířetem a člověkem (Peng et al. 1997). V roce 1955 byl popsán další nový druh *Cryptosporidium meleagridis*, jenž jako první druh, způsoboval smrt hostitele (Slavin 1955).

Medicinského významu se kryptosporidii dostalo až v roce 1976, kdy byly zveřejněny studie, potvrzující výskyt těchto parazitů u lidí (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976).

V letech 1978–1980 bylo pro detekci oocyst používáno specifické barvení Giemsovou nátěří z výkalů lidí a skotu (Pohlenz et al. 1978; Tzipori et al. 1980). Henricksen a Pohlenz (1981) modifikovali metodu dle Ziehl–Neelsena, která je prakticky beze změny používána dodnes.

V roce 1982 začala být kryptosporidie spojována se zvýšenou mortalitou AIDS pacientů (Pitlik et al. 1983). Vývoj neinvazivní laboratorní metody založené na barvení oocyst ve výkalech vedl k intenzivnímu výzkumu s vědomím, že kryptosporidie jsou významnou příčinou průjmu u imunokompetentních a imunodeficitních po celém světě.

Do širokého povědomí se kryptosporidie dostávají v souvislosti s největší epidemií kryptosporidie způsobenou *C. hominis* v roce 1993 v Milwaukee, (Wisconsin, USA), kdy bylo prostřednictvím pitné vody nakaženo více než 400 000 osob (MacKenzie et al. 1994; Peng et al. 1997).

2.2 Taxonomické zařazení

Kryptosporidie jsou řazeny do kmene Apicomplexa, jehož název je odvozen od apikálního komplexu přítomného ve vývojových stádiích zástupců tohoto kmene. Je to soubor několika organel na předním pólu těch stádií životního cyklu, která vnikají ať částečně, či úplně do buněk hostitele. Zařazení rodu *Cryptosporidium* do samostatné třídy apikomplex si vyžádaly některé zvláštní vlastnosti jeho zástupců, kteří se sice podobají kokcidiím (ke kterým byli původně řazeni), ale jejichž nejbližší příbuzní, jak ukazuje molekulární fylogenetika, jsou zřejmě gregariny (Volf a Horák 2007).

Biologie a taxonomie druhu je předmětem intenzivního výzkumu (Xiao et al. 2004). V posledních letech bylo několik známých genotypů uznáno za samostatné druhy. *Cryptosporidium hominis* dříve známé jako *C. parvum* genotype I, *C. suis* dříve známý jako *Cryptosporidium pig* genotype I nebo *C. bovis*, dříve nazývaný jako bovine genotype B (Fayer et al. 2005; Morgan et al. 2002; Ryan et al. 2004). Tento trend bude pravděpodobně pokračovat.

2.3. Vývojový cyklus

Kryptosporidie lze rozdělit do dvou základních skupin: ty které jsou lokalizovány ve střevě a druhy infikující žaludeční sliznici svých hostitelů. Obě skupiny infikují všechny třídy obratlovců. Mnoho druhů a genotypů má široké hostitelské spektrum. Kryptosporidie potřebují k přežití a rozmnožování hostitele (Kim et al. 2005; Mansfield a Gajadhar 2004). Vývojový cyklus se skládá z asexuálního a sexuálního stádia (Smith et al. 2005; Thompson et al. 2005) a lze ho rozdělit na fáze excystace, merogonie, gamogonie a sporogonie. Jediným exogenním vývojovým stádiem je oocysta, která je tvořena tuhou třívrstvou stěnou a zajišťuje ochranu sporozoitů (DuPont et al. 2011). Velikost oocyst se liší podle druhu, obsahují 4 volně uložené sporozoity a poměrně velké reziduální tělíčko. Nemají mikropyle a jejich stěna je téměř bezbarvá s charakteristickou suturou na jednom z pólu (Fayer 2007). Vývojový cyklus je znázorněn níže (obrázek 1).

Excystace

Endogenní fáze začíná požitím oocysty vhodným hostitelem. Ve stěně spory je sutura, která při excystaci praská vlivem nízkého pH v žaludku, pankreatických enzymů a žlučových solí. Po otevření oocysty dochází k uvolnění čtyř sporozoitů

(Fayer et al. 1990). Pohybliví sporozoiti aktivně pronikají k cílovým buňkám hostitele (Wetzel et al. 2005). Následně vznikají vývojová stádia-trofozoiti (Lumb et al. 1988).

Nepohlavní dělení (Merogonie)

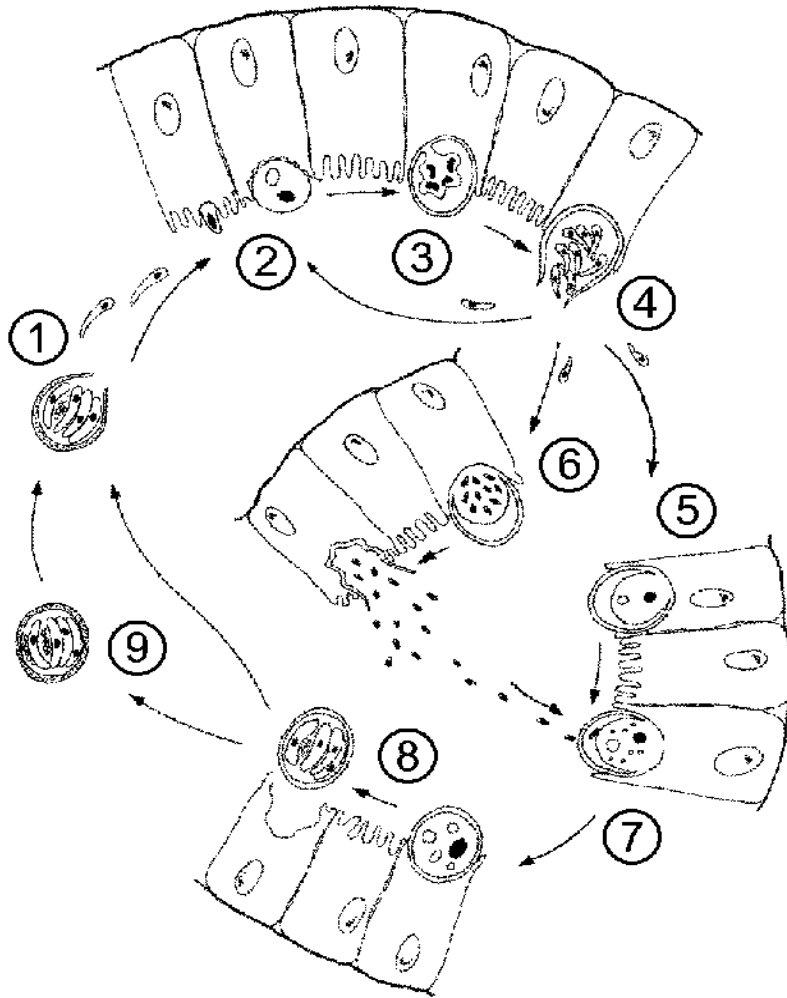
Nepohlavní dělení se nazývá merogonie (schizogonie), dochází při něm k dělení jádra a buněk trofozoitů. Postupně vznikají dva odlišné typy merontů. Meronti typu I vytvářejí 6–8 merozoitů, které napadají další enterocyty a vyvíjejí se v další meronty typu I nebo II. Meronti typu II vytvářejí čtyři merozoity.

Pohlavní rozmnožování (Gamogonie)

Merozoiti typu II vstupují do sexuálního dělení po infikování nových hostitelských buněk a vytvářejí gamonty, samčí mikrogamety a samičí makrogamonty. Z mikrogamontů vznikají bičíkaté mikrogamety, které oplodňují makrogamety vzniklé z makrogamontů. Pouze oplozené makrogamety se mohou vyvinout v zygotu.

Sporogonie

Oocysty sporulují *in situ*, když dozrají, obsahují čtyři sporozoity. Oocysty v gastrointestinálním traktu jsou vylučovány s výkaly, zatímco ty v respiračním traktu opouští hostitele s respiračními nebo nosními sekrety. Tenkostěnné oocysty (20 %) excystují v těle hostitele a způsobují autoinfekci. Silnostěnné oocysty (80 %) opouštějí tělo hostitele s výkaly a mohou infikovat další hostitele (Current 1985; 1988; Fayer a Xiao 2008; Volf a Horák 2007).



Obrázek 1. Životní cyklus rodu *Cryptosporidium*. Excystace 1, 2 – Sporozoiti uvolnění z oocysty vyhledávají povrch střevní sliznice hostitele a usidlují se v zóně mikroklků, vznikají vývojová stadia – trofozoiti. Na hostitelských buňkách jsou umístěny epicelulárně. **Merogonie (asexuální dělení) 3, 4** – Dojde k vytvoření parazitoforní vakuoly, růst merontu a jeho rozpad na 8 merozoitů, kteří merogonii opakují. **Gamogonie (sexuální dělení) 5, 7** – Merozoiti typu II vstupují do sexuálního dělení a vytvářejí gamonty, samčí mikrogamonty a samičí makrogamonty. Z mikrogamontů vznikají bičíkaté mikrogamety, které oplodňují makrogamety vzniklé z makrogamontů. Pouze oplozené makrogamety se mohou vyvinout v zygotu. **Sporogonie 8, 1** – Zygota prochází sporogonií a vytváří jeden ze dvou typů oocyst – tenkostěnné a tlustostěnné. Tenkostěnné oocysty (20 %) excystují v těle hostitele a způsobují autoinfekci. Silnostěnné oocysty (80 %) opouštějí tělo hostitele s výkaly a mohou infikovat další hostitele modifikováno dle Smith a Rose (1998).

2.4. Hostitelská specifita

Většina druhů kryptosporidií nejsou striktně hostitelsky specifické. Například *C. parvum* bylo identifikováno u myši, skotu, koní a mnoha dalších savců. Jiné druhy, včetně *C. baileyi*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* a *C. muris* jsou hostitelsky specifické pro kuřata, psy, kočky, krocany, respektive pro myši. Bylo prokázáno, že mají schopnost infikovat i lidi, a proto musí být považovány za zoonotické druhy (Caccio et al. 2002; Ditrich et al. 1991; Guyot et al. 2001; Pedraza-Diaz et al. 2000, 2001; Xiao et al. 2001). Izolát *C. hominis* nalezený u dugonga, vodního savce vyvrátil teorii, že je *C. hominis* infekční pouze pro člověka, a proto se řadí rovněž mezi zoonotické druhy (Morgan et al. 2000). Navíc, v rámci laboratorních podmínek bylo zjištěno, že *C. hominis* má schopnost nakazit jehňata, gnotobiotická prasata a telata, ale ne imunosuprimované myši (Akiyoshi et al. 2002; Giles et al. 2001; Pereira et al. 2002; Widmer et al. 2000). Tyto příklady ilustrují složitost pokusu o využití hostitelské specifity, jako znak pro určení druhů.

2.5. Způsoby přenosu

Vzhledem k tomu, že jsou kryptosporidie všudypřítomné v životním prostředí a mají schopnost infikovat širokou škálu hostitelů, včetně člověka, existuje hned několik přenosových cest. Způsoby přenosu mohou být: přímým kontaktem (člověk – člověk, člověk – zvíře, zvíře – zvíře), kontaktem s výkaly nakaženého jedince, pozřením kontaminované potravy nebo vody. Relativní význam těchto přenosových cest v epidemiologii kryptosporidiózy není zcela jasný, do značné míry díky skutečnosti, že tradiční diagnostické způsoby nemají schopnost identifikovat zdroj nákazy (Fall et al. 2003). V poslední době však bylo vyvinuto mnoho molekulárně biologických technik pro detekci a rozlišení kryptosporidií. Tyto techniky jsou nyní stále častěji používané v epidemiologických studiích kryptosporidiózy v endemických a epidemických oblastech a přispívají k pochopení přenosu kryptosporidiózy u lidí a zvířat (Xiao et al. 2007).

2.6. Klinické příznaky kryptosporidiózy

Kryptosporidiové infekce byly detekovány jak u imunodeficitních tak u imunokompetentních pacientů. Klinické projevy se liší v závislosti na zdravotním a nutričním stavu hostitele.

Imunokompetentní hostitelé

Většina případů u imunokompetentních hostitelů jsou sporadické infekce, postihující dospělé i děti, jak v zemích rozvojových tak i vyspělých (Navin 1985). Onemocnění se nejčastěji klinicky projevuje akutním průjmem, chronickým průjmem nebo probíhá asymptomaticky. Infekce vede k onemocnění gastrointestinálního traktu, charakterizovanému neklidem nebo únavou, anorexií, zvracením, bolestmi břicha a křečemi u většiny pacientů. U více než poloviny pacientů se objevuje ztráta hmotnosti, nevolnost, plynatost a teploty do 38 °C, zimnice, pocení nebo bolesti hlavy (Bushen et al. 2007; MacKenzie et al. 1994; Mathieu et al. 2004). Průjem obvykle trvá 6–14 dní, u některých jedinců měsíc a zřídka až 4 měsíce (Isaacs 1985; Jokipii a Jokipii 1986; Soave a Armstrong 1986; Stehr-Green et al. 1987; Wolfson et al. 1985).

Imunodeficitní hostitelé

K onemocnění dochází především u pacientů nakažených virem lidské imunodeficiencie (HIV), zejména u těch s nízkým počtem CD4 T-lymfocytů a u těch s vysoce rizikovým sexuálním chováním. Vysoká prevalence kryptosporidiózy je pozorována rovněž u pacientů podstupujících chemoterapii či transplantaci kostní dřeně, u pacientů po transplantaci orgánů a také u pacientů na hemodialýze (Gentile et al. 1991; Sreedharan et al. 1996; Tanyuksel et al. 1995; Turkcpar et al. 2002).

Průjem u pacientů s AIDS může být fulminantní s průchodem stolice až 2 l za den (Blanshard et al. 1992; Manabe et al. 1998). U těchto pacientů přejde často onemocnění do chronické formy a může urychlit úmrtí jedince (Blanshard et al. 1992; Manabe et al. 1998; Navin a Hardy 1987).

2.7. Terapie kryptosporidiózy a její tlumení

Léčba kryptosporidiózy není příliš efektivní. Testovaná léčiva se ukázala v potřebných množstvích pro organismy jako toxická, částečně nebo zcela neúčinná. Nejčastěji používaná léčiva v humánní medicíně jsou paromomycin, spiramycin, azithromycin a nitazoxanid a u HIV pacientů je to antiretrovirální léčba (Griffiths 1998).

Oocysty kryptosporidií jsou velmi odolné, jsou schopny dlouho přežít za vhodných podmínek, například ve vlhkém a vodním prostředí. Nejvýznamnější faktor, ovlivňující jejich životaschopnost a infektivitu ve vnějším prostředí je teplota.

Vysoké teploty (65 °C po dobu 20 minut, vroucí voda do 1 minuty) je spolehlivě ničí, stejně tak mrazení (teploty pod -20 °C). Kryptosporidie odolávají běžným dezinfekčním prostředkům užívaným při úpravě vody. Silnostěnné oocysty se mohou šířit i přetrvávat v chlorované vodě, proto jsou běžné úpravy vody často neúčinné. Pravděpodobně nejspolehlivějším prostředkem jak inaktivovat oocysty kryptosporidií je jejich ozonizace a úprava vody UV zářením (Betancourt a Rosei 2004).

2.8. Kryptosporidióza hlodavců

Divoká zvířata jsou považována za důležitý zdroj infekčních chorob přenosných na člověka a představují významný problém v oblasti veřejného zdraví a to po celém světě. Jsou součástí epidemiologie většiny zoonóz a slouží jako hlavní rezervoáry původců onemocnění přenášených na domácí zvířata a lidi (Kruse et al. 2004). Nicméně význam divoce žijících zvířat v epidemiologii kryptosporidiózy není zcela jistý. Znečištění životního prostředí lidskými výkaly a výkaly domácích zvířat představuje potenciální riziko nákazy pro divoce žijící zvířata parazity, jako jsou kryptosporidie (Appelbee et al. 2005).

Hlodavci jsou důležití v mnoha ekosystémech, rychle se reprodukují a slouží jako potrava pro predátory a jsou vektory mnoha nákaz. Jejich všudypřítomnost a sdílení stanovišť s hospodářskými zvířaty vedly k epidemiologickému šetření o výskytu a identifikaci druhů kryptosporidií u těchto zvířat (Feng 2008).

V Japonsku byl výskyt oocyst kryptosporidií v potkanech (*Rattus norvegicus*) popsán hned v několika studiích. Iseki (1986) zjistil 10% prevalenci z 61 vyšetřených zvířat, Miyaji et al. (1989) ukázali 21% prevalenci ze 47 zvířat a Yamura et al. (1990) zjistili 2% prevalenci ze 48 *Rattus norvegicus*.

Webster a Macdonald (1995) z Anglie našli oocysty *C. parvum* v 63 % z 73 jedinců *Rattus norvegicus*, chycených na devíti různých farmách v okolí Oxfordshire. Ze studie vyplývá, že divocí potkani představují riziko pro lidi a hospodářská zvířata. Ve třech stálých populacích norských potkanů na zemědělské půdě ve Warwickshire v Anglii byly oocysty *C. parvum* detekovány v 24 % z 438 zvířat (Quy et al. 1999).

Další studie se zabývají výskytem *C. parvum* u myších domácích (*Mus domesticus*). V USA bylo zjištěno 30 % pozitivních z celkového počtu 115 (Klesius et al. 1986).

V Anglii to bylo 33 % z 58 a 24 % z 300 vyšetřených myší (Chalmers et al. 1994 1995). Výzkum na zemědělské půdě v Anglii zjistil přítomnost *C. parvum* v 19 % z 595 divokých hlodavců (*M. domesticus*, *A. sylvaticus* a *C. glareolus*) (Chalmers et al. 1997). Všechna pozitivní zvířata byla asymptomatická. Další výzkum v Anglii, prováděný po dobu 6–ti let (1992–1997) na hospodářských a malých divokých zvířatech prokázal, že kryptosporidie jsou perzistentně a endemicky přítomny u všech sledovaných kategorií savců (Sturdee et al. 2003). Prostřednictvím morfometrické analýzy zjištěných oocyst, byly oocysty *C. parvum* nalezeny u 32,8 % hlodavců žijících v okolí zemědělských objektů a 29,9 % u malých divokých savců (především hlodavců) žijících v oblasti pastvin. Nejvyšší prevalence kryptosporidií byla detekována na podzim. Studie prováděné v Anglii zjistily, že *C. muris* se u malých divokých zvířat (hlavně hlodavců) objevuje jen zřídka (Sturdee et al. 2003).

Studie z Polska ukazuje 15 % pozitivních z 39 vyšetřených myšic (*Apodemus flavicollis*) a 20 % pozitivních nálezů z celkového počtu 275 normiků rudých (*Clethrionomys glareolus*) (Sinski et al. 1993). Později, na té samé lokalitě byla zjištěna 24 % prevalence u 70 *Apodemus* sp., 23 % u 102 *C. glareolus* a celkem čtyři pozitivní hraboši polní (*Microtus arvalis*) (Sinski et al. 1998). Bajer et al. (2002) sledovali prevalenci u tří druhů divokých hlodavců (*A. flavicollis*, *C. glareolus* a *M. arvalis*) v období 1997–1998. Celková prevalence činila 62 % (582/942).

Ve Finsku byly při výzkumu kryptosporidie zjištěny 2 % pozitivních z 41 vyšetřených normiků rudých (*C. glareolus*) a pouhé 1 % pozitivních zvířat ze 131 hrabošů mokřadních (*Microtus agrestis*) (Laakkonen et al. 1994).

Studie ve Španělsku zaměřená na detekci *C. parvum* ukázaly 35,2 % pozitivních z 278 *Apodemus sylvaticus*, 27,3 % z 22 *Mus spretus*, 20,4% z 49 *C. glareolus*, a v 1 *R. rattus* a 1 *A. flavicollis*. *Cryptosporidium muris* bylo detekováno u 4 % ze 49 *C. glareolus*. Kombinované infekce *C. parvum* a *C. muris* byly detekovány u 5,8 % z 278 *A. sylvaticus*, 4,5 % z 22 *M. spretus* a 4 % ze 49 *C. glareolus* (Torres et al. 2000).

Cryptosporidium muris byla v hlodavcích detekována méně často než oocysty *C. parvum*. Oocysty *C. muris* byly nalezené v 26 % z 58, 13 % z 300, a 10 % z 242

přirozeně infikovaných domácích myší (Chalmers et al. 1994, 1995, 1997). Přítomnost *C. muris* byla dále zjištěná u 2 % ze 123 a 43 % ze 114 hrabošů (Bull et al. 1998; Chalmers et al. 1997).

V České republice byly oocysty kryptosporidií morfologicky podobné *C. muris* nalezeny u burunduka páskovaného (*Eutamias sibiricus*). BALB/c myši, experimentálně infikované tímto parazitem, začaly vylučovat oocysty 14.–35. den po infikování. Vývojová stádia *C. muris* byla pak detekována v žaludečních žlázách. Klinické příznaky chyběly jak u burunduků, tak i u experimentálně infikovaných myší (Hůrková et al. 2003).

Mezi další druhy a genotypy kryptosporidií infikující hlodavce patří *C. andersoni* nalezené u sviště bobaka (*Marmota bobak*) (Ryan et al. 2003a), *C. wrairi* detekované u morčete domácího (*Cavia aperea porcellus*) (Feng et al. 2010), *C. melagridis* u křečička dlouhoocasého (*Peromyscus maniculatus*) (Feng et al. 2007; Xiao et al. 2002), *C. tyzzeri* (dříve mouse genotype I) (Morgan et al. 1999). U hrabošů byla detekovaná infekce způsobena *Cryptosporidium* vole genotype a muskrat genotype II (Feng et al. 2007; Ziegler et al. 2007). Bylo zjištěno, že veverky jsou infikovány *C. parvum*, *C. muris*, *Cryptosporidium* squirrel genotype, cervine genotype, ferret genotype, skunk genotype, chipmunk genotype I a deer mouse genotype III (Feng et al. 2007; Kváč et al. 2008; Sundberg et al. 1982; Ziegler et al. 2007)

U hlodavců byly detekovány i druhy, které primárně infikují jiné hostitele. Například *Cryptosporidium ubiquitum* se obvykle vyskytuje u jelenovitých, jako jsou jelen sika (*Cervus nippon*), jelenec běloocasý (*Odocoileus virginianus*), bulovec běločelý (*Damaliscus pygargus phillipsi*), nyaly jižní (*Tragelaphus angasii*) a u dalších zvířat. Bylo zjištěno, že přirozeně infikuje i celou řadu hlodavců (Feng et al. 2007; Perz a Le Blancq 2001; Ryan et al. 2003b).

2.9. Charakteristika odchycených zvířat

2.9.1 Hraboš polní (*Microtus arvalis*)

Tento druh hraboše patří mezi naše nejběžnější drobné savce. Hřbet je žlutošedý, šedohnědý nebo slabě narezavělý, břicho bývá šedobílé se žlutým nádechem. Mezi důležité určovací znaky patří menší silný ušní boltec s hustým porostem krátkých chlupů, nepigmentovaná chodidla zadních končetin a ocas dosahující 30–40 % délky

těla. Vyskytuje se na celém území ČR, je typickým obyvatelem suchých stanovišť otevřené krajiny a kulturní stepi, ale v dobách přemnožení proniká i do prosvětlených lesů (Anděra a Horáček 2005).

Hraboš polní je aktivní především v noci. Žije v koloniích, ve kterých jsou jednotlivé nory spojeny vyšlapanými chodníčky. V příznivých podmínkách se může hraboš polní rozmnožovat po celý rok. Samice je březí 19–21 dní, ve vrhu je 4–7 mlád'at (Dobroruka a Berger 2004).

2.9.2. Norník rudý (*Clethrionomys glareolus*)

Od jiných hrabošů se snadno pozná podle nápadně červenavě rezavého zbarvení na hřbetě, větších ušních boltců a delšího ocasu (obvykle 45–60 % délky těla). Břicho mívá světlejší, nažloutlé nebo v zimní srsti někdy až čistě bílé, také tlapy jsou světlé (Anděra a Horáček 2005).

V ČR je norník rudý běžným druhem, rozšířený po celém území. Vyskytuje se od nejnižších poloh (cca 200 m. n. m.) až po pásmo kosodřeviny (cca 1500 m. n. m.). Obývá především lesní komplexy. Nejhojnější je v listnatých a smíšených lesích s pestrou dřevinnou skladbou a bohatým bylinným patrem. S rostoucím věkem porostů se mění a zmenšuje rozsah bylinného patra a početnost norníka klesá (Zejda et al. 2002). Z nelesních stanovišť norník rudý obývá křovinaté meze a stráně, strže, rokliny, hráze a břehy rybníků či rákosiny (Anděra a Beneš 2001). Proniká také do lidských sídel, pokud jsou situována poblíž lesa (Zejda et al. 2002).

Jako jediný z našich hrabošů se ve větší míře zajímá i o živočišnou potravu. Rozmnožuje se od konce března do září až října. Normální doba březosti trvá 16–18 dní, ve vrhu bývá 4–5 mlád'at (Anděra a Horáček 2005).

3. Cíle

- Vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikujících hlodavce podčeledi Arvicolinae.
- Posoudit vliv věku a pohlaví na diverzitu a prevalenci kryptosporidií.
- Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp kryptosporidií.
- Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů.

4. Metodika a materiál

Odchyty zvířat pro parazitologické vyšetření probíhaly v období červenec–září 2012 na 9 lokalitách v jižních Čechách. Výběr lokalit vycházel ze souhrnu poznatků o bionomii hrabošů a norníků a z vlastních zkušeností. Odchyt byl prováděn do dřevěných sklapovacích pastí, které se osvědčily jako nejúčinnější. Jako návnada byl použit tvrdý sýr nebo chléb. Pasti byly rozmístěny nelineárně v různých vzdálenostech a kontrolovány po 12 hodinách.

4.1. Charakteristika lokalit

zahrada – Hluboká nad Vltavou – Zámostí: Klidnější lokalita s ovocnými stromy, která se nachází na slunné části svahu.

les – Opatovice: Lokalita u vesnice Opatovice, jedná se o pás listnatých stromů s velmi bujným podrostem, s touto lokalitou sousedí pole. Lokalita byla stinná s velmi bohatým podrostem.

pole – Turovec: Trvalý travní porost, spíše stinná lokalita, sousedící s lesem a ornou půdou.

pole – Košice: Travnaté neobdělávané pásy mezi poli, lokalita v blízkosti zemědělského družstva.

hřbitov – Tábor: Trvalý travní porost, slunečná lokalita, v blízkosti lidských obydlí.

pole – Brandlín: Okraje pole s pšenicí, mírný svah, jedná se o vlhčí biotop.

pole – Myslkovice: Travnatý neobdělávaný pás mezi dvěma poli s ozimou řepkou.

pole – Katov: Travnaté neobdělávané porosty kolem skruží na oraništích po jetelovinách.

pole – Choustník: Silniční příkopy sousedící s polem, travnaté neobdělávané porosty kolem sloupů elektrického vedení.

Tabulka 1. Seznam odchytových lokalit včetně rozlohy a počtu odchycených jedinců

Lokalita	GPS souřadnice	Rozloha lokality	Počet odchycených jedinců	
			<i>Microtus arvalis</i>	<i>Clethrionomys glareolus</i>
zahrada	49.052298,14.455926	90 m ²	0	3
les - Opatovice	49.031425,14.454832	1500 m ²	2	12
pole - Turovec	49.388016,14.764938	550 m ²	8	0
pole - Košice	49.324730,14.764230	1100 m ²	54	0
Tábor - hřbitov	49.398131,14.689381	150 m ²	1	0
pole - Brandlín	49.303825,14.791718	550 m ²	11	0
pole - Myslkovice	49.299270,14.763544	350 m ²	6	0
pole - Katov	49.279257,14.846370	1250 m ²	34	8
pole - Choustník	49.334184,14.821458	750 m ²	13	0

4.2. Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření

Odchycená zvířata byla uložena do chladicího boxu a v co nejkratší době podrobena pitvě. Z každého jedince byl odebrán obsah žaludku a tlustého střeva. Tyto vzorky byly následně natřeny na podložní sklíčko a část byla uschována v 1,5 ml plastových uzavíratelných mikrozskumávkách. Vzorky byly zality 2,5% dichromanem draselným a uchovávány v chladu při teplotě 4 °C. Všechny odebrané vzorky byly mikroskopicky a za pomoci molekulárních metod vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu.

4.3. Barvení oocyst kryptosporidií anilin–karbol–methylvioletí dle Miláčka a Vítovce (1985)

Zásobní roztoky:

Roztok anilin–karbol–methyl–violetí

0,6 g methyl violetí

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:

1. Sklíčko s nátěrem fixovat methanolem v plameni.
2. Obarvit anilin–karbol–methyl–violetí po dobu 30 min.
3. Omýt pod tekoucí vodou.
4. Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 2 minut.
5. Omýt pod tekoucí vodou.
6. Barvit po dobu 1–2 min. v roztoku tartrazinu.
7. Omýt pod tekoucí vodou.
8. Po osušení prohlížet světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

U mikroskopicky pozitivních nátěrů byla odhadnuta intenzita infekce kryptosporidií dle Kváč et al. (2007).

4.4. Izolace DNA

Genomová DNA byla izolována ze všech získaných vzorků pomocí komerčního PSP spin stool DNA kitu – Invitek s mírnou modifikací dle Sak et al. (2008).

Pracovní postup:

1. Vzorek trusu vložit do mikrozkušavky (Safe–Lock–Tube), přidat skleněné kuličky o průměru 0,5 mm.
2. Připipetovat 1,0 ml Lysis Buffer P a rozbít 1 minutu pomocí homogenizátoru (FastPrep-24 instrument, MP Biomedicals, USA) při rychlosti 5,5 m/s.
3. Inkubovat v termobloku po dobu 10 minut při teplotě 95 °C.
4. Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
5. Přenést veškerý supernatant do mikrozkušavek (Invi–Adsorb–Tube), homogenizovat a inkubovat 1 minut při laboratorní teplotě.
6. Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.

7. Supernatant napipetovat do čistých mikrozkušavek a centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
8. Do čistých mikrozkušavek nepipetovat 25 µl Proteinase K a přidat 400 µl supernatantu, homogenizovat.
9. Inkubovat v termobloku 10 minut při teplotě 70 °C.
10. Připipetovat 400 µl Binding Buffer P, homogenizovat.
11. Přepipetovat veškerý objem do Spin Filter Tube.
12. Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě.
13. Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
14. Vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, napipetovat na kolonu 500 µl Wash I, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
15. Vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, napipetovat na kolonu 800 µl Wash II, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
16. Vylít odpad a znovu centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
17. Kolonu vložit do čisté mikrozkušavky, napipetovat 200 µl předehřátého Elution Buffer D na kolonu.
18. Inkubovat 1 minuty při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minuty při 8 000 g.
19. Skladovat v mrazicím boxu, při teplotě -20 °C.

4.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) byl použit nested PCR protokol dle Jiang et al. (2005). Jednotlivé reakční směsi polymerázové reakce měly objem 20 µl, množství použitých chemikálií je uvedeno v tabulce 2. Pro primární i sekundární PCR byl použit stejný amplifikační program: počáteční denaturace 3 min při 94 °C, 35 cyklů zahrnujících denaturaci 45 s při 94 °C, nasedací teploty primerů 55 °C 45 s, extenze 60 s při 72 °C, a finální extenze 10 min při 72 °C. Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 2 µl primárního PCR produktu. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Cryptosporidium andersoni*.

Sety primerů pro amplifikaci SSU:

Primární primery

F1 5'-TCTAGAGCTAATACATGCG-3'

R1 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'

Sekundární primery

F2 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

R2 5'-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3'

Tabulka 2. PCR protokol pro amplifikaci části genu kódujícího SSU rRNA

Primární reakce			Sekundární reakce		
H ₂ O	-----	12,30 µl	H ₂ O	-----	13,10 µl
MgCl ₂	(25 mM)	1,20 µl	MgCl ₂	(25 mM)	1,20 µl
10Xbuffer	-----	2,00 µl	10Xbuffer	-----	2,00 µl
dNTP	10 mM	0,40 µl	dNTP	10 mM	0,40 µl
forward	10 µM	0,40 µl	forward	10 µM	0,40 µl
reverse	10 µM	0,40 µl	reverse	10 µM	0,40 µl
BSA	(10 mg/ml)	0,80 µl	-----	-----	-----
taq	(1U/1µl)	0,50 µl	taq	(1U/1µl)	0,50 µl
DNA	-----	2,00 µl	DNA	-----	2,00 µl
Celkem	-----	20,00 µl	Celkem	-----	20,00 µl

Vzorky pozitivní na přítomnost kryptosporidií byly ověřeny pomocí amplifikace části genu kódujícího SSU rRNA a následně byla provedena PCR na detekci genu kódujícího AKTIN. Amplifikační program byl stejný jako u SSU, lišily se pouze nasedací teploty, v primární PCR 50 °C, v sekundární PCR 45 °C. Množství použitých chemikálií uvádí tabulka 3. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Cryptosporidium andersoni*.

Sety primerů pro amplifikaci genu AKTIN:

Primární primery

F1 5'-ATGCCVGGWRTWATGGTDGGTATG-3'

R1 5'-GGDGCAACRACYTTRATCTTC-3'

Sekundární primery

F2 5'-GAYGARGCHCARTCVAARAGRGTAT-3'

R2 5'-TTDATYTTTCATDGTHGAHGGWGC-3'

Tabulka 3. PCR protokol pro amplifikaci části genu kódujícího AKTIN

Primární reakce			Sekundární reakce		
H ₂ O	-----	11,20 µl	H ₂ O	-----	12,10 µl
MgCl ₂	(25 mM)	1,20 µl	MgCl ₂	(25 mM)	1,20 µl
10Xbuffer	-----	2,00 µl	10Xbuffer	-----	2,00 µl
dNTP	10 mM	0,40 µl	dNTP	10 mM	0,40 µl
forward	10 µM	0,40 µl	forward	10 µM	0,40 µl
reverse	10 µM	0,40 µl	reverse	10 µM	0,40 µl
BSA	(10 mg/ml)	0,40 µl	-----	-----	
taq	(1U/1µl)	1,00 µl	taq	(1U/1µl)	1,00 µl
DNA	-----	3,00 µl	DNA	-----	2,50 µl
Celkem	-----	20,00 µl	Celkem	-----	20,00 µl

4.6. Gelová elektroforéza

Výsledné produkty ze sekundární PCR byly podrobeny elektroforéze na 1 % agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu a vizualizovaný pomocí UV záření (302 nm).

Použité 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:

1. Agarózu smíchat s 1× TAE puforem (pro 1% gel smíchat 0,4 g agarózy se 40 ml TAE pufru)
2. Nechat agarózu rozpustit v mikrovlnné troubě, následně ochladit pod tekoucí vodou přibližně na teplotu 50 °C.
3. Přidat ethidium-bromid, promíchat.
4. Do připravené formy nalít gel, vložit hřeben a nechat ztuhnout.
5. Po ztuhnutí vyjmout hřebeny a vložit gel do elektroforetické vany naplněné TAE puforem.

6. Do jamek nanést 10 µl PCR sekundárního produktu a 2× 10 µl ladderu.
7. Nastavit napětí na 70 V a spustit na dobu potřebnou pro separaci DNA fragmentů.
8. Pro vizualizaci DNA fragmentů použít UV transiluminátor.

4.7. Příprava vzorků k sekvenci

1. Fragментy DNA vyříznout z gelu pomocí skalpelu a umístit do 1,5 ml mikrokumavky.
2. Následně vyizolovat DNA pomocí kitu QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) dle návodu uvedeného výrobcem.

4.8. Sekvence a fylogenetická analýza

Sekundární produkty z PCR byly sekvenovány za použití sekundárních primerů. K sekvenaci byl použit ABI BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing kit a sekvenátor ABI3130.

Získané sekvence byly ručně upraveny pomocí programu ChromasPro v.1.5 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) a porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GeneBank pomocí programu ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>). Fylogenetické vztahy jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií byly vypočteny Neighbor-Joining metodou založenou na 2 - parametrickém distančním modelu dle Kimury (1980). Bootstrapový konsenzus výsledného stromu byl získán na základě 1000 opakování. Pro konstrukci stromů byl použit program TREECON verze 1.3b.

4.9. Statistická analýza

Rozdíly v prevalenci kryptosporidií v závislosti na věku, pohlaví a konzistenci trusu byly vyhodnoceny pomocí chí-kvadrát testu a rizikového faktoru (OR). Data byla zpracována v programu Epi Info 7.1.1.14 (CDC).

5. Výsledky

Celkem bylo odchyceno 152 jedinců podčeledě Arvicolinae, z toho 129 hrabošů polních (*Microtus arvalis*) a 23 norníků rudých (*Clethrionomys glareolus*).

Z celkového počtu 152 vyšetřených vzorků byla mikroskopicky prokázána přítomnost oocyst kryptosporidií u 4 (2,6 %) jedinců, a to u 2 hrabošů rodu *Microtus arvalis* a 2 *Clethrionomys glareolus*. Na základě PCR amplifikace části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU), byla specifická DNA kryptosporidií detekována v 10 vzorcích, z toho ve 4 z hraboše polního a v 6 z norníka rudého.

Všechny mikroskopicky pozitivní vzorky byly současně i PCR pozitivní. Kryptosporidie byly detekovány na 3 z 9 sledovaných lokalit. Výskyt kryptosporidiových infekcí na jednotlivých lokalitách se pohyboval od 0 do 42,9 % (tabulka 4).

Tabulka 4. Prevalence výskytu kryptosporidií na jednotlivých lokalitách

Lokalita	Druh	Počet pozitivních	Počet negativních	Prevalence (%)
zahrada	<i>Microtus arvalis</i>	0	0	0
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	0	3	0
	Celkem	0	3	0
les - Opatovice	<i>Microtus arvalis</i>	0	2	0
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	6	6	50
	Celkem	6	8	42,9
pole - Turovec	<i>Microtus arvalis</i>	1	7	12,5
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	0	0	0
	Celkem	1	7	12,5
pole - Košice	<i>Microtus arvalis</i>	3	51	5,6
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	0	0	0
	Celkem	3	51	5,6
Tábor - hřbitov	<i>Microtus arvalis</i>	0	1	0
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	0	0	0
	Celkem	0	1	0
pole - Brandlín	<i>Microtus arvalis</i>	0	11	0
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	0	0	0
	Celkem	0	11	0
pole - Myslkovice	<i>Microtus arvalis</i>	0	6	0
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	0	0	0
	Celkem	0	6	0
pole - Katov	<i>Microtus arvalis</i>	0	34	0
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	0	8	0
	Celkem	0	42	0
pole - Choustník	<i>Microtus arvalis</i>	0	13	0
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	0	0	0
	Celkem	0	13	0

5.1. Vliv věku, pohlaví a konzistence trusu na výskyt kryptosporidiózy

Celkem bylo odchyceno 32 juvenilních jedinců, 30 hrabošů polních a 2 norníci rudí. Analýzy dat prokázaly infekci u dvou juvenilních jedinců (6,3 %), dospělých (n=120) bylo infikováno 8 (6,7 %). Nebyl prokázán statisticky významný vztah mezi věkem zvířat a kryptosporidiovými infekcemi ($p=0,63$; tabulka 5).

Žádný z pozitivních jedinců netrpěl průjmovým onemocněním, statistické analýzy neprokázaly vliv kryptosporidiové infekce na zvýšený výskyt průjmových stavů u sledovaných jedinců ($p=0,78$; tabulka 5).

Tabulka 5. Vliv věku a konzistence trusu na přítomnost kryptosporidií

Druh	Kategorie	Vyšetřeno	Negativní	Pozitivní	Průjem	Bez průjmu	Průjem pozitivní
<i>Microtus arvalis</i>	juvenilní	30	29	1	0	29	0
	adultní	99	96	3	8	91	0
<i>Clethrionomys glareolus</i>	juvenilní	2	1	1	1	1	0
	adultní	21	16	5	2	19	0

Z celkového počtu 33 odchycených samců bylo 6,1 % (n=2) pozitivních na přítomnost kryptosporidií v trusu. Obdobná prevalence, 6,7 %, byla detekována i u samic (n=119). Statistická analýza neprokázala vliv pohlaví na přítomnost kryptosporidiových infekcí, a to ani na úrovni jednotlivých druhů hostitelů, ani na úrovni podčeledi ($p=0,79$; tabulka 6).

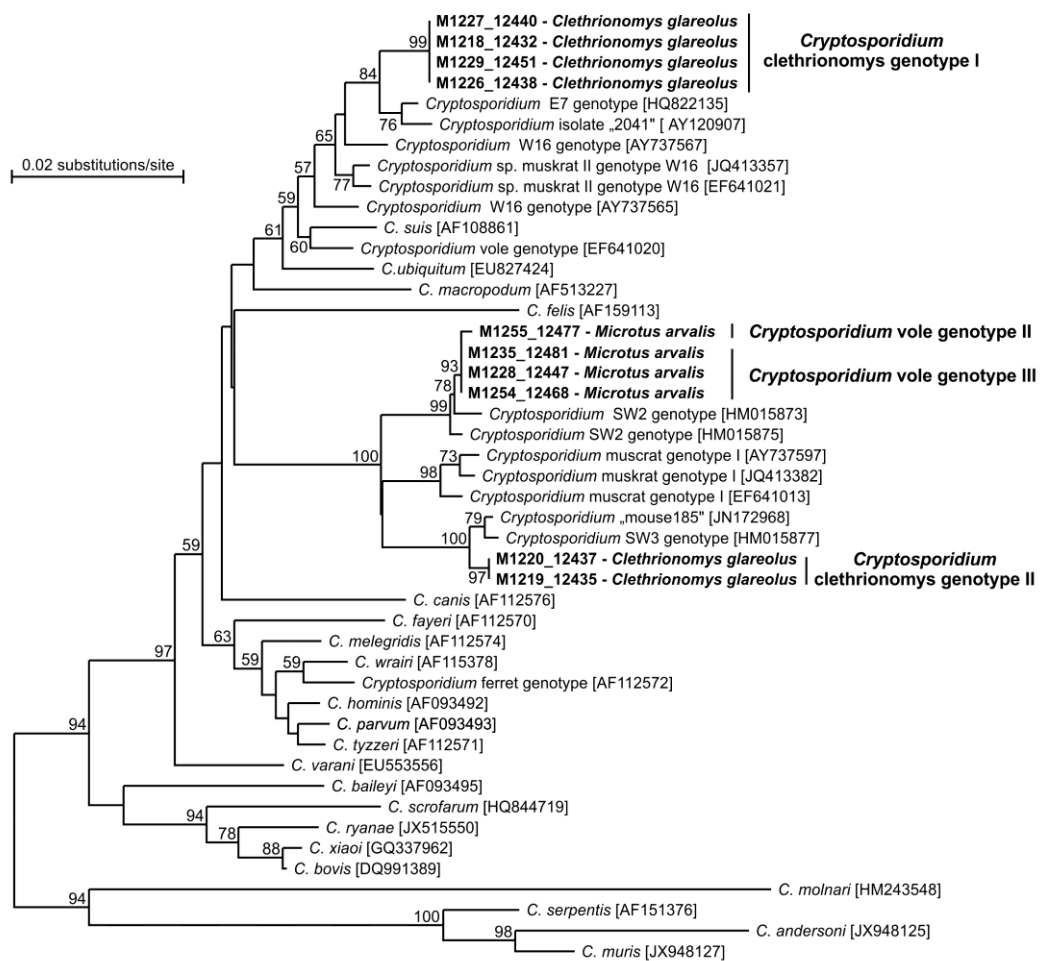
Tabulka 6. Výskyt kryptosporidiových infekcí v závislosti na pohlaví

Druh	Kategorie	Vyšetřeno	Negativní	Pozitivní
<i>Microtus arvalis</i>	samec	23	22	1
	samice	106	103	3
<i>Clethrionomys glareolus</i>	samec	10	9	1
	samice	13	8	5

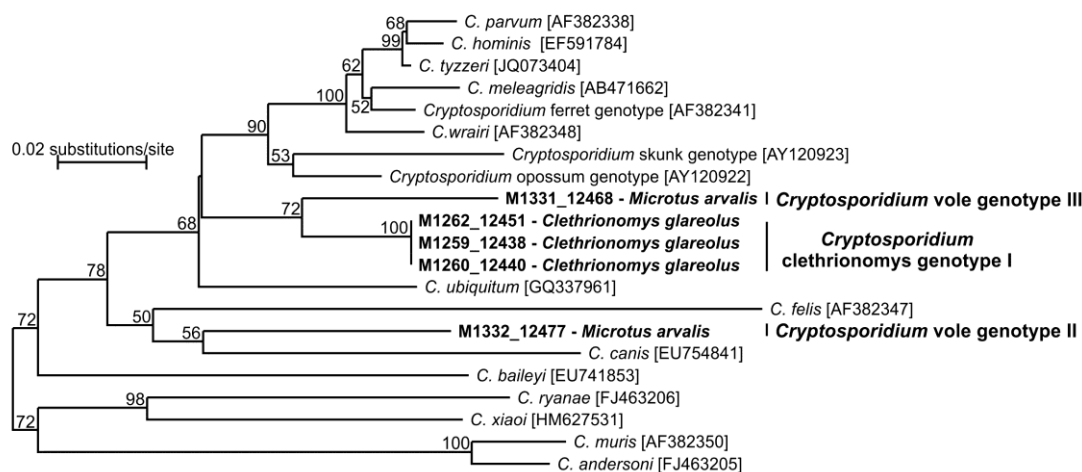
5.2. Genotypizace a fylogenetické analýzy

Z celkového počtu 10 pozitivních vzorků bylo získáno 10 sekvencí SSU a 5 sekvencí aktinu. Následné fylogenetické analýzy prokázaly přítomnost celkem čtyř nových genotypů rodu *Cryptosporidium*. V rámci populace norníka rudého byly detekovány dva odlišné genotypy pracovníčně nazvané *Cryptosporidium clethrionomys* genotype I a *Cryptosporidium clethrionomys* genotype II. Oba dva genotypy byly detekovány na stejné lokalitě (tabulka 7). V populaci hraboše polního byla prokázána přítomnost dvou genotypů *Cryptosporidium vole* genotype II a *Cryptosporidium vole*

genotype III na dvou lokalitách. Fylogenetické analýzy prokázaly 100% identitu všech izolátů v rámci jednotlivých genotypů. Zatímco *Cryptosporidium clethrionomys* genotype I a II jsou si fylogeneticky vzdálené (94,7% identita SSU sekvence), v případě *Cryptosporidium* vole genotype II a *Cryptosporidium* vole genotype III byla detekována velmi vysoká identita SSU sekvencí (99,8 %). Následné analýzy genu kódujícího aktin prokázaly, že *Cryptosporidium clethrionomys* genotype I, *Cryptosporidium* vole genotype II a *Cryptosporidium* vole genotype III jsou samostatné genotypy. V případě *Cryptosporidium clethrionomys* genotype II se nám nepodařilo získat sekvenci genu pro aktin.



Obrázek 2. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií použitých v této studii s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujících malou ribozomální podjednotku (SSU) vytvořený metodou Neighbor-Joining v programu Treecon; 1000× bootstrap; znázorněny hodnoty podpory větví více než 50 %. Izoláty získané v této studii jsou zvýrazněny.



Obrázek 3. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií použitých v této studii s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího aktin vytvořený metodou Neighbor-Joining v programu Treecon; 1000× bootstrap; znázorněny hodnoty podpory větví více než 50 %. Izoláty získané v této studii jsou zvýrazněny.

5.3. Intenzita infekce v závislosti na genotypu kryptosporidie

Intenzita infekce v mikroskopicky pozitivních vzorcích se pohybovala maximálně do 10000 oocyst na gram trusu. Mikroskopicky byla přítomnost kryptosporidií zjištěna u dvou vzorků norníka rudého, v rámci obou genotypů *Cryptosporidium clethrionomys* genotype I a II, ze stejné lokality. Další dva pozitivní vzorky pocházely od hraboše polního a to v rámci jednoho genotypu *Cryptosporidium vole* genotype III na stejné lokalitě (tabulka 7).

Tabulka 7. Intenzita infekce jednotlivých genotypů kryptosporidií na základě mikroskopického vyšetření

Číslo vzorku	Druh zvířete	Genotyp	Lokalita	Intenzita Infekce (OPG)
12440	<i>C. glareolus</i>	<i>Cryptosporidium clethrionomys</i> genotype I	Opatovice	0
12432	<i>C. glareolus</i>	<i>Cryptosporidium clethrionomys</i> genotype I	Opatovice	0
12451	<i>C. glareolus</i>	<i>Cryptosporidium clethrionomys</i> genotype I	Opatovice	2000
12438	<i>C. glareolus</i>	<i>Cryptosporidium clethrionomys</i> genotype I	Opatovice	0
12437	<i>C. glareolus</i>	<i>Cryptosporidium clethrionomys</i> genotype II	Opatovice	10000
12435	<i>C. glareolus</i>	<i>Cryptosporidium clethrionomys</i> genotype II	Opatovice	0
12477	<i>M. arvalis</i>	<i>Cryptosporidium vole</i> genotype II	Košice	0
12481	<i>M. arvalis</i>	<i>Cryptosporidium vole</i> genotype III	Košice	4000
12447	<i>M. arvalis</i>	<i>Cryptosporidium vole</i> genotype III	Turovec	2000
12468	<i>M. arvalis</i>	<i>Cryptosporidium vole</i> genotype III	Košice	0

6. Diskuze

V této studii jsme zjistili prevalenci kryptosporidií u norníků rudých v rozmezí od 0 do 43 %. Naše údaje jsou v souladu se zjištěními Chalmers et al. (1997) ve Velké Británii a Laakkonen et al. (1994) ve Finsku, kteří detekovali prevalenci u stejného druhu hraboše v rozmezí od 2,4 do 13 %. Naopak Bajer et al. (2002) popsali výrazně vyšší prevalenci (70,6 %) u norníků rudých (*C. glareolus*) v Polsku. Rozdíly v prevalencích mohou být způsobeny různou hustotou populací, použitými metodami či geografickými rozdíly. Taktéž rozdíly v prevalenci u hraboše polního (*M. arvalis*) se výrazně liší. Zatímco v této studii bylo zjištěno rozmezí od 0 do 12,5 %, ve studii provedené Bajerem et al. (2002) a Bajerem (2008) byla detekována prevalence 62,3–73,0 %.

Na základě morfologických rozdílů bylo zjištěno, že hlodavci jsou často infikováni pravděpodobně *C. parvum* a *C. muris*. Oocysty těchto dvou morfotypů kryptosporidií byly detekovány i v řadě hlodavců jako jsou křečci, potkani, hraboši, veverky (Chalmers et al. 1994, 1995, 1997; Hůrková et al. 2003; Iseki 1986; Matsui et al. 2000; Torres et al. 2000). Přestože nebyla lokalizace vývojového cyklu námi detekovaných genotypů kryptosporidií empiricky ověřena, lze je dle jejich fylogenetické příbuznosti ke známým druhům a genotypům kryptosporidií považovat za střevní druhy. Norník rudý byl popsán jako jediný zástupce podčeledi Arvicolinae přirozeně vnímavý k žaludečním kryptosporidiím (Chalmers et al. 1997; Torres et al. 2000). Naopak Modrý et al. (2012) publikovali nevnímavost *C. glareolus* a *M. arvalis* k různým izolátům *C. muris* a *C. andersoni*. Vzhledem k absenci molekulárních dat z výše uvedených terénních studií, je tedy otázkou, jaké druhy a genotypy žaludečních kryptosporidií se u hrabošů vyskytují.

U mnoha hostitelů, zejména u člověka a hospodářských zvířat mohou být kryptosporidiové infekce spojeny s výraznými průjmovými příznaky (Caccio 2005; Jokipii a Jokipii 1986). Z naší studie vyplývá, že kryptosporidiové infekce volně žijících hlodavců, včetně hrabošovitých, probíhají asymptomaticky a nejsou spojeny s žádnými klinickými příznaky, což potvrzují i výsledky jiných studií (Bajer et al. 2001; Chalmers et al. 1997; Ren et al. 2012). Absence klinických příznaků a nízká intenzita infekce podporuje hypotézu, že virulence parazita pro specifického hostitele může klesat v průběhu koevoluce (Carval a Ferriere 2010; Lambrechts et al. 2006).

Obecně akceptovanou hypotézu, že samci jsou více parazitováni než samice (Klein 2004) jsme v této studii neprokázali, což se shoduje s výsledky jiných studií (Bajer et al. 2001, Kváč et al. 2008, Torres et al. 2000).

Na základě vnímavosti jednotlivých věkových katagorií lze kryptosporidie rozdělit do 3 skupiny, i) infekční pouze pro juvenilní jedince (např. *C. parvum* u skotu), ii) infekční pouze pro starší jedince (*C. scrofarum*) a iii) kryptosporidie postrádající věkovou specifitu (Kváč et al. 2009, 2013a; Suárez-Luengas et al. 2007; Zambriski et al. 2013). Na základě našich dat lze konstatovat, že kryptosporidie detekované u jedinců podčeledě Arvicolinae se vyskytovaly, jak u juvenilních, tak u adultních zvířat. Navíc data naznačují, že zvířata jsou pravděpodobně infikována v mladém věku a infekce přetrvává do dospělosti. K obdobným závěrům dospěli i Kváč a Vítovec (2003), Kváč et al. (2008, 2013b).

Výsledky celé řady molekulárních studií ukazují na častý výskyt *C. muris* u hlodavců, avšak u myši domácí byla častěji detekována infekce *C. tyzzeri* (dříve *Cryptosporidium* mouse genotype I), která se značně liší od *C. parvum* (Xiao et al. 2004). Domácí myši mohou být kromě *C. muris* a *C. tyzzeri* infikovány *Cryptosporidium* mouse genotype II (Foo et al. 2007; Morgan et al. 1999, 2000). Kromě těchto druhů a genotypů kryptosporidií u domácích myší, existuje mnoho dalších hostitelsky adaptovaných genotypů kryptosporidií parazitujících u ostatních hlodavců, jako například *Cryptosporidium* deer mouse genotype I, II, III a IV u křečků dlouhoocasých (*Peromyscus maniculatus*), vole genotype v hraboši pensylvánském (*Microtus pennsylvanicus*), muskrat genotype I a II v ondatrách (*Ondatra zibethicus*) a hraboších (*Microtus pennsylvanicus*, *Clethrionomys gapperi*), squirrel genotype ve veverkách (*Spermophilus beecheyi*), chipmunk genotype I a II v čipmancích východních (*Siberian chipmunk*) a beaver genotype v bobrech kanadských (*Castor canadensis*). Obecně lze konstatovat, že hlodavci jsou vnímaví k velkému množství druhů a genotypů kryptosporidií (Feng et al. 2008; Foo et al. 2007; Morgan et al. 1999, 2000; Xiao et al. 2004), nicméně se ukazuje, že jednotlivé taxonomické skupiny (druhy, podčeledi atd.) jsou parazitovány hostitelsky specifickými druhy a genotypy kryptosporidií (Feng 2008; Kváč et al. 2013b), což potvrzuje i tato studie.

Výsledky fylogenetických analýz ukázaly přítomnost čtyř odlišných genotypů kryptosporidií, přičemž žádný z detekovaných izolátů nebyl příbuzný k dříve

popsanému *Cryptosporidium* vole genotype (Feng et al. 2007). Všechny detekované genotypy jsou blízce příbuzné různým tzv. environmentálním vzorkům, u nichž není znám přirozený hostitel. Tyto výsledky naznačují pravděpodobnou vysokou diverzitu kryptosporidií u hlodavců a fakt, že hlodavci jsou významným zdrojem kontaminace zejména povrchových vod (Appelbee et al. 2005).

Smíšené kryptosporidiové infekce byly popsány u různých hostitelů. Způsobují je buď různé střevní kryptosporidie nebo kombinace infekcí střevních a žaludečních kryptosporidií. Například u člověka byly současně detekovány *C. hominis* a *C. meleagridis* (Gatei et al. 2007), u prasat *C. suis* a *C. scrofarum* (Jeníková et al. 2011) nebo u skotu *C. ryanae* a *C. bovis* (Santín et al. 2009). Navíc bylo experimentálně prokázáno, že pískomilové (*Meriones unguiculatus*) mohou být infikováni 3 různými druhy současně (Kváč et al. 2009). Přestože jsme v naší studii detekovali dva genotypy kryptosporidií infikující norníky rudé a dva hraboše polní, a to i na shodných lokalitách, neprokázali jsme u žádného ze zvířat smíšenou infekci. Bez informací, které lze získat pouze z experimentálních infekcí, nelze posoudit význam vzájemného ovlivňování nalezených genotypů na průběh infekce a vliv na zdravotní stav zvířat.

7. Závěr

- Byl prokázán výskyt čtyř nových genotypů přirozeně infikujících hlodavce podčeledi Arvicolinae.
- Nebyl prokázán vliv věku a pohlaví na výskyt kryptosporidiových infekcí.
- Kryptosporidové infekce hrabošovitých nezpůsobují průjmová onemocnění u typických hostitelů.
- Intenzita infekce přirozených hostitelů byla velmi nízká a distribuce v rámci všech věkových kategorií naznačuje chronické infekce.
- Hostitelská specifita a bližší určení genotypu by měla být v budoucnu potvrzena pomocí jak experimentálních infekcí, tak i determinací dalších genů.

8. Seznam použité literatury

- Akiyoshi D.E., Feng X., Buckholt M.A., Widmer G., Tzipori S. (2002). Genetic analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passed through different hosts. *Infect. Immun.*, 70: 5670–5675.
- Anděra M., Beneš B. (2001). Atlas rozšíření savců v České Republice IV. *Nakladatelství Národní muzeum*. 156.
- Anděra M., Horáček I. (2005). Poznáváme naše savce. *Nakladatelství Sobotáles*. 328.
- Appelbee A.J., Thompson R.C., Olson M.E. (2005). *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. *Trends. Parasitol.*, 21: 370–376.
- Bajer A., Bednarska M., Pawelczyk A., Behnke J. M., Gilbert F. S., Sinski E. (2002). Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology.*, 125: 21–34.
- Bajer A., Bednarska M., Paziewska A., Romanowski J., Sinski E. (2008). Semi-aquatic animals as a source of water contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Wiad Parazytol.*, 54: 315–318.
- Bajer A., Bednarska M., Sinski E. (2003). The ecology of *Cryptosporidium parvum* infection in small rodents populations. *Wiad. Parazytol.*, 47: 747–753.
- Bajer A., Caccio S., Bednarska M., Behnke J.M., Pieniazek N.J., Sinski E. (2005). Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *J. Parasitol.*, 89: 1053–1055.
- Betancourt W.Q., Rose J.B. (2004). Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.*, 126: 219–234.
- Blanshard C., Jackson A.M., Shanson D.C., Francis N., Gazzard B.G. (1992). Cryptosporidiosis in HIVseropositive patients. *Q. J. Med.*, 85: 813–823.
- Bull S.A., Chalmers R.M., Sturdee A.P., Healing T.D. (1998). A survey of *Cryptosporidium* species in Skomer bank voles *Clethrionomys glareolus skomerensis*. *J. Zool.*, 244: 119–122.
- Bushen O.Y., Kohli A., Pinkerton R.C., Dupnik K., Newman R.D., Sears C.L., Fayer R., Lima A.A., Guerrant R.L. (2007). Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: Comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 101: 378–384.

- Caccio S., Pinter E., Fantini R., Mezzaroma I., Pozio E. (2002). Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 85–86.
- Caccio S.M. (2005). Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*, 47: 185–192.
- Carval D., Ferriere R. (2010). A unified model for the coevolution of resistance, tolerance, and virulence. *Evolution*, 64: 2988–3009.
- Casemore D.P., Sands R.L., Curry A. (1985). *Cryptosporidium* species a “new” human pathogen. *J. Clin. Pathol.*, 38: 1321–1336.
- Current W.L. (1985). Cryptosporidiosis, a protozoologist’s view of an emerging zoonosis. *Microecol. Ther.*, 15: 165–200.
- Current W.L. (1988). The biology of *Cryptosporidium*. *ASM News.*, 54: 605–611.
- Ditrich O., Palkovic L., Sterba J., Prokopic J., Loudova J., Giboda M. (1991). The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. *Parasitol. Res.*, 77: 44–47.
- Dobrouka L.J., Berger Z. (2004). Savci. *AVENTINUM s. r. o.*, 191.
- DuPont H.L., Chappell C.L., Sterling C.R., Okhuysen P.C., Rose J.B., Jakubowski W. (2011). Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New Engl. J. Med.*, 332: 855–859.
- Fall A., Thompson R.C., Hobbs R.P., Morgan-Ryan U. (2003). Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *J. Parasitol.*, 89: 399–402.
- Fayer R. (2007). General biology. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R., Xiao L. (Eds.). *Publishing CRC Press.*, 1–35.
- Fayer R., Guidry A., Blagburn B.I. (1990). Immunotherapeutic efficacy of bovine colostral immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infect. Immun.*, 58: 2962–2965.
- Fayer R., Morgan U., Upton S.J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.*, 30: 1305–1322.
- Fayer R., Santin M., Xiao L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91: 624–629.
- Fayer R., Trout J.M., Jenkins M.C. (1998). Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.*, 84: 1165–1169.

- Fayer R., Xiao L. (2008). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2. vyd. *IWA Pub.*, 560.
- Feng Y. (2008). *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp. Parasitol.*, 124: 128–137.
- Feng Y., Alderisio K.A., Yang W., Blancero L.A., Kuhne W.G., Nadareski C.A., Reid M., Xiao L. (2007). *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 6475–6483.
- Feng Y., Lal A., Li N., Xiao L. (2010). Subtypes of *Cryptosporidium* sp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.*, 127: 238–242.
- Foo C., Farrell J., Boxell A., Robertson I., Ryan U.M. (2007). *Cryptosporidium* genotype in wild Australian mice (*Mus domesticus*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 7693–7696.
- Gatei W., Das P., Dutta P., Sen A., Cama V., Altaf A., Lal A.A., Xiao L. (2007). Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infect. Genet. Evol.*, 7: 197–205.
- Gentile G., Venditti M., Micozzi A., Caprioli A., Donelli G., Tirindelli C., Meloni G., Arcese W., Martino P. (1991). Cryptosporidiosis in patients with hematologic malignancies. *Rev. Infect. Dis.*, 13: 842–846.
- Giles M., Webster K.W., Marshall J.A., Catchpole J., Goddard T.M. (2001). Experimental infection of a lamb with *Cryptosporidium parvum* type 1. *Vet. Rec.*, 149: 523–525.
- Griffiths J.K. (1998). Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Adv. Parasitol.*, 40: 37–86.
- Guyot K., Follet-Dumoulin A., Lelievre E., Sarfati C., Rabodonirina M., Nevez G., Cailliez J.C., Camus D., Deicas E. (2001). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3472–3480.
- Henriksen S.A., Pohlenz J.F.L. (1981). Staining of cryptosporidia by modified Zeihl-Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.*, 22: 594–596.
- Hůrková L., Hajdušek O., Modrý D. (2003). Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. *J. Wild. Dis.*, 39: 441–444.

- Chalmers R.M., Sturdee A.P., Bull S.A., Miller A., Wright S.E. (1997). The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol. Res.*, 83: 478–482.
- Chalmers R.M., Sturdee A.P., Bull S.A., Miller A.M. (1995). Rodent reservoirs of *Cryptosporidium*, In: Betts W.B, Casemore D., Fricker C., Smith H., Watkins J., (Eds.), Protozoan Parasites and Water. *Roy. Soc. Chem. Spec. Publ.*, 168: 63–66.
- Chalmers R.M., Sturdee A.P., Casemore D.P., Curry A., Miller, A., Parker N.D., Richmond T.M. (1994). *Cryptosporidium muris* in wild house mice (*Mus musculus*) first report in the UK. *Europ. J. Protistol.*, 30: 151–155.
- Isaacs D., Hunt G.H., Phillips A.D., Price E.H., Raafat F., Walker-Smith J.A. (1985). Cryptosporidiosis in immunocompetent children. *J. Clin. Pathol.*, 38: 76.
- Iseki M. (1986). Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Parasitol.*, 35: 521–526.
- 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.
- Jiang J., Alderisio K.A., Xiao L. (2005). Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 446–454.
- Jokipii L., Jokipii A.M. (1986). Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.*, 15: 1643–1647.
- Kim Y., Howerth E.W., Shin N.S., Kwon S.W., Terrell S.P., Kim D.Y. (2005). Disseminated visceral coccidiosis and cloacal cryptosporidiosis in a Japanese white-naped crane (*Grus vipio*). *J. Parasitol.*, 91: 199–201.
- 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.
- Klein S.L. (2004). Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol.*, 26: 247–264.
- Klesius P.H., Haynes T.B., Malo L.K. (1986). Infectivity of *Cryptosporidium* ssp. isolated from wild mice for calves and mice. *J. Am. Vet. Med.*, 189: 192–193.

- Kruse H., Kirkemo A.M., Handeland K. (2004). Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerg. Infect. Dis.*, 10: 2067–2072.
- Kváč M, Sak B, Květoňová D, Secor WE. (2009). Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet. Parasitol.*, 7, 163: 33–38.
- Kváč M., Hofmannová L., Bertolino S., Wauters L., Tosi G., Modrý D. (2008). Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitol. (Praha)*, 55: 95–99.
- Kváč M., Kestřánová 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*). *Vet. Parasitol.*, 31: 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*). *Int. J. Parasitol.*, v tisku.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. (2007). Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.*, 143: 229–233.
- Kváč M., Vítovec J. (2003). Prevalence and patogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med.*, 5: 451–457.
- Laakkonen J., Soveri T., Henttonen H. (1994). Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in peak density *Microtus agrestis*, *Microtus oeconomus* and *Clethrionomys glareolus* populations. *Journal of Wildlife Diseases.*, 30: 110–111.
- Lambrechts L., Fellous S., Koella J.C. (2006). Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol.*, 22: 12–16.
- Lumb J., Smith K., O'Donoghue P.J., Lanser J.A. (1988). Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitol. Res.*, 74: 531–536.
- 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. *N. Engl. J. Med.*, 331: 161–167.

- Manabe Y.C., Clark D.P., Moore R.D., Lumadue J.A., Dahlman H.R., Belitsos P.C., Chaisson R.E., Sears C.L. (1998). Cryptosporidiosis in patients with AIDS: Correlates of disease and survival. *Clin. Infect. Dis.*, 27: 536–542.
- Mansfield L.S., Gajadhar A.A. (2004). Cyclospora cayentanensis, a food- and waterborne coccidian parasite. *Vet. Parasitol.*, 126: 73–90.
- Mathieu E., Levy D. A., Veverka F., Parrish M. K., Sarisky J., Shapiro N., Johnston S., Handzel T., Hightower A., Xiao L., Lee Y. M., York S., Arrowood M., Lee R., Jones J. L. (2004). Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71: 582–589.
- Matsui T., Fujino T., Kajima J., Tsuji M. (2000). Infectivity to experimental rodents of *Cryptosporidium parvum* oocysts from Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus*) originated in the People's Republic of China. *J. Vet. Med. Sci.*, 62: 487–489.
- Meisel J.L., Perera D.R., Meligro C., Rubin C.E. (1976). Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70: 1156–1160.
- Miyaji S., Tanikawa T., Shikata J. (1989). Prevalence of *Cryptosporidium* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus* in Japan. *Jpn. J. Parasitol.*, 38: 368–372.
- Modrý D., Hofmannová L., Antalová Z., Sak B., Kváč M. (2012). Variability in susceptibility of voles (Arvicolinae) to experimental infection with *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *Parasitol. Res.*, 11: 471–473.
- Morgan U.M., Sturdee A.P., Singleton G., Gomez M.S., Gracenta M., Torres J., Hamilton S.G., Woodside D.P., Thompson R.C.A. (1999). The *Cryptosporidium* “mouse” genotype is conserved across geographic areas. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 1302–1305.
- Morgan U.M., Xiao L., Hill B.D., O’Donoghue P., Limor J., Lal A.A., Thompson R.C.A. (2000). Detection of the *Cryptosporidium parvum* “human” genotype in a dugong (*Dugong dugong*). *J. Parasitol.*, 86: 1352–1354.
- Morgan 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.

- Navin T.R. (1985). Cryptosporidiosis in humans: Review of recent epidemiologic studies. *Eur. J. Epidemiol.*, 1: 77.
- Navin T.R., Hardy A.M. (1987). Cryptosporidiosis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.*, 155: 150.
- 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.
- Pedraza-Diaz S., Amar C., Iversen A.M., Stanley P.J., McLauchlin J. (2001). Unusual cryptosporidium species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. *J. Med. Microbiol.*, 50: 293–296.
- Pedraza-Diaz S., Amar C., McLauchlin J. (2000). The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 189: 189–194.
- Peng M.M., Xiao L., Freeman A.R., Arrowood M.J., Escalante A.A., Weltman A.C., Ong C.S., MacKenzie W.R. (1997). Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg. Infect. Dis.*, 3: 567–573.
- 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.
- Perz J.F., Le Blancq S.M. (2001). *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1154–1162.
- Pitlik S.D., Fainstein V., Garza D., Guarda L., Bolivar R., Rios A., Hopfer R.L, Mansell P.A. (1983). Human cryptosporidiosis: Spectrum of disease. Report of six cases and review of the literature. *Arch. Intern. Med.*, 143: 2269–2275.
- Pohlenz J., Moon H.W., Cheville N. F., Bemrick W.J. (1978). Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhoea of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 172:452–457.
- Quy R.J., Cowan D.P., Haynes P.J., Sturdee A.P., Chalmers R.M., Bodley-Tickell A.T., Bull S.A. (1999). The Norway rat as a reservoir host of *Cryptosporidium parvum*. *J. Wild. Dis.*, 35: 660–670.

- Ren X, Zhao J, Zhang L, Ning C, Jian F, Wang R, Lv C, Wang Q, Arrowood MJ, Xiao L. (2012). *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.*, 130: 274–281.
- Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A.A., Pavlasek I., (2003a). Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4302–4307.
- 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*). *J. Parasitol.*, 90: 769–773.
- Ryan U.M., Xiao L., Read C., Sulaiman I.M., Monis P., Lal A.A., Fayer R., Pavlasek, I. (2003b). A redescription of *Cryptosporidium galli* from birds. *J. Parasitol.*, 89: 809–813.
- Sak B., Kváč M., Hanzlíková D., Cama V. (2008). First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.*, 31: 153–220.
- Santín M., Zarlenga D.S. (2009). A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish *Cryptosporidium* species of veterinary and public health concern in cattle. *Vet. Parasitol.*, 166: 32–37.
- Sinski E., Bednarska M., Bajer A. (1998). The role of wild rodents in ecology of Cryptosporidiosis in Poland. *Folia Parasitol. (Praha)*, 45: 173–174.
- Sinski E., Hlebowicz E., Bednarska M., (1993). Occurrence of *Cryptosporidium parvum* infection in wild small mammals in District of Mazury Lake (Poland). *Acta Parasitol.*, 38: 59–61.
- Slavin D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.*, 65: 262–270.
- Smith H. V., Rose J. B. (1998). Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitol. Today.*, 14: 14–22.
- Smith H.V., Nichols R.A.B., Grimason, A.M. (2005). *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.*, 21: 133–142.
- Soave R., Armstrong D. (1986). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Rev. Infect. Dis.*, 8: 1012–1023.

- Sreedharan A., Jayschree R.S., Sridhar H. (1996). Cryptosporidiosis among cancer patients: An observation. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, 14: 211–213.
- Stehr-Green J.K., McCaig L., Remsen H.M., Rains C.S., Fox M., Juranek D.D. (1987). Shedding of oocysts in immunocompetent individuals infected with *Cryptosporidium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36: 338–342.
- Sturdee A.P., Bodley-Tickell A.T., Archer A., Chalmers R.M. (2003). Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet. Parasitol.*, 116: 97–113.
- Suárez-Luengas L., Clavel A., Quílez J., Goñi-Cepero M.P., Torres E., Sánchez-Acedo C., del Cacho E. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet Parasitol.*, 30: 148: 231–235.
- Sundberg J.P., Hill D., Ryan M.J. (1982). Cryptosporidiosis in a gray squirrel. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 181: 1420.
- Tanyuksel M., Gun H., Doganci L. (1995). Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with neoplasia and diarrhea. *Scand. J. Infect. Dis.*, 27: 69–70.
- 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.
- 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.
- Turkcapar N., Kutlay S., Nergizoglu G., Atli T., Duman N. (2002). Prevalence of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. *Nephron.*, 90: 344–346.
- Tyzzar E. E. (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 5: 12–13.
- Tyzzar E. E. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.*, 26: 394–412.
- Tyzzar, E. E. (1910). An extra celular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.*, 23: 487–509.
- Tzipori S., Angus K.W., Cambell I., Gray E.W. (1980). *Cryptosporidium*: evidence for a single species genus. *Infect. Immun.*, 30: 884–886.
- Volf P., Horák P. (2007). Paraziti a jejich biologie. *Nakladatelství Triton*, 318.

- Webster J.P., Macdonald R.W. (1995). Parasites of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Parasitology*, 111: 247-255.
- Wetzel D.M., Schmidt J., Kuhlenschmidt M.S., Dubey J.P., Sibley L.D. (2005). Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect. Immun.*, 73: 5379–5387.
- Widmer G., Akiyoshi D., Buckholt M.A., Feng X., Rich S.M., Deary K.M., Bowman C.A., Xu P., Wang Y., Wang X., Buck G.A., Tzipori S. (2000). Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 108: 187–197.
- Wolfson J.S., Richter J.M., Waldron M.A., Weber D.J., McCarthy D.M., Hopkins C.C. (1985). Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *N. Engl. J. Med.*, 312: 1278–1282.
- Xiao L., Bern C., Limor J., Sulaiman I., Roberts J., Checkley W., Cabrera L., Gilman R.H., Lal A.A. (2001). Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.*, 7: 492–497.
- Xiao L., Cama V. A., Cabreta L., Ortega Y., Pearson J., Gilman R. H. (2007). Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. *J. Clin. Microbiol.*, 45: 2014-2016.
- Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17: 72–97.
- Xiao L., Sulaiman I.M., Ryan U.M., Zhou L., Atwill E.R., Tischler M.L., Zhang X., Fayer R., Lal A.A., (2002). Host adaptation and host–parasite co–evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int. J. Parasitol.*, 32: 1773–1785.
- Yamura H., Shirasaka R., Asahi H., Koyama T., Motoki M., Ito H. (1990). Prevalence of *Cryptosporidium* infection among house rats, *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, in Tokyo, Japan and experimental cryptosporidiosis in roof rats. *Jpn. J. Parasitol.*, 39: 439–444.
- Zambriski J.A., Nydam D.V., Bowman D.D., Bellosa M.L., Burton A.J., Linden T.C., Liotta J.L., Ollivett T.L., Tondello-Martins L., Mohammed H.O. (2013). Description of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally challenged dairy calves. *Parasitol. Res.*, 112: 1247-54.

- Zejda, J., Zapletal, M., Pikula, J., Obdržálková, D., Heroldová, M., Hubálek, Z. (2002): Hlodavci v zemědělské a lesnické praxi. *Nakladatelství Agrospoj s.r.o.*, 288.
- Ziegler P.E., Wade S.E., Schaaf S.L., Stern D.A., Nadareski C.A., Mohammed H.O., (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Vet. Parasitol.*, 147: 176–184.