

**Univerzita Hradec Králové**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra biologie**

**Laboratorní diagnostika promořenosti protozoární  
infekcí *Cryptosporidium* sp.**

**Diplomová práce**

Autor: Bc. Tereza Forejtková  
Studijní program: N1501 Biologie  
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie  
Vedoucí práce: Mgr. Jan Wipler

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Bc. Tereza Forejtková

#### Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Janu Wiplerovi za věnovaný čas, potřebné rady a veškerou poskytnutnou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat MVDr. Zuzaně Čermákové, Ph.D. a Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradce Králové, bez jejichž projektu by tato práce nevznikla. Za velkou pomoc při statistickém vyhodnocení výsledků děkuji RNDr. Evě Čermákové. Moje poděkování patří také Katedře biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové za povolení lékařsky biologického tématu a poskytnutí nezbytných prostředků a přístrojové techniky, a Ing. Vladimíru Dvořákovi, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři. Ráda bych poděkovala mému partnerovi Vítězslavu Samkovi, který mi byl při psaní práce velkou oporou. Také děkuji rodinám Benákových a Forejtkových za podporu během celého studia.

## **Anotace**

Forejtková T. (2016). Laboratorní diagnostika promořenosti lidskou protozoární infekcí *Cryptosporidium* sp. Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta, katedra biologie, diplomová práce (nepublikovaný manuskript), 71 s.

Kryptosporidie jsou eukaryotní protozoární paraziti infikující gastrointestinální trakt živočichů. Velmi závažný až fatální průběh mívá kryptosporidióza u imunokompromitovaných jedinců, zejména u HIV séropozitivních pacientů ve stadiu AIDS a dětí. Onemocnění se projevuje průjmy, které jsou doprovázeny kolikovými bolestmi břicha, nauzeou, vomitem, zvýšenou teplotou, nechutenstvím. Klinicky nejvýznamnější je v humánním lékařství druh *Cryptosporidium parvum* a *Cryptosporidium hominis*. Cílem práce je zpracování literární rešerše v teoretické části a v experimentální části monitoring pacientů Kliniky infekčních nemocí ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové hospitalizovaných v roce 2015. Odebrané vzorky stolice budou obarveny metodou podle Miláčka a Vítovce a mikroskopicky diagnostikovány. Výsledky budou zpracovávány statistickými metodami. Hlavním cílem práce je stanovit promořenost tímto patogenem a zjistit četnost kryptosporidiové infekce u dětí. Dalším cílem je stanovení, zda je četnost oocyst ve stolici závislá na konzistenci stolice, zda pacienti s oslabenou imunitou jsou náchylnější ke kryptosporidiové infekci a zda oslabený imunitní systém podporuje množení parazita.

## **Klíčová slova**

*Cryptosporidium*, kryptosporidie, kryptosporidióza, diagnostika, promořenost.

## **Annotation**

Forejtková T. (2016). Laboratory diagnosis of prevalence by protozoal infection *Cryptosporidium* sp. University of Hradec Králové, Faculty of Science, Department of Biology, Diploma Thesis (unpublished manuscript), 71 p.

*Cryptosporidium* is a genus of protozoan parasites infecting the gastrointestinal tract of animals. *Cryptosporidium* can have a very serious to fatal process with the immunocompromised individuals, especially the HIV infected patients in AIDS stage or with children. The disease is manifested by diarrhea, that is accompanied by abdominal pain, nausea, vomit, and increased temperature, inappetence. The most clinically important species in the human medicine are the *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. The thesis target is the sources research process in the theoretical part and monitoring of patients hospitalized in Faculty hospital of Hradec Kralove in 2015 on Clinic of Infectious Diseases. The collected stool samples will be stained by the Milacek and Vitovec staining method and microscopically valuated. The results will be processed by statistical methods. The central thesis target is the prevalence evaluation by this pathogen and the prevalence investigation of the cryptosporidiosis infection in children. Next target is the detection oocysts quantity respectively if the oocysts quantity has an impact on stool consistence, if the immunocompromised patients are more sensitive to cryptosporidiosis and if the immunodeficiency stimulates the parasit reproduction.

## **Keywords**

*Cryptosporidium*, cryptosporidiosis, diagnosis, prevalence.

# Obsah

Úvod .....	8
1 Teoretická část .....	10
1.1 Kryptosporidie.....	10
1.1.1 Historie.....	11
1.1.2 Taxonomie .....	12
1.1.3 Morfologie a lokalizace .....	13
1.1.4 Životní cyklus.....	14
1.2 Kryptosporidióza .....	17
1.2.1 Patogenita a virulence.....	17
1.2.2 Imunologie.....	17
1.2.3 Symptomatika a patogeneze.....	18
1.2.4 Terapie .....	20
1.3 Epidemiologie a prevalence.....	21
1.3.1 Způsob přenosu .....	21
1.3.2 Prevence .....	22
1.3.3 Epidemiologie.....	24
1.3.4 Promořenost .....	25
1.4 Druhy kryptosporidií .....	28
1.4.1 Druhy kryptosporidií infikující člověka .....	28
1.4.2 Soupis všech současně platných druhů.....	31
1.5 Diagnostika.....	33
1.5.1 Diagnostika - mikroskopie .....	33
1.5.2 Molekulární diagnostika.....	34
1.5.3 Přímé stanovení oocyst ve vodě.....	35
1.5.4 Diagnostika mimostřevní kryptosporidiózy .....	35

2	Experimentální část.....	37
2.1	Metodika.....	37
2.1.1	Charakteristika sledovaného souboru.....	37
2.1.2	Odběr materiálu .....	37
2.1.3	Barvení.....	37
2.1.4	Mikroskopické vyšetření.....	38
2.2	Výsledky .....	39
2.2.1	Pohlaví.....	44
2.2.2	Věk .....	44
2.2.3	Závislost četnosti oocyst na konzistenci stolice.....	45
2.2.4	Diagnóza .....	48
2.2.5	Závislost imunodeficitu a četnosti oocyst .....	50
2.2.6	Závislost imunodeficitu a pozitivivity.....	52
3	Diskuze .....	55
	Závěr.....	60
	Seznam použité literatury.....	62

# Úvod

Kryptosporidie jsou eukaryontní patogenní agens, jejichž intracelulární reprodukce je vázána na enterocyty ve střevním epitelu v zóně mikroklků. Rupturou enterocytu je uvolněno do lumen střeva vysoké množství kulovitých, tlustostěnných, k vnějším vlivům velmi rezistentních oocyst, které se dále dostávají ven z organismu během defekace. Po dozrání mohou infikovat další makroorganismus. Pokud je oocystami tohoto patogenu kontaminován vodní zdroj, může dojít k masivním epidemiím a epizootiím. Kryptosporidie způsobují průjmové onemocnění, kryptosporidiózu, jak u poikilothermních, tak u homoiothermních živočichů. Zástupci početného rodu *Cryptosporidium* jsou monoxenní kokcidie, z nichž klinicky nejvýznamnější je v humánním lékařství druh *Cryptosporidium parvum*, přenosný z hovězího dobytka na člověka. U imunokompetentních pacientů vyvolává vodnaté průjmy dočasného charakteru, avšak u imunokompromitovaných pacientů, především HIV séropozitivních ve stádiu AIDS, způsobuje trvalé onemocnění často s dramatickým průběhem vedoucí k trvalé neschopnosti tenkého střeva resorbovat živiny.

Vzhledem k dosud neobjevené účinné terapii, je u těchto pacientů kryptosporidiová infekce vážnou komplikací, kterou je třeba monitorovat u veškerých hospitalizovaných pacientů vykazující suspektní symptomy, ale i u ostatních pacientů hospitalizovaných na infekčních odděleních. Onemocnění způsobené tímto patogenem je častější, než se v posledních desetiletích myslelo, protože se kryptosporidióza například vyskytuje jako sekundární onemocnění nebo probíhá bezpříznakově. Ne ve všech případech také dochází k diagnostice. Proto se zabývám touto problematikou a chtěla bych dokázat, že promořenost tímto patogenem je vyšší, než je všeobecně známo.

Práce je rozdělena na teoretickou a experimentální část. Teoretická část je pojatá jako literární rešerše, tedy formou přehledu dostupné literatury o daném tématu. V první kapitole jsem nejprve zpracovala základní informace o kryptosporidiiích, jejich taxonomii, morfologii a životním cyklu. Následně v druhé kapitole popisují kryptosporidiózu, například její virulenci, patogenezí, symptomatiku a terapii. Ve třetí kapitole zmiňuji epidemiologii a prevalenci, včetně způsobů přenosu. Ve čtvrté kapitole se zaměřuji na druhy kryptosporidiií infikující člověka. V poslední kapitole



se věnuji diagnostice, zejména mikroskopické a uvádím přehled ostatních diagnostických metod.

Experimentální část práce proběhla pod záštitou projektu MVDr. Zuzany Čermákové, Ph.D. a Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradce Králové. Sleduji v ní pacienty Kliniky infekčních nemocí ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové hospitalizovaných v roce 2015. Z dostatečného množství odebraných vzorků stolice byly vyhotoveny preparáty a následně byly obarveny selektivní barvicí technikou podle Miláčka a Vítovce, kterou jsme zvolili jako nejprůkaznější barvicí metodu. Výsledky jsou zaznamenány v experimentální části diplomové práce se zachováním anonymity všech sledovaných pacientů. Výsledky jsou dále zpracovávány statistickými metodami, z nichž bude vyjádřena promořenost tímto onemocněním.

Cílem výzkumu je monitoring kryptosporidií jako infekčního onemocnění. Kromě stanovení promořenosti tímto patogenem budeme zjišťovat, jestli je kryptosporidiová infekce čtenější u dětí do 12 let. Dále proběhne statistické vyhodnocení výsledků pomocí testů hypotéz. Jsou stanoveny tyto hypotézy:

1. Četnost oocyst ve stolici nezávisí na její konzistenci.
2. Oslabený imunitní systém méně omezuje množení parazita.
3. Pacienti s oslabenou imunitou jsou náchylnější ke kryptosporidiové infekci.

Důležitost práce vidím v upozornění na vysokou promořenost tímto patogenem, zejména u dětí. Kryptosporidióza prodělaná v raném dětství totiž může mít trvalý vliv na růst a vývoj dítěte. Uvědomuji si však omezení, které spočívá v malém množství souboru pacientů a v tom, že byli vyšetřováni pouze pacienti Kliniky infekčních nemocí.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Kryptosporidie

Kryptosporidie jsou jednobuněční protozoární paraziti infikující gastrointestinální trakt živočichů, které jsou rozšířené kosmopolitně (O'Donoghue 1995). Byly dlouho považovány jen za parazity zvířat infikující savce, ptáky a plazy (Schindler 2014). *Cryptosporidium parvum* je častou příčinou průjmového onemocnění člověka zvaného kryptosporidióza (Atlas 1995). Velmi závažný průběh mívá kryptosporidióza u pacientů s těžkým postižením imunity (Jawetz 1989, Guk et al. 2004, Sunnotel et al. 2006) a to i v České republice (Votava 2003). U imunokompetentních jedinců má onemocnění obvykle dočasný charakter a i bez léčby ustoupí během několika týdnů (Votava et al. 2000); často po inkubační době trvající čtyři až dvanáct dnů nemoc trvá nejčastěji deset až čtrnáct dnů (Nester 1998). Kromě průjmů se v různé míře přidávají i další příznaky: kolikové bolesti břicha, nauzea, vomitus, flatulence, zvýšená teplota, nechutenství až anorexie a váhový úbytek. U některých jedinců může infekce proběhnout bez patrných příznaků (Ditrich 2010).

Zatímco některé druhy jsou vysoce specializované a napadají jen úzký okruh druhů živočichů, u jiných druhů různorodost hostitelů příliš nerozhoduje (Xiao et Fayer 2008). V rámci rodu *Cryptosporidium* rozlišujeme dvě fylogenetické větve kryptosporidií, jednu s menšími oocystami a s afinitou ke střevu (k enterocytům), druhou s většími oocystami a s afinitou k žaludečním žlázám (Xiao et al. 2004b). Infekční stádia (oocysty) jsou velmi odolná vůči nepříznivým podmínkám prostředí a přežívají velmi dlouhou dobu. Ve vhodných podmínkách (vlhká půda, povrchová voda) si mohou zachovat svou infekčnost až šest měsíců (Fayer et al. 1998).

### 1.1.1 Historie

Oocysty kryptosporidií byly nalezeny v jeskynních koproliitech lidského původu na středo-severním pobřeží Peru. (Jíra 2009). Vůbec prvním objeveným druhem bylo *Cryptosporidium muris*. Upozornil na něj Tyzzer (1907) v práci pojednávající o sexuálních a asexuálních vývojových stádiích tohoto druhu, který přežíval v trávicím traktu myši, kde se parazit pomocí specializovaných organel přichycoval na epitelové buňky hostitele (Tyzzer 1907). Tyzzer v roce 1912 popsal nový druh *Cryptosporidium parvum*. Zjistil, že parazit, který byl identifikován u laboratorních myši, obývá pouze tenké střevo, a že ve srovnání s *Cryptosporidium muris* jsou jeho oocysty mnohem menší. Postupně učinil další nálezy *C. parvum* i v tenkém střevě králíků (Tyzzer 1912). Tento druh objevil i u drůbeže, kde však parazit infikoval počátek tlustého střeva (Tyzzer 1929).

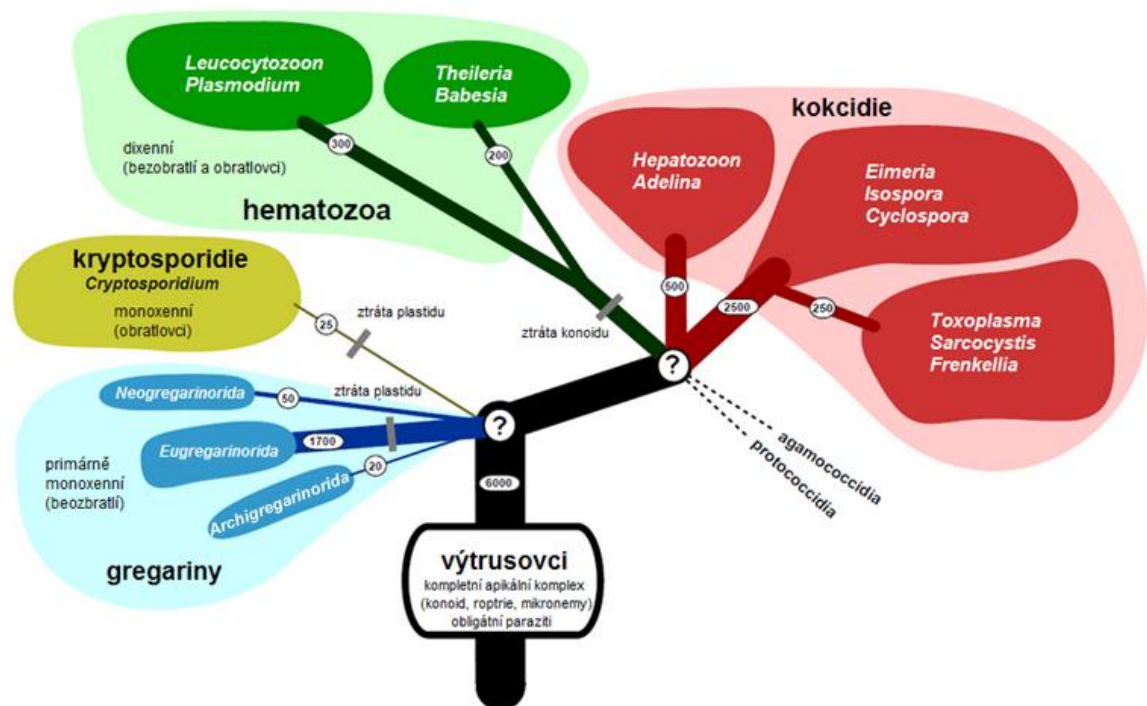
Kryptosporidie byly mnoho let opomíjené, neboť jim nebyla přikládána dostatečná důležitost jak z hlediska lékařství veterinárního, tak z humánního. Avšak *Cryptosporidium meleagridis* bylo popsáno jako původce smrtelného onemocnění u *Meleagris gallopavo f. domestica* (krocana domácího) (Slavin 1955). Byla také zjištěna souvislost mezi kryptosporidii a průjmovým onemocněním u skotu (Panciera et al. 1971).

První nálezy u člověka byly učiněny nezávisle u tříletého dítěte a devětatřicetiletého muže s nedostatečnou imunitou. Oba postižení žili na farmě, kde byl chován dobytek, a oba trpěli silným průjmovým onemocněním (Meisel et al. 1976, Nimem et al. (1976). Další nálezy kryptosporidií u člověka následovaly záhy i u osob, které nebyly ve styku se zvířaty, zejména u imunosupresivních pacientů. Interhumánní přenos byl tímto potvrzen. V roce 1984 byla kryptosporidíóza Světovou zdravotnickou organizací (WHO) označena za zoonózu (Pavlásek 1995).

### 1.1.2 Taxonomie

Do fylogenetického systému jsou kryptosporidie zařazeny takto: říše *Chromalveolata*, nadkmen *Alveolata*, kmen *Apicomplexa* (výtrusovci), třída *Cryptosporidea*, čeleď *Cryptosporidiidae* (kryptosporidiovití), rod *Cryptosporidium* (kryptosporidie) (Volf et al. 2007, Jíra 2009).

*Cryptosporidium* jako jediný rod patří do třídy *Cryptosporidea*. Zařazení do samostatné třídy apikomplex si vyžádaly některé zvláštní vlastnosti jeho zástupců, které se sice podobají kokcidiím, ale jejichž nejbližší příbuzní, jak ukazuje molekulární fylogenetika, jsou zřejmě hromadinky *Gregarinaea* (Ditrich 2010). Oproti gregarinám, které jsou veliké v řádech stovek mikrometrů, jsou ale kryptosporidie organismy velmi drobné, v řádech několika  $\mu\text{m}$  (Volf et al. 2007). Postavení kryptosporidií v rámci kmene výtrusovců je znázorněno na obrázku 1.

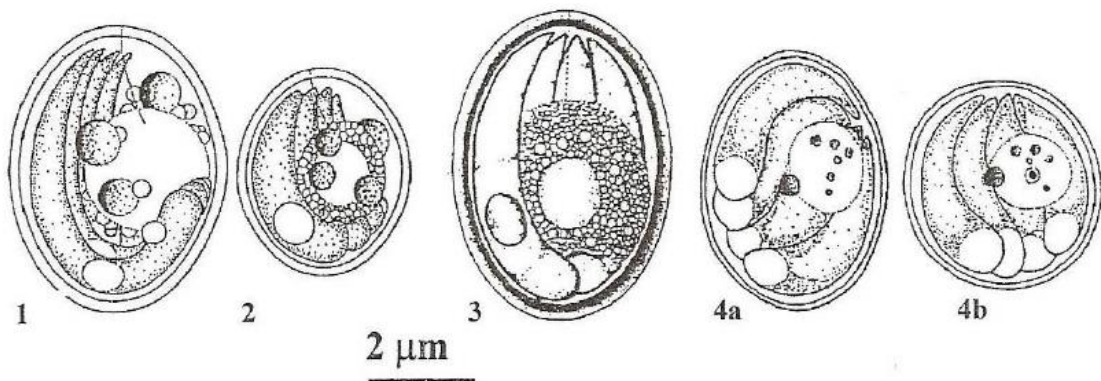


**Obrázek 1:** Zařazení kryptosporidií do hypotetického stromu výtrusovců, upraveno podle Šlapety (2011).

### 1.1.3 Morfologie a lokalizace

Kryptosporidie jsou specificky tkáňově lokalizovány, a to v zóně mikrokloků epitelu trávicího traktu a epitelu dýchacích cest. Některé druhy parazitují v epitelu vystýlajícím žaludeční stěnu. Netypicky se však mohou vyskytnout i v jiných orgánech. Gregarinám se podobají lokalizací na povrchu infikovaných buněk, ale na rozdíl od nich se vývoj kryptosporidií odehrává v růstové komůrce (parazitoforní vakuola). Tato lokalizace bývá popisována jako intracelulární extracytoplasmatická (Volf et al. 2007). Kryptosporidie mají dále silně redukovaný zbytek mitochondrie (Ditrich et al. 2003).

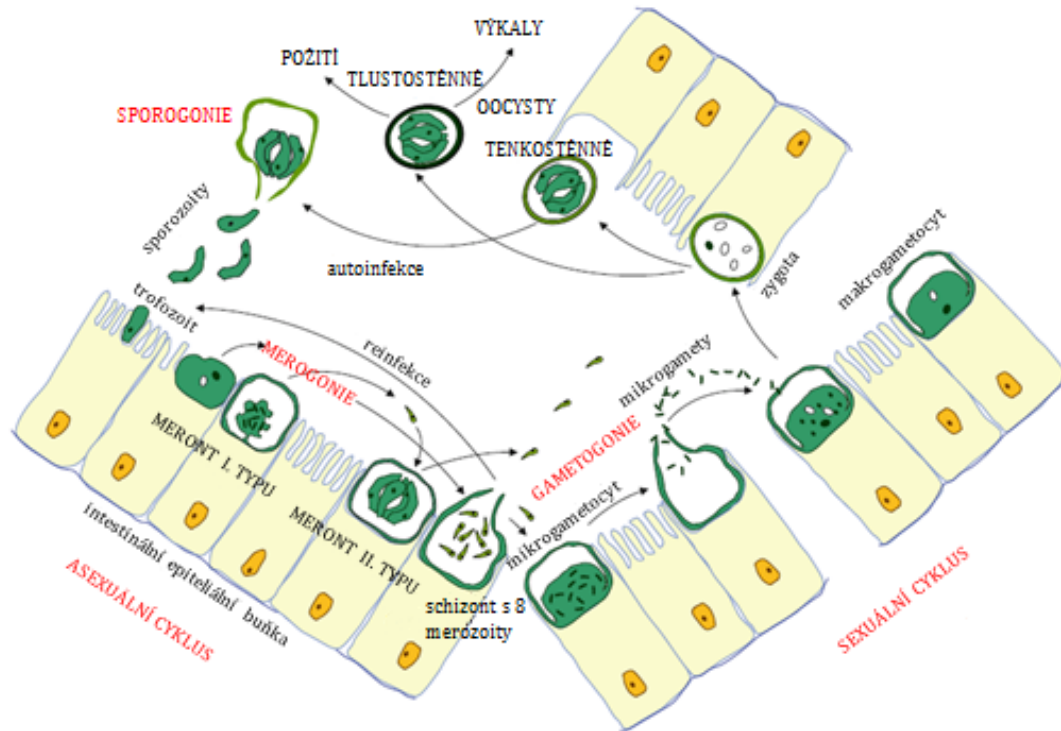
Oocysty kryptosporidií patří se svými 2-7  $\mu\text{m}$  k nejmenším oocystám (Rebanová 1998). Oocysty jsou kulovité nebo elipsovité (Jíra 2009). U některých druhů je popisován výskyt dvou typů oocyst: tenkostěnné v hostiteli zodpovědné za autoinfekci a tlustostěnné určené pro vnější prostředí a mezihostitelský přenos. U *Cryptosporidium parvum* jsou ve většině případů, asi v 80 %, oocysty silnostěnné a rezistentní k působení environmentálních vlivů. Asi ve 20 % se vyskytují oocysty tenkostěnné (Current 1988, Ditrich et al. 2005, Volf et al. 2007). Příklady oocyst kryptosporidií jsou na obrázku 2.



**Obrázek 2:** Oocysty kryptosporidií. 1 – *Cryptosporidium muris*, 2 – *C. parvum*, 3 – *C. bayleyi*, 4a, 4b – *C. meleagridis* (Chroust et al. 1998).

### 1.1.4 Životní cyklus

Životní cyklus kryptosporidií je složitý a dosud není zcela přesně objasněn. Na obrázku 3 je jeho názorná ilustrace zachycující jednotlivé vývojové fáze.



**Obrázek 3:** Životní cyklus kryptosporidií, upraveno podle Cacciò et Putignani (2014).

Kryptosporidie jsou monoxenní paraziti, a tedy procházejí životním cyklem v trávicím epitelu jednoho hostitele. Složitý životní cyklus se skládá ze 4 fází: excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie. Samotný vývojový cyklus se dělí na sexuální a asexuální reprodukční fázi. Dále je možno podle průběhu vývojového cyklu dělit zástupce na dvě různé skupiny. U první skupiny dochází k vývoji v žaludečním epitelu a u druhé ve střevním epitelu. Druhy infikující epitel střev vytvářejí menší a kulaté oocysty, zatímco druhy vyvíjející se v žaludku svého hostitele mají větší a oválný tvar (Current et al. 1986, Přecechtěl et al. 1990, Jíra 2009, Cacciò et Putignani 2014).

Nejlépe je probádaný cyklus *Cryptosporidium parvum*. Životní cykly ostatních druhů jsou však stejné nebo velmi podobné. Cyklus začíná excystací například v tenkém střevě. Uvolnění sporozoiti adherují k mikroklkům enterocytů pomocí více než 20 povrchově aktivních proteinů. Sporozoiti se mění v jednobuněčné trofozoity neboli merozoity. Ti jsou situovaní v parazitoformní vakuole pod buněčnou membránou enterocytu, nikoliv v cytoplazmě. Proto se jedná o intervalózní nebo intracelulární-extracytoplazmatickou lokalizaci, čímž se odlišují například od izospor. Prominují do průsvitu střeva, a tedy se nezanořují do cytoplazmy. Od ní jsou odděleny příchytnou ploškou, což je elektrondenzní struktura, která představuje intracelulární kompartment v apikální oblasti enterocytu. Předpokládaným místem pro příjem výživných látek je zvláštní membránová struktura parazitárního původu umístěná nad příchytnou ploškou a zvaná feeder organelle, do níž zasahuje endoplazmatické retikulum parazita. Resorpční plocha je zvětšena četnými membránovými záhyby. Tato organela je vlastní pouze kryptosporidiím. Následný energetický metabolismus závisí na glykolýze. Je jak aerobní, tak anaerobní a probíhá v redukované mitochondrii (Ditrich et al. 2005, Jíra 2009).

Z trofozoitů po třech karyokinezích procesem merogonie a tedy asexuálním množením vznikají meronti I. typu s 8 merozoity, kteří po rozrušení hostitelského enterocytu invadují další buňky. Mohou se dále množit asexuálně a vznikají další meronti I. typu nebo se formují v meronty II. typu se 4 merozoity II. generace, kteří vstupují do sexuální fáze – gametogonie (Current et al. 1986, Ditrich et al. 2005, Jíra 2009).

Gametogonie je další proces množení, kdy se vytvářejí jednojaderní makrogamonti a vícejaderní mikrogamonti. Makrogamonti dávají vzniknout makrogametocytům a z mikrogamontů se uvolňuje 16 pohyblivých mikrogamet do lumen střeva. Po fertilizaci makrogamety mikrogametou vzniká zygota a z ní oocysta s bezbarvou dvouvrstevnou stěnou. V oocystě se transformací stěny vytvoří jedna tetrazoická sporocysta obsahující reziduální tělísko (Current et al. 1986, Ditrich et al. 2005, Jíra 2009).

Sporogonie v oocystě probíhá buď ještě v enterocytech nebo až po jejím uvolnění do průsvitu střeva. V obou případech se jedná o endogenní sporulaci a oocysty jsou

infekční ihned ve vyloučené stolici. Cestou autoendoinvaze nebo autoinfekce se infekční sporozoiti uvolňují již ve střevě a napadají enterocyty, v nichž znovu proběhne cyklus merogonie (Jíra 2009, Cacciò et Putignani 2014).

Excystaci oocyst aktivují nejspíš hostitelské signály, jakými jsou teplota, změny pH, žlučové soli, proteázy, specifické lektiny a další neobjasněné faktory (Jíra 2009, Cacciò et Putignani 2014). Celý vývojový cyklus trvá 12 - 14 hodin (Ditrich et al. 2005).



## **1.2 Kryptosporidióza**

### **1.2.1 Patogenita a virulence**

O skutečnosti, zda jsou kryptosporidie schopny hostitele vůbec infikovat se rozhoduje v prvních fázích interakce sporozoitů nebo merozoitů s hostitelskou buňkou, tedy při adhezi a internalizaci (proniknutí parazita do buňky). Rozhodují faktory nazývané determinanty virulence. Jde o adhezní proteiny, sporozoitový protein bohatý na cystein, glykoproteiny a specifické lektiny. Cysteinové a serinové proteázy a argininová aminopeptidáza se podílejí na internalizaci, ale podílejí se již i na excystaci. Po adhezi sporozoitů zahajují epiteliální buňky produkci cytokinů, které aktivují fagocyty. Ty pak produkují histamin, serotonin, adenosin, prostaglandiny a několik dalších faktorů, které hlavně tlumí zánětlivé procesy ve střevě. Navíc tyto látky zvyšují sekreci vody a inhibují absorpční schopnost střeva. Buňky střevní sliznice jsou poškozovány jak přímo invazí kryptosporidie tak i nepřímo. Důsledkem je atrofie klků a hyperplazie krypt. Kryptosporidie dále inhibují apoptózu hostitelských buněk a naopak ji indukují u okolního neinfikovaného epitelu. Díky tomu je společně s tlumením zánětu zajištěno přežívání kryptosporidií ve střevní sliznici (Ditrich et al. 2005).

Minimální infekční dávka pro člověka je podle Jíry (2009) 10 – 100 oocyst. U lidí jsou nejčastější příčinou kryptosporidióz střevní druhy kryptosporidií, neboť jsou lépe adaptovány k dlouhodobému přežívání ve vnějším prostředí, než druhy žaludeční (Kváč et al. 2005).

### **1.2.2 Imunologie**

Vývoj kryptosporidie je spojen se slizničními povrchy, což znamená, že lokální imunitní reakce se váží na slizniční lymfatickou tkáň. Díky své intracelulárně-extracytoplazmatické lokalizaci se imunitní odpověď odlišuje od mechanismů imunity jiných intracelulárních parazitů. V rámci neadaptivní imunity způsobují kryptosporidie různé slizniční ochranné reakce, které omezují množení parazitů, dříve než T lymfocyty navodí zánětlivé změny a je podpořena fagocytární aktivita. V rámci adaptivní imunity se u člověka (i zvířat) zvyšují hladiny specifických imunoglobulinů v krvi a sekretu střevní sliznice. Titry IgG perzistují několik let po

nákaze, titry koproprotilátek IgA a IgM stoupají během nákazy a klesají během odeznění. HIV pozitivní či nemocní AIDS vykazují vysoké titry specifických sekrečních IgA (Jíra 2009).

V časně fázi infekce Th1 lymfocyty produkují interferon IFN- $\gamma$ , který se podílí na odolnosti enterocytů proti nákaze *C. parvum*. Existují ale i další mechanismy nezávislé na tomto interferonu. Nejdůležitější pro obrannou reakci jsou však CD4+ lymfocyty. Čím menší je jejich počet, tím větší je vnímavost k nákaze a tíže jejího průběhu, což je patrné právě u pacientů s HIV pozitivitou nebo AIDS (Jíra 2009).

### 1.2.3 Symptomatika a patogeneze

Masové rozmnožení parazitů ve střevním epitelu (zvláště výrazné u *Cryptosporidium parvum*) vede k destrukci enterocytů. Kryptosporidie způsobují zploštění kartáčkového lemu, atrofii střevních klků a následnou malabsorpci. Postupnou dilatací střevních krypt dochází ke snížení enzymatické aktivity střevní mukózy. Hypersekrece tekutin a elektrolytů v proximální části tenkého střeva se klinicky manifestuje vodnatými nekrvavými průjmy, které při nákazách *C. parvum* mají charakter průjmu cholerového. Průjmy jsou doprovázeny dalšími gastrointestinálními obtížemi, jako jsou bolesti břicha a křeče, nevolnost, nechutenství, dále ztráta hmotnosti a únava. U imunokompetentních jedinců má onemocnění obvykle dočasný charakter a i bez léčby ustoupí během několika týdnů. U osob s rozvrácenou imunitou (např. AIDS) dochází k trvalému onemocnění, často s dramatickým průběhem a život ohrožujícími následky, protože způsobuje dehydrataci, rozvrat rovnováhy elektrolytů, hubnutí způsobené neschopností střeva resorbovat živiny (Bednář et al. 1996, Chroust et al. 1998, Nester 1998, Kožíšek 2005). Nespecifickými příznaky mohou být i bolesti hlavy, svalů, celková slabost a malátnost (Ramirez et al. 2004). Symptomy jsou u dospělých a dětí podobné, ale kryptosporidióza prodělaná v raném dětství může mít trvalý vliv na růst a vývoj dítěte (Mølbak et al. 1997), dokonce i na duševní rozvoj (Jex et al. 2011).

Symptomy infekce *C. parvum* jsou v rozmezí mírného průjmu až více těžkého a hojného průjmu, záleží na imunokompetenci pacientů. Po krátké prepatentní periodě trvající obvykle 2-10 dní nastupuje patentní perioda trvající 6-40 dní. Perioda vodnatých průjmů je dlouhá asi 4-10 dní a u imunokompetentních jedinců

dojde k samovolnému vyléčení. Kryptosporidióza může probíhat i bezpříznakově. U imunokompromitovaných jedinců se jednotlivé periody prodlužují a průjem přechází v chronický (Anane 2011).

V USA byly popsány čtyři hlavní klinické syndromy: chronický průjem postihující 36 % pacientů, choleře podobné onemocnění u 33 % postižených, přechodný průjem u 15% nemocných a relapsní onemocnění u 15 % pacientů (Anane 2011).

Onemocnění diseminuje i do dalších orgánů. Šíří se do dalších úseků zažívacího traktu směrem kraniálním i kaudálním, např. *C. parvum* byla nalezena v trávicí trubici od faryngu až po rektum. Dále postihuje sliznici žlučových, vývody pankreatu a dýchací trakt, kde způsobuje pneumonii. Schopnost sporozoitů se uvolňovat z oocysty i spontánně částečně vysvětluje, proč kryptosporidie mohou infikovat extraintestinální místa lokalizace, jako je právě dýchací trakt nebo spojivka oka (Talaro et Talaro 1993, Chroust et al. 1998, Ditrich et al. 2005, Goering 2009, Jíra 2009).

Bylo popsáno mnoho případů gastritidy. Jedny z nejkomplicovanějších gastrických problémů jsou antrální zúžení žaludku a výstupní obstrukce vedoucí k nevolnosti a zvracení, které nakonec mohou způsobit závažné snížení příjmu živin (Iribarren et al. 1997, Moon et al. 1999, Anane 2011). V neposlední řadě kryptosporidióza způsobuje zánět slepého střeva (Oberhuber et al. 1991). U pacientů s AIDS trpících kryptosporidiózou je důležitou komplikací také cholangitida, zejména sklerotizující cholangitida, tedy zánět a fibróza žlučových cest. Onemocnění se projevuje výraznou bolestí a v důsledku může vést až k cirhóze jater (Forbes et al. 1993).

Kryptosporidióza je velmi běžná infekce u lidí s AIDS. U jedinců s CD4+ T buňkami v počtu nižším než 200/mm<sup>3</sup> krve je průjem nevratný, dochází ke smrti následkem metabolického rozvratu (Ditrich et al. 2005, Goering et al. 2009). Mezi další imunokompromitované osoby, které mohou onemocnět s vysokým rizikem kryptosporidiózou, patří jedinci trpící syndromem hyperimmunoglobulinemie (Hyper-IgM imunodeficit X-vázaný = XHIM), s mutací v genu pro antigenní ligand CD40, jedinci s deficitem  $\gamma$ -interferonu, děti trpící leukémií a pacienti po transplantaci orgánů, například ledvin (Cacciò et al. 2009, Cacciò et Putignani 2014). Za zmínku stojí souvislost mezi XHIM syndromem a nádorem slinivky, jater a

žlučových cest, ukázalo se, že kryptosporidie mohou hrát důležitou roli při vývoji malignity (Hayward et al. 1997).

#### **1.2.4 Terapie**

Specifická léčba se zřetelným účinkem zatím neexistuje. Onemocnění však reaguje na symptomatickou léčbu s náhradou tekutin nebo je možné podávat střevní dezinficiens. Doposud bylo vyzkoušeno několik léčiv, ale často s nevýrazným účinkem, jako tomu je u spiramycinu a sulfonamidů. Nitazoxanide je nedostatečně vyhodnocen, paromycin a azitromycin snížil tvorbu oocyst, ale nepotlačil infekci (Přecechtěl et al. 1990, Greenwood et al. 1999, Goering et al. 2009).

Symptomatická léčba je omezena na rehydrataci perorálně či infuzí roztoky elektrolytů a na podpůrnou terapii dietou (Jíra 2009). U pacientů s HIV infekcí je nejlepších výsledků dosaženo antiretrovirální terapií, Highly active antiretroviral therapy (HAART). Léčba zaznamenává zlepšování symptomů průjmu. To může být v důsledku inhibitorů proteázy používané v kombinované terapii interferující přímo s *C. parvum* proteázou podílející se na protozoárním životním cyklu. Kromě toho má HAART za výsledek snížení zátěže HIV (Goering et al. 2009).

K tlumení a léčbě kryptosporidiózy je možné použít probiotických bakterií. Metabolity *Lactobacillus acidophilus* a *L. reuteri* snižují infektivitu a počty oocyst u telat i imunosupresivních pacientů (Ditrich et al. 2005). U telat byla rovněž vyzkoušena perorální vakcinace oocystami ozářenými  $\gamma$  zářením (Hubálek 2000).

## 1.3 Epidemiologie a prevalence

### 1.3.1 Způsob přenosu

Nákaza se šíří fekálně orální cestou a také inhalací. Je prokázán antropozoonotický i interhumánní přenos. U *Cryptosporidium hominis* je to zvláště interhumánní přenos. Imunodeficitní postižený může průjmem vyloučit až 1 mld. oocyst za den. K přenosu dochází také kontaktem s faeces dobytka a při pití kontaminované vody. U člověka bylo popsáno i šíření vzdušnou cestou. Celkově nejzávažnější rizikový faktor je kontaminovaná voda, především co do počtu nakažených osob. Nakazit se můžeme i z vody slané či požíváním mořských živočichů, například mlžů (*Cerastoderma edule*, *Mytilus galloprovincialis*). Mechanicky mohou být přenášeny i vektory (mouchami a koprofágními brouky), u kterých se vyskytují na jejich vnějším povrchu a v trávicí trubici (Chroust et al. 1998, Hubálek 2000, Ditrich et al. 2005, Jíra 2009).

Nejčastěji je zdrojem infekce kontaminovaná pitná voda, protože kryptosporidie mají vysokou odolnost vůči běžně používaným dávkám chloru nebo oxidu chloričitého. Nakažení jídlem se ukazuje jako nejméně častá příčina, přesto se lze nakazit nepasterizovaným mlékem, jogurty, tepelně neupravenými masnými výrobky, zeleninou či mošty z ovoce. Například v jogurtové kultuře zůstávají při 4 °C oocysty životaschopné minimálně 8 dní (Kváč et al. 2005, Kožíšek 2005).

Mezi nejrizikovější skupiny patří děti a zaměstnanci v pečovatelských domech, farmáři a zdravotní pracovníci (Fayer et al. 2000). Dále turisté cestující do rozvojových zemí s vysokým stupněm výskytu infekce (Ramirez et al. 2004). Oocysty *Cryptosporidium parvum* byly nalezeny na povrchu syrové zeleniny prodávané na tržištích v Kostarice, Peru a Limě (Monge et Arias 1996). Zelenina bývá kontaminována zvířecím trusem, nejčastěji v podobě hnojiva a také kontaminovanou zálivkou. Snadno se nakazí právě pěstitelé této zeleniny žijící ve špatných hygienických podmínkách (Fayer et al. 2000).

### 1.3.2 Prevence

Významným epidemiologickým faktorem kryptosporidií je vysoká odolnost oocyst vůči zevním vlivům se zachováním jejich infekivity. Přesto počet životaschopných oocyst klesá působením různých přirozených vlivů, hraje zde roli například teplota, hnilobné procesy a voda, protože oocysty jsou málo odolné vůči vyschnutí (Kváč et al. 2005).

Nejlépe kryptosporidióze můžeme předejít hygienickými opatřeními, budováním kanalizací a v režimu čištění odpadních vod. Cílem těchto opatření je zamezit kontaminaci povrchových vod fekáliemi (Ditrich 2010). V současnosti nejvýznamnější krok pro odstranění oocyst při úpravě pitné vody je písková filtrace. Budoucností v odstraňování či devitalizaci kryptosporidií je membránová filtrace či ošetření vody UV zářením. Při pokusech s UV zářením se ukázalo, že samo o sobě má pouze částečný inaktivační účinek. Společně s působením teploty 45 °C již po 2 hodinách expozice byly inaktivovány všechny oocysty. Jako nejvýznamnější inaktivační faktor se tedy ukazuje právě teplota. Největšího inaktivačního účinku lze dosáhnout při teplotách pod -20 °C a nad 45 °C při dostatečné době expozice (Kváč et al. 2005).

Také podle Chrousta et al. (1998) teplota a vlhkost umožňují oocystám dlouhou dobu životaschopnosti, které zůstávají infekční až po dobu jednoho roku. Oocysty kryptosporidií spolehlivě ničí peroxid vodíku a chlordioxid, vysoké teploty (65 °C za 20 minut) a zmrazení. Ozonizace vody rovněž napomáhá devitalizaci oocyst. Naopak jsou oocysty velmi odolné vůči běžným dezinfekčním prostředkům (amoniak a formaldehyd), používaných v lékařských zařízeních a laboratořích (Fayer et al. 2000).

Nejjednodušší způsob dezinfekce vod určených pro pitný režim hlavně v tropických a subtropických oblastech, kde není přístup ke kvalitní pitné vodě, je solární dezinfekce, kde je slunce zdrojem přírodního UV záření. Vodu v plastových lahvích je možné vystavit působení přímého slunečního záření. Doba expozice je nutná minimálně 4 - 5 hodin, záleží na typu plastového obalu: běžný PET polymer dovoluje UV záření pronikat obalem, stejně tak PE a PP. Jako umělý zdroj je možné použít speciální výbojky naplněné párami rtuti. Jako další způsob dezinfekce je možné

působení tepla. Při 20 °C jsou oocysty infekční 6 měsíců, při 25-30 °C jen 3 měsíce, a nakonec při 72 °C jsou po 5 sekundách oocysty neinfekční. Nejlepší je využití kombinace obou způsobů, tedy působení UV zářením 4 – 8 hodin a teploty 45°C. UV záření a teplo jsou tedy vhodné a levné alternativy dezinfekce vod kontaminovaných kryptosporidii (Květoňová et al. 2004).

Roli při odstraňování oocyst kryptosporidií z vody mají různé vodní bezobratlí. V povrchových vodách se oocysty dostávají do kontaktu s planktonními i bentickými bezobratlými živočichy a pro mnohé z nich se mohou stát součástí jejich potravy. Predační aktivita byla zaznamenána u nálevníků (*Euplotes patella*, *Paramecium caudatum*, *Stylonychia mytilus*). Oocysty, které prošly trávicím traktem vířníků (*Asplanchna*, *Brachionus*, *Epiphanus*, *Euchlanis*, *Monostyla*, *Philodina*), již nejsou schopné další infekce. Perloočky *Daphnia pulicaria* také snižují infektivitu oocyst a aktivně je vyhledávají. Proběhly pokusy také na žábřonozkách a mlžích, ale ukázalo se, že jsou naopak přenašeči oocyst. Žábřonozky infikují svoje predátory – ryby. Na žábřách mlžů mohou dlouhodobě přežívat. Druhy, které jsou pojídány v syrovém stavu, například ústřice, mohou infikovat člověka. Některé druhy ale opět působí na oocysty inaktivačně. Mlži se tak spíše využívají jako indikátory kontaminace vody kryptosporidii, kteří je také pomalu vychytávají. Jako zdroj infekce v našich podmínkách se neuplatňují (Ditrich et al. 2010).

Ditrich et al. (2004) provedli studii založenou na použití mlžů jako indikátorů výskytu kryptosporidií. Pokusy proběhly na písňiku Mělice a na přehradě Orlík. Z Mělic použili velevruba malířského (*Unio pictorum*) a z Orlíku škebli říční (*Anodonta cygnea*). Žábry těchto mlžů se ukázaly jako účinný filtr, protože zachytily oocysty *Cryptosporidium parvum*.

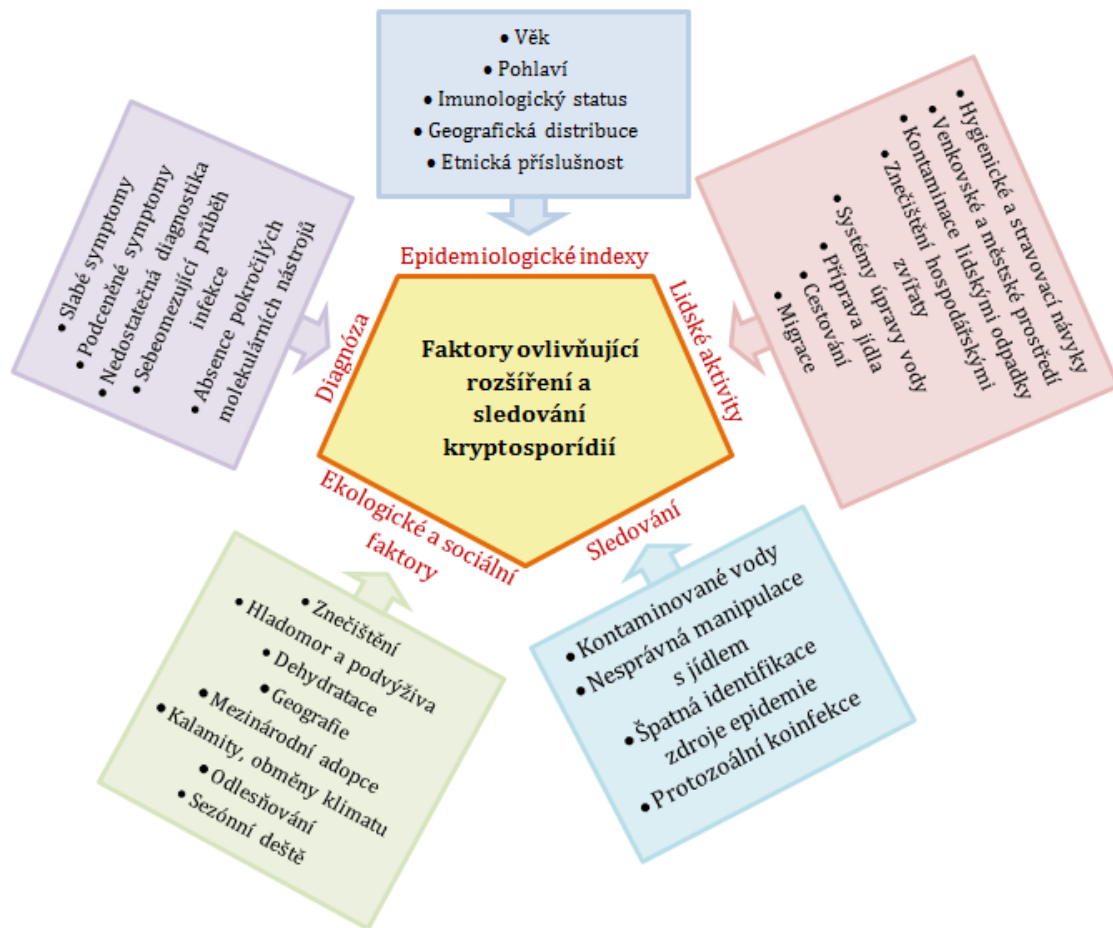
### 1.3.3 Epidemiologie

Velmi významným epidemiologickým faktorem je hostitelská specifita a od ní se odvíjející možnost přenosu z jednoho hostitelského druhu na jiný. Většina starších údajů se vztahuje k druhu *Cryptosporidium parvum* s. l. a často se jedná o informace týkající se několika druhů s odlišným hostitelským spektrem. Dříve byly běžně zaměňovány jednotlivé genotypy zaměřené na různé hostitele, u *C. parvum* je znám myší genotyp zaměřený na hlodavce a bovinní typ s nízkou hostitelskou specifitou schopný infikovat různé druhy savců (včetně myší) (Ditrich et al. 2005). Většina genotypů je v současnosti považována za samostatné druhy, viz následující kapitoly týkající se jednotlivých druhů.

Kontaminací vodních zdrojů oocystami může dojít k masivním epidemiím. Na vině při epidemiích kryptosporidiózy z vody jsou zejména *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, často působí současně více druhů (Ditrich 2010). V České republice nebyla dosud hlášena žádná epidemie z vody způsobená kryptosporidii. Není však vyloučen jejich podíl na některé z epidemií, u nichž se původce nepodařilo prokázat (Kožíšek 2005).

Na obrázku 4 jsou shrnuty faktory ovlivňující rozšíření kryptosporidií a kontrolu nad nimi. Na epidemie kryptosporidióz mají vliv zejména geografická distribuce, se kterou souvisí hygienické a stravovací návyky, systém úpravy vody, venkovské či městské prostředí. Důležitý je hlavně imunologický status, dále věk a pohlaví. Je potřeba sledovat kontaminace vod, nepodceňovat symptomy a správně diagnostikovat (Cacciò et Putignani 2014). Zvýšené teploty a srážky jsou také spojovány s nárůstem výskytu kryptosporidiózy, v tropickém podnebí se uplatňují zejména srážky, v mírném podnebí zvýšená teplota (Jagai et al. 2009). Výskyt kryptosporidióz vykazuje také silnou sezónnost. Sezónnost se pro různé druhy liší vzhledem k rozdílu v přenosových cestách (McLauchlin et al. 2000).





**Obrázek 4:** Faktory ovlivňující rozšíření kryptosporidií a kontrola nad nimi, zpracováno podle Cacciò et Putignani (2014).

### 1.3.4 Promořenost

U pacientů s AIDS působí kryptosporidie jako oportunní patogen (Carey et al. 2011). Jejich rozšíření je kosmopolitní. Největší prevalence je v zemích třetího světa z důvodu neadekvátní hygieny (Talaro et Talaro 1993). Výskyt oocyst kryptosporidií se ve stolici u lidí pohybuje kolem 4 % u dětí a 1 - 2 % u dospělých, v různých zeměpisných šířkách může dosáhnout prevalence u člověka 6 - 27 % při asymptomatickém průběhu onemocnění. Imunokompetentní děti onemocní nejčastěji v prvních dvou letech života (Chroust et al. 1998).

Na deltě řeky Nil proběhla dvouletá studie kryptosporidiózy u dětí s průjmem. Byla zjištěna prevalence 17 %, nakaženo bylo 241 dětí z 1275. U dětí do jednoho roku věku byla 2,4x větší pravděpodobnost, že jsou infikované oproti starším dětem. Děti ve věku 1 - 2 let měly 1,9x větší pravděpodobnost infekce než starší děti. Dále se ukázalo, že kojení má význam v ochraně proti onemocnění (Abdel-Messih et al.

2005). Studie provedená v Nigerii zjistila, že prevalence u dětí je 19,4 %, bylo nakaženo 134 z 692 dětí (Molloy et al. 2011).

O vysoké prevalenci u dětí svědčí i studie provedená v Peru. Během čtyř let bylo sledováno 533 dětí. Za tu dobu se infekce vyskytla 156x u 109 dětí (Cama et al. 2008). V Peru proběhla i jedna z nejrozsáhlejších studií kryptosporidiózy imunodeficientních pacientů. Kryptosporidie byly nalezeny u 354 HIV pozitivních pacientů. Objevené druhy s procentuálním zastoupením: *Cryptosporidium hominis* 67,5 %, *C. meleagridis* 12,6 %, *C. parvum* 11,3 %, *C. canis* 4 %, *C. felis* 3,3 %, *C. suis* 0,5 % (Ditrich et al. 2005).

Studie o promořenosti kryptosporidií u různých etnik proběhla ve východním Slovensku. Celkem byla vyšetřena stolice 103 dětí, 54 chlapců a 49 dívek. 53 dětí bylo romského původu a 50 dětí neromského původu představovalo kontrolní skupinu. Ukázalo se, že riziko kryptosporidiové infekce je u romských dětí téměř dvanáctkrát vyšší v porovnání s neromskými dětmi (Hasajová et al. 2014).

Vzhledem k tomu, že onemocnění probíhá ve velkém množství případů asymptomaticky, jsou prováděny studie i tohoto typu. V Indonésii bylo vyšetřeno 917 pacientů s akutním průjmovým onemocněním a byla zjištěna promořenost oocystami u 2,8 % (26 pacientů). V kontrolní skupině bylo 1043 pacientů a promořenost byla 1,4 % (15 pacientů) (Katsumata et al. 1998). Byla provedena i studie hostitelské genetické náchylnosti k infekci. V Bangladéši po dobu tří let bylo sledováno 226 dětí ve věku od 2 do 5 let. U 42,5 % byla diagnostikována kryptosporidiová infekce. 22,6 % dětí mělo asymptomatickou infekci, 25,7 % mělo symptomatickou kryptosporidiózu, z nichž 29,3 % mělo recidivující onemocnění. Dále se ukázalo, že děti se symptomatickou i asymptomatickou infekcí s největší pravděpodobností nesou lidský leukocytární antigen. Ten může mít různé alely (třídy I a II). V budoucnu by se mohla ukázat souvislost mezi symptomatickou a asymptomatickou infekcí s příslušnou alelou. Jednalo se o první popis genetického komponentu imunitní odpovědi na kryptosporidiovou infekci (Kirkpatrick et al. 2008).

Jedna z hlavních příčin průjmového onemocnění v rozvojových zemích je právě kryptosporidióza (Nemes 2009, Shirley et al. 2012). Jenže kontrola a léčení infekce

jsou stále problematické. Kontrola je zaměřena především na prevenci, která je nedostatečná. Ohroženi jsou nejen imunokompromitovaní jedinci a děti, ale i starší osoby a zejména podvyživení lidé. Ti dále ohrožují i imunokompetentní osoby. Proto je potřeba sledovat globální infekci na několika úrovních, a to i u nesymptomatických osob. Kryptosporidíóza je stále podceňována i díky omezenému používání vhodných diagnostických nástrojů (Cacciò et Putignani 2014).

Co se týče jednotlivých druhů kryptosporidií, jejich geografická distribuce se liší. Xiao et Ryana (2008) zjistili, že *Cryptosporidium parvum* a *C. hominis* jsou zodpovědné za více než 90 % případů lidské kryptosporidíózy ve většině oblastí. Ve Spojeném království, jiných evropských zemích a Novém Zélandu je *C. parvum* zodpovědný za více infekcí než *C. hominis* (Xiao 2010). Na Středním východě je *C. parvum* dominantním druhem u lidí. *C. hominis* je zase zodpovědný za více infekcí ve Spojených státech, Austrálii, Číně, Japonsku a ve většině rozvojových zemích. Ale také počet onemocnění způsobených *C. meleagridis* může být v určitých oblastech světa stejně vysoký jako u *C. parvum* (Cama et al. 2008).

Na území České republiky toto onemocnění není příliš časté. Epidemie z vody nebyla zaznamenána. HIV pozitivních pacientů, ve srovnání s jinými státy, u nás také není velké množství. Přesto u nich nalézáme zejména *C. parvum* a *C. hominis*, ten spíše vzácně. (Ditrich et al. 2005, Kváč et al. 2005). Podle Pumanna et Šaška (2004) je výskyt oocyst v povrchových vodách běžný. Nejčastějším zdrojem oocyst v nich jsou zvířata volně žijící i domácí a nečištěné i čištěné odpadní vody. Koncentrace oocyst ve vodě však bývá nízká.

## 1.4 Druhy kryptosporidií

V současné době existuje 30 platných pojmenovaných druhů kryptosporidií, 14 z nich parazituje u lidí, 28 z 30 druhů mohou být identifikovány s použitím úplné nebo částečné ssrRNA (Šlapeta 2013). V následující podkapitole jsou uvedeny základní informace o nejdůležitějších kryptosporidiích infikujících člověka. Po ní následuje podkapitola s tabulkou 1, kde je soupis všech platných druhů, a obrázek 5 s fylogenetickým stromem. Druhy jsou řazeny podle roku objevení druhů.

### 1.4.1 Druhy kryptosporidií infikující člověka

#### ***Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907 – kryptosporidie myši**

Kryptosporidie infikuje žaludeční žlázy zejména hlodavců (křeček, veverka, myšice, hraboš), ale také velbloudů, damanů, makaků a zároveň imunokompetentní a imunodeficitní lidi. Jeho patogenita je ale nízká. Oocysty dosahují velikosti 7,4 x 5,6 μm (Chroust et al. 1998, Xiao et al. 2004b, Ditrich et al. 2005, Jíra 2009).

#### ***Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912 – kryptosporidie malá**

Tento druh zahrnuje především takzvaný genotyp II, bovinní, ale dříve zahrnoval řadu dalších genotypů, které jsou v současnosti popsány jako samostatné druhy. *C. parvum* s. s. je druh s nejširším hostitelským spektrem napadající střevo: infikuje kopytníky, hlodavce, zajícovce, primáty včetně člověka, šelmy, pravděpodobně i další řády, dokonce i ptáky (experimentálně). Předpokládá se, že je infekční pro většinu savců. Je nejlépe prozkoumaným druhem a týká se ho většina informací o imunitní odpovědi, biochemických cyklech apod. V České republice je nejvíce rozšířený v chovech hospodářských zvířat, nalézáme ho u člověka, zejména u dětí. Oocysty jsou přítomny v povrchových i hlubinných vodních zdrojích, jež představují relativně vysoké riziko pro imunodeficientní i imunokompetentní jedince. Zdrojem nákazy pro člověka jsou nejčastěji telata. Velikost oocyst je 5,4 x 4,5 μm (Chroust et al. 1998, De Graaf et al. 1999, Fayer et al. 2000, Ditrich et al. 2005, Jíra 2009, Votava et al. 2010).

### ***Cryptosporidium meleagridis* Slavin, 1955 – kryptosporidie krocaní**

Jedná se o druh poprvé popsáný u krocana, ale je zde zahrnut i genotyp III izolovaný u lidí. Bylo popsáno několik subtypů. Je infekční pro některé druhy domácích a divokých ptáků, kde parazituje ve střevě, a dále je infekční pro imunosuprimované myši. Experimentálně lze přenést i na jiné druhy, např. hlodavce a telata. Byl objeven jako původce několika epidemií z vody (Velká Británie). Představuje riziko pro imunodeficitní i imunokompetentní jedince. Oocysty jsou velké 5,4 x 4,6 µm (Chroust et al. 1998, Ditrich et al. 2005, Jíra 2009).

### ***Cryptosporidium felis* Iseki, 1979 – kryptosporidie kočičí**

Druh vyskytující se zejména u kočkovitých šelem, ale také u hovězího skotu a lidí. Značně se podobá *C. parvum*, také napadá střevo, ale liší se od něj menšími oocystami. Zatím u tohoto druhu nebyly shromážděny dostatečné počty údajů, ale pravděpodobně také představuje riziko pro imunodeficitní i imunokompetentní jedince (Ditrich et al. 2005, Jíra 2009).

### ***Cryptosporidium andersoni* Lindsay, Upton, Owens, Morgan, Mead et Blagburn, 2000 – kryptosporidie tuří**

Kryptosporidie infikuje žaludeční žlázy (slez) hovězího skotu, velblouda, sviště, gazely. Byly prokázány u pacientů s AIDS. Není infekční pro myši a některé hlodavce, stejně tak pro kuřata. Oocysty mají velikost 7,4 x 5,5 µm (Lindsay et al. 2000, Sréter et al. 2000, Ditrich et al. 2005, Jíra 2009).

### ***Cryptosporidium canis* Fayer, Trout, Xiao, Morgan, Lal et Dubey, 2001 – kryptosporidie psí**

Původně byl popsán jako psí genotyp, ale jedná se o samostatný druh zahrnující vlastní genotypy (lidský, liščí, psí). Mimo psa a lišku napadá také kojota. Parazituje v tenkém střevě. U člověka se s ním setkáváme u imunosuprimovaných pacientů a imunokompetentních dětí. Velikost oocyst je 4,9 x 4,7 µm (Fayer et al. 2001, Ditrich et al. 2005, Jíra 2009).

***Cryptosporidium hominis*** Morgan-Ryan, Fall, Ward, Hijjawi, Sulaiman, Fayer, Thompson, Olson et Xiao, 2002 – **kryptosporidie lidská**

Druh napadající tenké střevo je specializovaný na člověka a donedávna byl označován jako genotyp I nebo lidský genotyp. Kromě člověka je vzácně nalézán u opic, jeřábů, dugonga. Tento druh by neměl být infekční pro myši, krysy, kočky, psy a hovězí skot. Pro člověka je velmi virulentní, s vysokým potenciálem interhumánního přenosu. Je zodpovědný za epidemie z vody včetně největší v Milwaukee z roku 1993 (průjemové onemocnění proběhlo u 403 tisíc lidí poté, co pili vodu z městského vodovodu kontaminovanou potokem vytékajícím z farmy, kde se nacházela infikovaná zvířata). U nás není běžný stejně jako *C. parvum*, ale představuje velké riziko jak pro imunodeficientní, tak i imunokompetentní jedince. Oocysty jsou nerozlišitelné od oocyst *C. parvum* a měří 4,6 – 5,4 x 3,8 - 4,7 µm (Atlas 1995, Ditrich et al. 2005, Jíra 2009).

***Cryptosporidium pestis*** Šlapeta, 2006

Tento druh nacházející se v tenkém střevě skotu byl dříve určován jako *Cryptosporidium parvum* bovine genotype. Nejčastěji se vyskytuje u telat do dvou týdnů věku, později je nahrazován dominantnější *C. bovis*. Je infekční pro přežvýkavce a savce včetně člověka. Při silné infekci může napadat i tlusté střevo a žlučovody (Šlapeta 2006).

***Cryptosporidium suis*** Ryan, Monis, Enemark, Sulaiman, Samarasingher, Read, Buddle, Robertson, Zhou, Thompson et Xiao, 2004 – **kryptosporidie prasečí**

Kryptosporidie parazitující v tenkém střevě. Dříve popisovaná jako porcine genotyp I. Vyskytuje se u prasat a pacientů s poruchou imunity. Oocysty nelze strukturálně odlišit od *C. parvum*, jejich velikost je 4,4 – 4,9 x 4,0 - 4,3 µm (Ditrich et al. 2005, Jíra 2009).

***Cryptosporidium ubiquitum*** Fayer, Santín et Macarasin, 2010

Druh byl dříve nazván jako *Cryptosporidium cervine* genotype. Vyskytuje se u divoce žijících i domestikovaných přežvýkavců, hlodavců, masožravců, dikobrazů, primátů a člověka. Jeho rozšíření je kosmopolitní a je nejčastěji nalézáným druhem

kryptosporidií ve vodních zdrojích (Xiao et al. 2000, Xiao et al. 2006, Fayer et al. 2010).

### ***Cryptosporidium viatorum*** Elwin, Hadfield, Robinson, Crouch et Chalmers, 2012

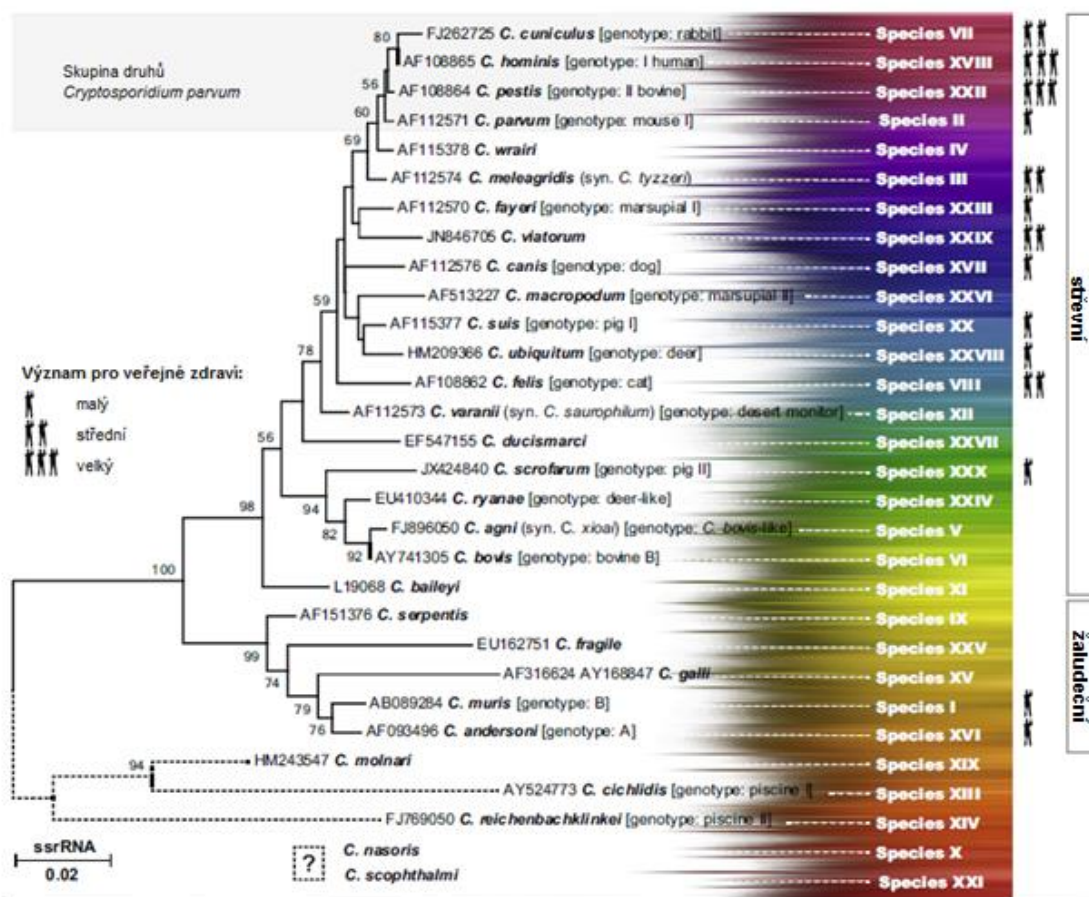
Tento druh byl určen u turistů z Velké Británie, kteří navštívili Indii a projevíly se u nich gastrointestinální příznaky zahrnující průjemy, bolesti břicha, nevolnost, zvracení, horečku (Elwin et al. 2012).

#### **1.4.2 Soupis všech současně platných druhů**

**Tabulka 1:** Soupis všech platných druhů podle Šlapety (2013) s třídami hostitelů a významem pro zdraví člověka.

Č.	Druh kryptosporidie	Objevitel a rok	Význam pro veř. zdraví	Hostitel
1.	<i>C. muris</i>	Tyzzler, 1907	malý	savci, ptáci
2.	<i>C. parvum</i>	Tyzzler, 1912	malý	savci
3.	<i>C. meleagridis</i> (syn. <i>C. tyzzleri</i> )	Slavin 1955 (Levine 1961)	střední	savci, ptáci
4.	<i>C. wrairi</i>	Vetterling, Jervis, Merrill et Sprinz 1971	není	savci
5.	<i>C. agni</i> (syn. <i>C. xiaoi</i> )	Barker et Carbonell 1974 (Fayer et Santín 2009)	není	savci
6.	<i>C. bovis</i>	Barker et Carbonell 1975	není	savci
7.	<i>C. cuniculus</i>	Inman et Takeuchi 1979	střední	savci
8.	<i>C. felis</i>	Iseki 1979	střední	savci
9.	<i>C. serpentis</i>	Levine 1980	není	plazi, savci
10.	<i>C. naroris</i>	Hoover, Hoerr, Carlton, Hinsman et Ferguson 1981	není	ryby
11.	<i>C. baileyi</i>	Current, Upton et Haynes, 1986	není	ptáci
12.	<i>C. varani</i> (syn. <i>C. saurophilum</i> )	Pavlásek, Lávičková, Horák, Král et Král, 1995 (Koudela et Modrý, 1998)	není	plazi
13.	<i>C. cichlidis</i>	Papema et Vilenkin, 1996	není	ryby
14.	<i>C. reichenbachklinkei</i>	Papema et Vilenkin, 1996	není	ryby
15.	<i>C. galli</i>	Pavlásek, 1999	není	ptáci
16.	<i>C. andersoni</i>	Lindsay, Upton, Owens, Morgan, Mead, et Blagburn, 2000	malý	savci
17.	<i>C. canis</i>	Fayer, Trout, Xiao, Morgan, Lal et Dubey, 2001	menší	savci
18.	<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan, Fall, Ward, Hijjawi, Sulaiman, Fayer, Thompson, Olson, Lal et Xiao, 2002	velký	savci
19.	<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero et Sitjà-Bobadilla, 2002	není	ryby
20.	<i>C. suis</i>	Ryan, Monis, Enemark, Sulaiman, Samarasinghe, Read, Buddle, Robertson, Zhou, Thompson et Xiao, 2004	malý	savci

Č.	Druh kryptosporidie	Objevitel a rok	Význam pro veř. zdraví	Hostitel
21.	<i>C. scophthalmi</i>	Alvarez-Pellitero, Quiroga, Sitjà-Bobadilla, Redondo, Palenzuela, Padrós, Vázquez et Nieto, 2004	není	ryby
22.	<i>C. pestis</i>	Šlapeta, 2006	velký	savci
23.	<i>C. fayeri</i>	Ryan, Power et Xiao, 2008	malý	savci
24.	<i>C. ryanae</i>	Fayer, Santín et Trout, 2008	není	savci
25.	<i>C. fragile</i>	Jirků, Valigurová, Koudela, Křížek, Modrý et Šlapeta, 2008	není	obojživelníci
26.	<i>C. macropodum</i>	Power et Ryan, 2008	není	savci
27.	<i>C. ducismarci</i>	Traversa, 2010	není	plazi
28.	<i>C. ubiquitum</i>	Fayer, Santín et Macarisin, 2010	malý	savci
29.	<i>C. viatorum</i>	Elwin, Hadfield, Robinson, Crouch et Chalmers, 2012	střední	savci
30.	<i>C. scrofarum</i>	Kváč, Kestřánová, Pinková, Květoňová, Kalinová, Wagnerová, Kotková, Vítovec, Ditrich, McEvoy, Stenger et Sak, 2013	malý	savci



**Obrázek 5:** Fylogenetický strom sestavený na základě ssrRNA sekvencí, upraveno podle Šlapety (2013).



## 1.5 Diagnostika

### 1.5.1 Diagnostika - mikroskopie

Diagnostika protozoárních nákaz je založena zejména na přímém mikroskopickém důkazu parazita (Jílek et al. 2002, Schindler 2014). Odebírá se vzorek stolice, kterou vyšetřujeme v tlustém nátěru (Votava 2000). Oocysty jsou částečně acidorezistentní, lze je proto prokázat modifikovanou barvicí Ziehl-Neelsenovou metodou, při níž se jako první barvivo používá karbolfuchsin nebo auramin (Schindler 2014). Mikroskopovací a další techniky jsou shrnuty v tabulce 2 na závěr kapitoly.

Princip acidorezistence je založen na tom, že buněčná stěna pomalu váže barvivo, které se udrží i při moření silnou kyselinou. Podstatu acidorezistence ovlivňuje obsah mykolových kyselin v cytoplazmatické membráně (Dobiáš et al. 2003). Rozlišení mezi druhy je pak možné měřením velikosti jejich oocyst a pozorováním jejich charakteristického tvaru (Carey et al. 2011).

Obdobně lze využít tzv. negativního barvení podle Heineho a diferenciálního barvení anilin-karbol-methylviolet a dobarvení tartrazinem, tedy dle Miláčka a Vítovce (Chroust et al. 1998). V České republice se používá zejména toto barvení (Votava et al. 2010). Další barvicí technikou je barvení podle Giemsa-Romanovského, v němž se cytoplazma oocyst barví modře se zřetelně patrnými sporozoity a s přítomností zbytkového tělíska. Méně časté je barvení akridinovou oranží (Jíra 2009). Oocysty je možné detekovat také dalším fluorescenčním barvivem auramin-rhodaminem (Anane 2010).

Další možností diagnostiky prováděné mikroskopicky ze stolice je například použití některých koncentračních metod (Přecechtěl et al. 1990). Hojně se využívá koncentrační metody dle Sheathera (Chroust et al. 1998), při které probíhá flotace stolice v nasyceném roztoku sacharózy (Hubálek 2000). Oocysty mohou být také koncentrovány modifikovanou odstředivou flotací v roztoku síranu zinečnatého. Další koncentrační technika zahrnuje formalín-ethyl acetát sedimentaci a následuje vrstvení a flotace přes hypertonický roztok chloridu sodného, aby se oddělily

oocysty od nečistot stolice. Následuje světelné mikroskopování s fázovým kontrastem (Anane 2011).

U mrtvých organismů se používá nejen mikroskopický nález oocyst ve stolici, ale také nález vývojových stádií parazita a oocyst v duodenální biopsii (Bednář et al. 1996, Hubálek 2000). Zejména u zvířat oocysty diagnostikujeme v histologických řezech nebo seškrabech sliznice tenkého střeva. Po barvení v hematoxilin-eosinu se kryptosporidie jeví jako drobná, sférická tělíska o velikosti 2-5  $\mu\text{m}$ , nacházejí se v zóně kartáčového lemu enterocytů tenkého střeva, kde se barví bazofilně (Chroust et al. 1998).

V poslední době se často používají imunofluorescenční techniky a imunochromatografické testy (Votava et al. 2003, Anane 2011). Detekce se provádí pomocí detekčních sad kopro-antigen (Anane 2011). K detekci oocyst ve fekálních vzorcích se aplikují monoklonální protilátky značené izothiokyanatanem fluoresceinu (Jíra 2009).

### **1.5.2 Molekulární diagnostika**

Základní koncept molekulární diagnostiky kryptosporidií je založen na určení druhu nebo genotypu kryptosporidie a následné subtypizaci. Pro identifikaci kryptosporidií je nejčastěji používána metoda nested PCR. Používají se rodově specifické primery amplifikující variabilní úsek genu kódujícího malou ribozomální podjednotku. Další využívané markery jsou například gen kódující protein stěny oocysty, gen kódující actin nebo gen kódující HSP70 (Kváč et al. 2013b).

Dalším často používaným nástrojem je metoda PCR-RFLP (Jíra 2009). Ta je ale používána spíše jen jako prostředek pro rychlou orientaci kvůli snížení nákladů za sekvenování. Například vhodně zvolenými kombinacemi restričních endonukleáz lze spolehlivě odlišit žaludeční a střevní druhy kryptosporidií (Kváč et al. 2013b).

Problémy při diagnostice se vyskytují při smíšené infekci. Mikroskopie a následná morfometrie oocyst nemusí být jasná, stejně tak molekulární metody nemusí přinést výsledek. Obecně platí, že je přednostně amplifikován ten druh nebo genotyp, který je ve vzorku více zastoupen, takže následná PCR ve většině případů prokáže přítomnost pouze jednoho z nich. Jako slibná alternativa se ukazuje real-time PCR

s následnou analýzou křivky teploty tání, nutné je však standardizovat křivky pro jednotlivé druhy a genotypy kryptosporidií (Kváč et al. 2013b).

Pro epidemiologické účely se používá analýza pohyblivosti heteroduplexů (HMA = heteroduplex mobility assay). Pomocí této metody lze analyzovat původ epidemie (Jíra 2009).

### **1.5.3 Přímé stanovení oocyst ve vodě**

Při sledování oocyst kryptosporidie ve vodě je možné použít několik přístupů. Patří mezi ně séroepidemiologické studie nebo využití organismů, které vychytávají oocysty z vody a kumulují je ve svých tělech (například mlži). Je možné ale použít i přímé stanovení. Používají se například metody USEPA, SOPs, ISO/DIS 15553. Koncentrace oocyst ve vodě bývá nízká, proto je nutné zpracovat velký objem vody (desítky až tisíce litrů) přes speciální filtry (Pumann et Šašek 2004). Pro průkaz oocyst ve vzorcích vody filtrací se nejlépe (záchytnost více než 70%) osvědčily membránové filtry z acetátu celulózy v kombinaci s mikroanalytickým skleněným systémem (Millipore) a imunofluorescenční mikroskopií. Alternativní metody představují průtoková cytometrie a kvantitativní elektrochemoluminiscence. (Jíra 2009).

Po filtraci speciálními filtry probíhá odstředění průtokovými centrifugami a flokulace. V zahuštěném vzorku bývá velké množství různých organismů a neživých částic, proto je nutné ho pročistit. Používá se imunomagnetická separace (IMS), gradientová centrifugace a flotace. Následuje detekce mikroskopicky či molekulárně biologickými metodami (Pumann et Šašek 2004).

### **1.5.4 Diagnostika mimostřevní kryptosporidiózy**

Kryptosporidiózu žlučových cest lze diagnostikovat několika způsoby. Nejlepší výchozí technikou je ultrasonografie. Dále je možné použít počítačovou tomografii. ERCP (endoskopická retrogradní cholangiopankreatografie) se ukázala jako nejcitlivější metoda, protože odhalí onemocnění, které nebylo prokázáno při ultrasonografii. Nedoporučuje se používat při podezření na asymptomatickou AIDS cholangiopatii. Nepříliš užitečná je metoda perkutánní jaterní biopsie. U plicní kryptosporidiózy jsou oocysty identifikovány ve vzorcích sputa (Vohra et al. 2012).

**Tabulka 2:** Tabulka s druhy diagnostiky podle Vohry et al. (2012).

<b>Mikroskopovací techniky</b>	<b>Koncentrační techniky</b>	Flotační metody:
		Sheaterův cukerný roztok
		síran zinečnatý
		nasycený solný roztok
		Sedimentační metody:
		formalín éther
	formalín ethyl-acetát	
	<b>Barvicí metody</b>	Hematoxylin a eosin barvení
		Romanowského barvení
		modifikované acidorezistentní barvení
		barvení safranin-methylenová modř
		negativní barvení
		DMSO modifikované acidorezistentní barvení
		fluorescenční barvení
auramin-rhodamin		
auramin-fenol		
auramin-karbofuchsin		
akridinová oranž		
<b>Sérologické techniky</b>	<b>Antigenové detekce</b>	ICT (imunochromatografie)
		EIA (enzymové imunotesty)
		RPHA (reverzní pasivní hemaglutinační techniky)
	<b>Detekce protilátkou</b>	
<b>Průtoková cytometrie</b>		
<b>Molekulární techniky</b>	<b>PCR</b>	Real-time PCR
		Multiplex PCR
		Nested PCR
	<b>FISH</b>	
	<b>LAMP</b>	

## 2 Experimentální část

### 2.1 Metodika

#### 2.1.1 Charakteristika sledovaného souboru

Sledování kryptosporidií proběhlo u pacientů Kliniky infekčních nemocí (=KIN) ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové za účelem zjištění promořenosti tímto patogenem. Stoolice byla odebírána v rozmezí měsíců leden až září roku 2015. Byly odebrány vzorky stolice od 42 pacientů. Z každého byly provedeny roztěry na 7 podložních sklíček.

#### 2.1.2 Odběr materiálu

Odběr materiálu byl prováděn zdravotními sestrami KIN do plastových kontejnerů a dopraveny na Ústav klinické mikrobiologie (=UKM). V parazitologické laboratoři byly uloženy maximálně 2 dny v lednici až do doby zpracování. Každému pacientovi bylo z důvodu zachování anonymity přiřazeno číslo a byl zaznamenán charakter stolice, pohlaví, věk a diagnóza pacienta. Vzorky byly ponechány zaschnutí v laminárním boxu.

#### 2.1.3 Barvení

Oocysty kryptosporidií byly detekovány pomocí specifického barvení anilin-karbol-methyl violetí s dobarvením tartrazinem podle Miláčka et Vítovce (1985).

#### Příprava roztoků:

<u>Roztok anilin-karbol-methylvioleti:</u>	0,6 g methyl violeti
	1 ml anilinu
	1 g fenolu
	30 ml 96% alkoholu
	destil. voda doplnit do 100 ml

Roztok tartrazinu: 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

Roztok kyseliny sírové: 2% kyselina sírová

### **Pracovní postup:**

1. Suchý roztěr stolice fixovat v methanolu 5 minut při pokojové teplotě.
2. Barvit roztokem anilin-karbol-methyl violeti po dobu 30 minut.
3. Opláchnout v tekoucí vodě.
4. Diferencovat v 1 – 2% kyselině sírové po dobu 0,5 – 2 minut, dokud nebude mít vzorek světle modrofialovou barvu.
5. Znovu opláchnout v tekoucí vodě.
6. Dobarvit tartrazinem po dobu 0,5 - 1 minuty.
7. Krátce opláchnout pod tekoucí vodou a nechat oschnout.
8. Roztěr prohlížíme pod mikroskopem s imerzním objektivem za použití imerzního oleje při zvětšení 1000x.

Oocysty se barví modře až modrofialově na žlutém až žlutozeleném pozadí.

#### **2.1.4 Mikroskopické vyšetření**

Diagnostika je založena na přímém mikroskopickém průkazu oocyst ve stolici po barvení podle Miláčka a Vítovce. Metoda je založena na principu specifického barvení oocyst v nátěru stolice a jejich odlišení od ostatních objektů. Oválné oocysty měří v průměru 5,5 x 4,5  $\mu\text{m}$ , podle druhu mohou být i menší či větší.

Po obarvení byly oocysty pozorovány pod mikroskopy značky Olympus CX31 (Olympus Japan; Praha) a Olympus BX41 (Olympus Japan; Praha) za použití imerzního objektivu a imerzního oleje při zvětšení 1000x. Oocysty byly jasně zbarvené a snadno odlišitelné. Usmrcené oocysty po obarvení zůstaly jako prázdná místa, tzv. „ghost cells“. Hodnocení četností pomocí křížků bylo čistě empirické ve stupnici 0 – 3.

## **2.2 Výsledky**

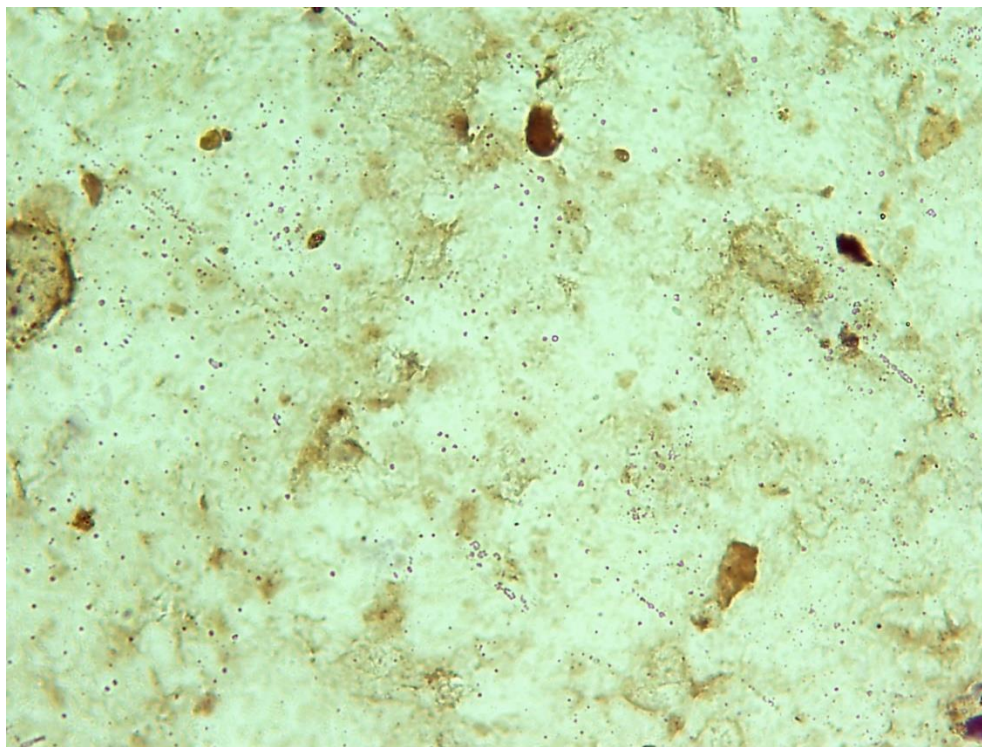
Věk pacientů se pohyboval v rozmezí od 1 roku do 34,5 let. 17 pacientů bylo mužského pohlaví a 25 bylo ženského pohlaví. Ze 42 pacientů jich bylo 9 pozitivních, tedy 21,43 % (viz tabulku 3).

**Tabulka 3:** Soupis všech dat.

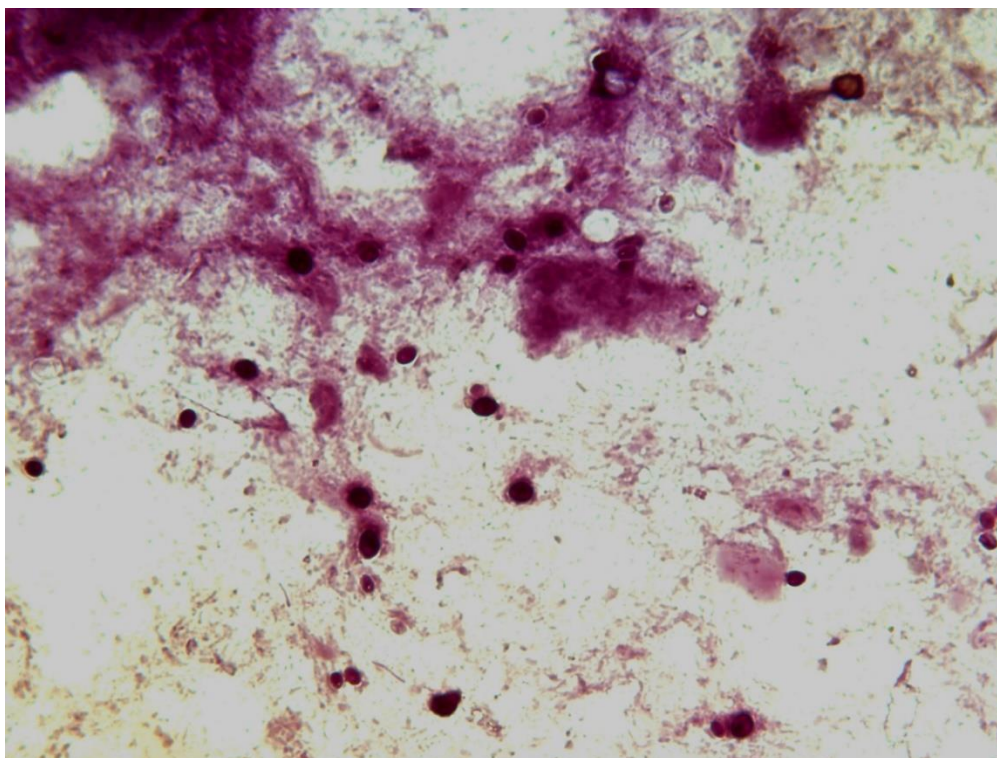
Číslo	Sex	Věk	Diagnóza	Miláček/četnost	Konzistence, barva stolice
1	M	3,5	A080	NEG	tuhá, hnědá
2	F	4,5	E86	NEG	tuhá, zelená s výpotkem
3	F	6	A099	NEG	tuhá, tmavá
4	F	5,5	E86	POZ/0,5 +	tuhá, světle hnědá
5	F	4	R509	NEG	tuhá, tmavá
6	F	6	A099	NEG	tuhá, tmavá
7	M	7	E86	NEG	tuhá, hnědá
8	F	3,5	E86	NEG	tuhá, hnědá
9	F	12	E86	POZ/0,5 +	tuhá, tmavá
10	F	24,5	E86	POZ/++	vodnatá, světlá
11	M	7	R509	POZ/+++	tuhá, světle hnědá
12	F	34,5	E86	NEG	tuhá, tmavá
13	F	4	E86	NEG	tuhá, tmavá
14	F	3	E86	NEG	tuhá, hnědá
15	M	5,5	E86	NEG	tuhá, tmavá
16	F	5,5	E86	NEG	tuhá, tmavá
17	F	1,5	E86	NEG	tuhá, tmavá
18	M	1,5	E86	NEG	tuhá, hnědozelená
19	M	4,5	E86	NEG	tuhá až mazlavá, světle hnědá
20	M	6	E86	NEG	tuhá, hnědá
21	M	9,5	A099	NEG	tuhá, tmavá
22	F	23	E86	NEG	tuhá, černá
23	M	4	E86	POZ/+	tuhá, tmavá
24	F	1	E86	POZ/0,5 +	tuhá, žlutá
25	F	6,5	E86	NEG	vodnatá, žlutá
26	F	14	A099	POZ/+	měkká až řidší, žlutohnědá
27	M	4	E86	NEG	vodnatá, okrová
28	F	8	E86	POZ/+	tuhá, hnědá
29	F	6	A692	NEG	tuhá, světle hnědá
30	M	4,5	E86	NEG	tuhá, cihlově červená
31	M	16,5	A090	NEG	vodnatá, zelenohnědá
32	M	8	E86	NEG	tuhá, tmavě hnědozelená
33	M	4	A692	NEG	měkká, žlutohnědá
34	F	1,5	E86	NEG	tuhá, s příměsí hnědých vláken, hlen
35	F	1,5	E86	NEG	tuhá, tmavě hnědá až černá
36	M	6	R42	NEG	tuhá, hnědá
37	F	3,5	A099	NEG	vodnatá, pískově žlutá
38	F	2	E86	NEG	tuhá, tmavě hnědá
39	F	12,5	E86	NEG	vodnatá, oranžová, světle hnědá, s hlenem
40	M	9	A099	NEG	vodnatá, černohnědá
41	F	7,5	E86	POZ/++	tuhá, hnědá
42	M	2,5	E86	NEG	vodnatá, pískově žlutá, s hnědými vlákny



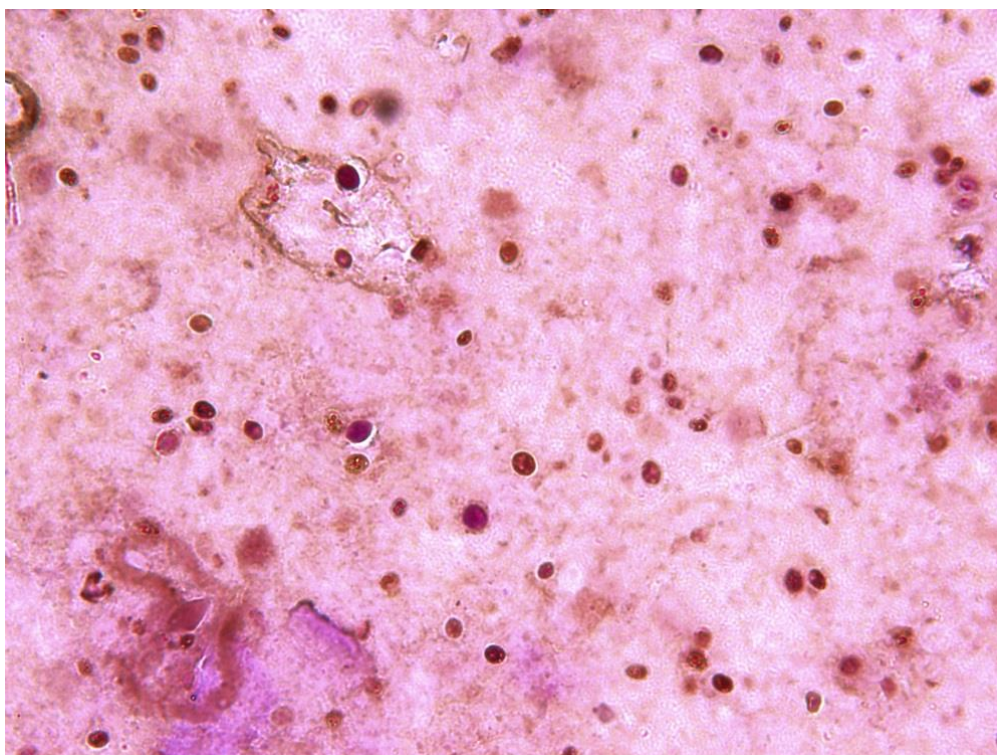
Ukázky empirického hodnocení četností 0 +, 0,5 +, +, ++ a +++ oocyst v preparátech od pacientů při zvětšení 1000x jsou předloženy na obrázcích 6, 7, 8, 9 a 10.



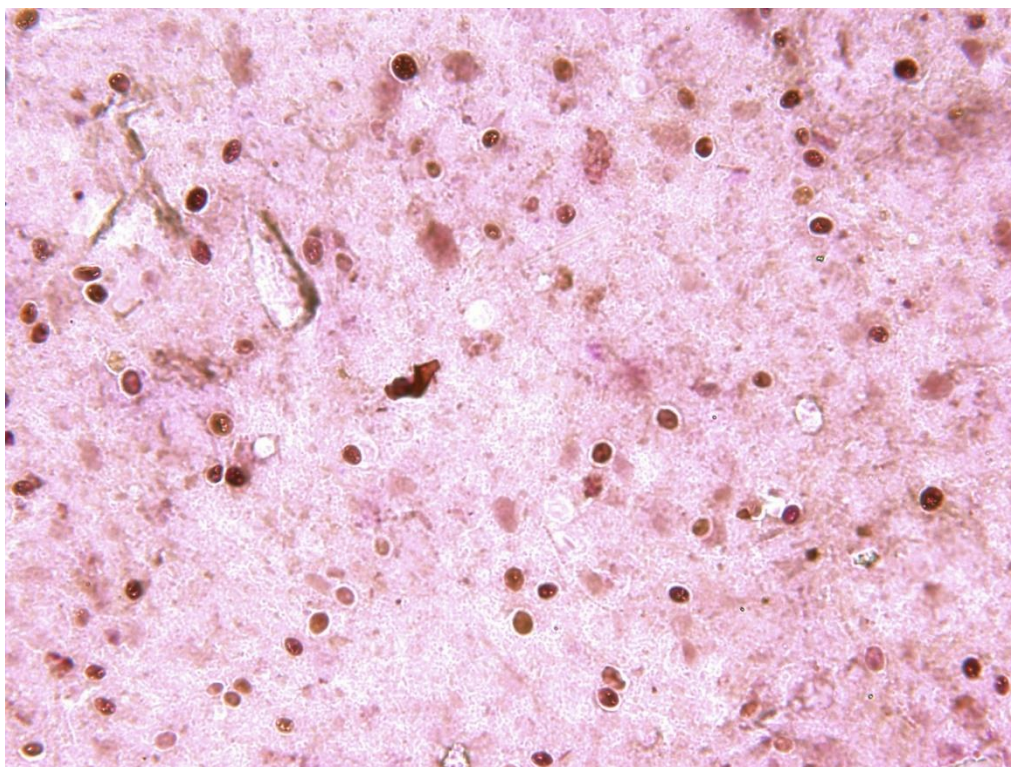
**Obrázek 6:** Negativní nález, četnost 0 +, vzorek č. 19, zvětšeno 1000x.



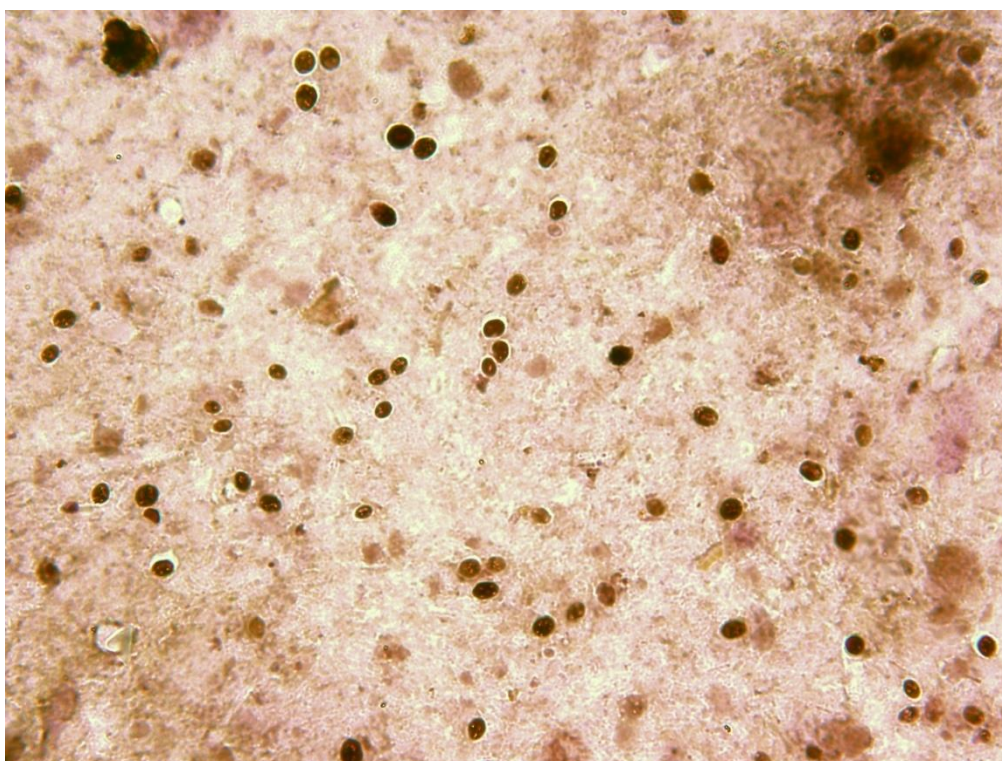
**Obrázek 7:** Pozitivní nález, četnost 0,5 +, vzorek č. 4, zvětšeno 1000x.



**Obrázek 8:** Pozitivní nález, četnost +, vzorek č. 26, zvětšeno 1000x.



**Obrázek 9:** Pozitivní nález, četnost ++ a „ghost cells“, vzorek č. 10, zvětšeno 1000x.

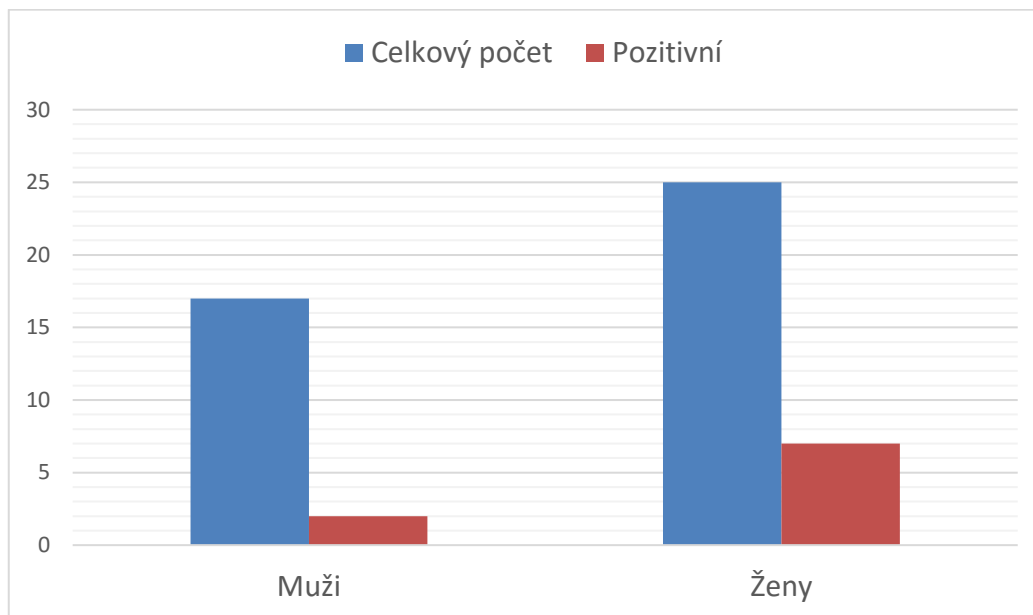


**Obrázek 10:** Pozitivní nález, četnost +++, vzorek č. 11, zvětšeno 1000x.

### 2.2.1 Pohlaví

V našem souboru bylo nakaženo celkem 9 pacientů. 2 ze 17 mužů (11,76 %) a 7 z 25 žen (28 %). Viz graf 1.

**Graf 1:** Počet mužů a žen s počtem pozitivních pacientů.



### 2.2.2 Věk

Pro statistické vyhodnocení byli pacienti podle věku (a ontogenetického vývoje) rozděleni do 6 kategorií podle Langmeiera et Krejčíkové (2000) a Švingalové (2002):

1. kojenecký a batolecí věk: 1 - 2,5 let
2. předškolní věk: 3 - 5,5 let
3. mladší školní věk: 6 - 11,5 let
4. starší školní věk: 12 - 14,5 let
5. dorost: 15 - 17,5 let
6. dospělost: 18 a více let.

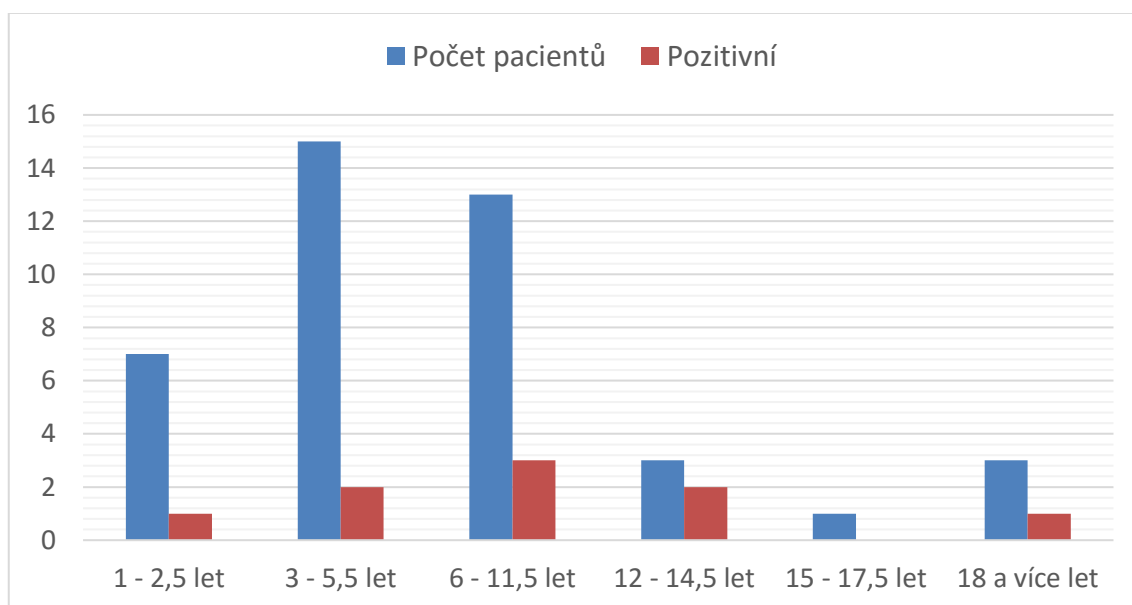
Počty pacientů v jednotlivých kategoriích s počtem zastoupení pozitivních pacientů jsou v tabulce 4 a v grafu 2.

**Tabulka 4:** Počet pacientů ve skupinách s počtem pozitivních pacientů.

Kategorie	Počet	Pozitivní	Procenta
1.	7	1	2,38 %
2.	15	2	4,76 %
3.	13	3	7,14 %
4.	3	2	4,76 %
5.	1	0	0 %
6.	3	1	2,38 %

Z tabulky 4 vyplývá, že v 1. skupině (7 pacientů) je promořenost 2,38 %, 2. skupina (15 pacientů) 4,76 %, 3. skupina (13 pacientů) 7,14 %, 4. skupina (3 pacienti) 4,76 %, 5. skupina (1 pacient) 0 %, 6. skupina (3 pacienti) 2,38 %.

**Graf 2:** Prevalence kryptosporidie ve věkových kategoriích sledovaného souboru.



### 2.2.3 Závislost četnosti oocyst na konzistenci stolice

Je patrné, že dle charakteru stolice nelze určit, zda je pacient pozitivní či negativní. Stolica je v 7 případech z 9 tuhá. Pouze v jednom případě měla měkkou až řidší konzistenci (pacient 26) a v jednom vodnatý charakter (pacient 10). Co se týká četnosti při řídké konzistenci, v případě pacienta 10 byla na dva křížky, v případě pacienta 26 byla četnost 1 křížek. Viz tabulku 5.

**Tabulka 5:** Pozitivní pacienti, četnost a konzistence stolice.

Číslo	Četnost	Konzistence řídká
4	0,5	ne
9	0,5	ne
10	2	ano
11	3	ne
23	1	ne
24	0,5	ne
26	1	ano
28	1	ne
41	2	ne

Hypotéza 1 (H0): Četnost oocyst ve stolici nezávisí na její konzistenci. Řídkou konzistenci stolice měli pouze dva pozitivní pacienti. Testovali jsme nulovou hypotézu nezávislosti v kontingenční tabulce vůči alternativě závislosti. Poté byl použit Fisherův přesný test. Nulová hypotéza nebyla zamítnuta,  $p=0,75$ . Lze tedy říci, že četnost parazita nemusí mít vliv na konzistenci stolice. Podrobná statistická analýza je v tabulce 6, výsledek je zvýrazněn žlutě. Zároveň jsou pro informaci v textu průměrné četnosti v obou skupinách (mean), tedy ve skupině řídká stolice (ano) a tuhá stolice (ne).

**Tabulka 6:** Statistická analýza hypotézy 1 (H0).

**Cross Tabulation Report**

Dataset O:\data stat\2016\wipler\stat.NCSS  
Row Variable cetnostkon  
Column Variable konzistence

**Counts Table**

<u>cetnostkon</u>	<u>konzistence</u>		Total
	ano	ne	
0.5	0	3	3
1	1	2	3
2	1	1	2
3	0	1	1
Total	2	7	9

The number of rows with at least one missing value is 33

**Column Percentages Table**

<u>cetnostkon</u>	<u>konzistence</u>		Total
	ano	ne	
0.5	0.00%	42.86%	33.33%
1	50.00%	28.57%	33.33%
2	50.00%	14.29%	22.22%
3	0.00%	14.29%	11.11%
Total	100.00%	100.00%	100.00%

The number of rows with at least one missing value is 33

**Chi-Square Contributions Table**

<u>cetnostkon</u>	<u>konzistence</u>		Total
	ano	ne	
0.5	0.6667	0.1905	0.8572
1	0.1667	0.0476	0.2143
2	0.6944	0.1984	0.8928
3	0.2222	0.0635	0.2857
Total	1.7500	0.5000	2.2500

The number of rows with at least one missing value is 33

### Cross Tabulation Report

Dataset O:\data stat\2016\wipler\stat.NCSS  
 Row Variable cetnostkon  
 Column Variable konzistence

#### Tests for Row-Column Independence (cetnostkon by konzistence)

H0: "cetnostkon" and "konzistence" are independent.  
 H1: "cetnostkon" and "konzistence" are associated (not independent).

Test	Type	Chi-Square Value	DF	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0.05?$
Pearson's Chi-Square†	2-Sided	2.2500	3	0.52217	No
Yates' Cont. Correction*					
Likelihood Ratio	2-Sided	2.9430	3	0.40049	No
Fisher's Exact*				<b>0.75000</b>	

† WARNING: At least one cell had an expected value less than 5.

\* Test computed only for 2x2 tables.

### Descriptive Statistics Report

Dataset O:\data stat\2016\wipler\stat.NCSS

#### Summary Section of cetnostkon when konzistence=ano

Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	Minimum	Maximum	Range
2	1.5	0.7071068	0.5	1	2	1

#### Quartile Section of cetnostkon when konzistence=ano

Parameter Value	10th Percentile	25th Percentile	50th Percentile	75th Percentile	90th Percentile
Value	1	1	1.5	2	2
95% LCL					
95% UCL					

#### Summary Section of cetnostkon when konzistence=ne

Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	Minimum	Maximum	Range
7	1.214286	0.9511898	0.3595159	0.5	3	2.5

#### Quartile Section of cetnostkon when konzistence=ne

Parameter Value	10th Percentile	25th Percentile	50th Percentile	75th Percentile	90th Percentile
Value	0.5	0.5	1	2	3
95% LCL			0.5		
95% UCL			3		

## 2.2.4 Diagnóza

V tabulce 7 jsou vysvětleny diagnózy všech pacientů.



**Tabulka 7:** Diagnózy všech pacientů.

Číslo	Diagnóza	Diagnóza slovy
1	A080	Rotavirová enteritida
2	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
3	A099	Gastroenteritida a kolitida nespécifikovaného původu
4	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
5	R509	Horečka NS
6	A099	Gastroenteritida a kolitida nespécifikovaného původu
7	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
8	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
9	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
10	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
11	R509	Horečka NS
12	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
13	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
14	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
15	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
16	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
17	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
18	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
19	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
20	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
21	A099	Gastroenteritida a kolitida nespécifikovaného původu
22	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
23	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
24	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
25	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
26	A099	Gastroenteritida a kolitida nespécifikovaného původu
27	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
28	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
29	A692	Lymeská nemoc
30	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
31	A090	Jiná a nespécifikovaná gastroenteritida a kolitida infekčního původu
32	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
33	A692	Lymeská nemoc
34	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
35	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
36	R42	Závrať - vertigo
37	A099	Gastroenteritida a kolitida nespécifikovaného původu
38	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
39	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
40	A099	Gastroenteritida a kolitida nespécifikovaného původu
41	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny
42	E86	Snížení objemu plazmy nebo extracelulární tekutiny

### 2.2.5 Závislost imunodeficitu a četnosti oocyst

Pozitivní pacienti s údaji o četnosti infekce a imunodeficitu jsou v tabulce 8. Významný imunodeficit je charakteristický pouze pro diagnózu E86.

**Tabulka 8:** Tabulka s údaji o četnosti infekce a imunodeficitu.

Číslo	Četnost	Imunodeficit
4	0,5	ano
9	0,5	ano
10	2	ano
11	3	ne
23	1	ano
24	0,5	ano
26	1	ne
28	1	ano
41	2	ano

Hypotéza 2 (H<sub>0</sub>): Oslabený imunitní systém méně omezuje množení parazita. Při výpočtu závislosti imunodeficitu a četnosti oocyst byl použit stejný postup jako při hypotéze 1. Nulová hypotéza nebyla zamítnuta,  $p=0,417$ . Lze tedy říct, že ve střevě pacientů s diagnózou provázející imunodeficit probíhá množení parazita s větší četností. Postup statistické analýzy je se zvýrazněným výsledkem v tabulce 9.

**Tabulka 9:** Statistická analýza hypotézy 2 (H0).

**Cross Tabulation Report**

Dataset O:\data stat\2016\wipler\stat.NCSS  
Row Variable cetnosti  
Column Variable Immunodeficit

**Counts Table**

<u>cetnosti</u>	<u>Imunodeficit</u>		Total
	ano	ne	
0.5	3	0	3
1	2	1	3
2	2	0	2
3	0	1	1
Total	7	2	9

The number of rows with at least one missing value is 33

**Column Percentages Table**

<u>cetnosti</u>	<u>Imunodeficit</u>		Total
	ano	ne	
0.5	42.86%	0.00%	33.33%
1	28.57%	50.00%	33.33%
2	28.57%	0.00%	22.22%
3	0.00%	50.00%	11.11%
Total	100.00%	100.00%	100.00%

The number of rows with at least one missing value is 33

**Chi-Square Contributions Table**

<u>cetnosti</u>	<u>Imunodeficit</u>		Total
	ano	ne	
0.5	0.1905	0.6667	0.8572
1	0.0476	0.1667	0.2143
2	0.1270	0.4444	0.5714
3	0.7778	2.7222	3.5000
Total	1.1429	4.0000	5.1429

The number of rows with at least one missing value is 33

### Cross Tabulation Report

Dataset O:\data stat\2016\wipler\stat.NCSS  
 Row Variable cetnosti  
 Column Variable Imunodeficit

#### Tests for Row-Column Independence (cetnosti by Imunodeficit)

H0: "cetnosti" and "Imunodeficit" are independent.  
 H1: "cetnosti" and "Imunodeficit" are associated (not independent).

Test	Type	Chi-Square Value	DF	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0.05?$
Pearson's Chi-Square†	2-Sided	5.1429	3	0.16163	No
Yates' Cont. Correction*					
Likelihood Ratio	2-Sided	5.7156	3	0.12630	No
Fisher's Exact*				0.41667	

† WARNING: At least one cell had an expected value less than 5.  
 \* Test computed only for 2×2 tables.

### Descriptive Statistics Report

Dataset O:\data stat\2016\wipler\stat.NCSS

#### Summary Section of cetnosti when Imunodeficit=ano

Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	Minimum	Maximum	Range
7	1.071429	0.6725927	0.2542161	0.5	2	1.5

#### Quartile Section of cetnosti when Imunodeficit=ano

Parameter Value	10th Percentile	25th Percentile	50th Percentile	75th Percentile	90th Percentile
Value	0.5	0.5	1	2	2
95% LCL			0.5		
95% UCL			2		

#### Summary Section of cetnosti when Imunodeficit=ne

Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	Minimum	Maximum	Range
2	2	1.414214	1	1	3	2

#### Quartile Section of cetnosti when Imunodeficit=ne

Parameter Value	10th Percentile	25th Percentile	50th Percentile	75th Percentile	90th Percentile
Value	1	1	2	3	3
95% LCL					
95% UCL					

## 2.2.6 Závislost imunodeficitu a pozitivity

V tabulce 10 jsou podle diagnózy informace o imunodeficitu pacientů.

**Tabulka 10:** Údaje o imunodeficitu a pozitivitě pacientů.

Číslo	Imunodeficit	Pozitivita	Číslo	Imunodeficit	Pozitivita
1	ne	NE	22	ano	NE
2	ano	NE	23	ano	ANO
3	ne	NE	24	ano	ANO
4	ano	ANO	25	ano	NE
5	ne	NE	26	ne	ANO
6	ne	NE	27	ano	NE
7	ano	NE	28	ano	ANO
8	ano	NE	29	ne	NE
9	ano	ANO	30	ano	NE
10	ano	ANO	31	ne	NE
11	ne	ANO	32	ano	NE
12	ano	NE	33	ne	NE
13	ano	NE	34	ano	NE
14	ano	NE	35	ne	NE
15	ano	NE	36	ne	NE
16	ano	NE	37	ne	NE
17	ano	NE	38	ano	NE
18	ano	NE	39	ano	NE
19	ano	NE	40	ne	NE
20	ano	NE	41	ano	ANO
21	ne	NE	42	ano	NE

Hypotéza 3 (H0): Pacienti s oslabenou imunitou jsou náchylnější ke kryptosporidiové infekci. V tomto případě jsme použili testování hypotézy nezávislosti v kontingenční tabulce. Nulová hypotéza nebyla zamítnuta,  $p=0,692$ . Lze tedy říct, že imunodeficit má pozitivní vliv na vnímavost hostitelské buňky. Pacienti s diagnózou E86 by zřejmě mohli být rizikovou skupinou pro tuto infekci. Postup statistické analýzy je se zvýrazněným výsledkem v tabulce 11.

**Tabulka 11:** Statistická analýza hypotézy 3 (H0).

**Cross Tabulation Report**

Dataset O:\data stat\2016\wipler\stat.NCSS  
 Row Variable Pozitivita  
 Column Variable imunodef

**Counts Table**

<u>Pozitivita</u>	<u>imunodef</u>		Total
	ano	ne	
ANO	7	2	9
NE	21	12	33
Total	28	14	42

**Column Percentages Table**

<u>Pozitivita</u>	<u>imunodef</u>		Total
	ano	ne	
ANO	25.00%	14.29%	21.43%
NE	75.00%	85.71%	78.57%
Total	100.00%	100.00%	100.00%

**Chi-Square Contributions Table**

<u>Pozitivita</u>	<u>imunodef</u>		Total
	ano	ne	
ANO	0.1667	0.3333	0.5000
NE	0.0455	0.0909	0.1364
Total	0.2122	0.4242	0.6364

**Tests for Row-Column Independence  
 (Pozitivita by imunodef)**

H0: "Pozitivita" and "imunodef" are independent.  
 H1: "Pozitivita" and "imunodef" are associated (not independent).

Test	Type	Chi-Square Value	DF	Prob Level	Reject H0 at $\alpha = 0.05$ ?
Pearson's Chi-Square†	2-Sided	0.6364	1	0.42503	No
Yates' Cont. Correction	2-Sided	0.1591	1	0.68999	No
Likelihood Ratio	2-Sided	0.6707	1	0.41281	No
Fisher's Exact	2-Sided			<b>0.69245</b>	No
Fisher's Exact (Lower)	1-Sided			0.88692	No
Fisher's Exact (Upper)	1-Sided			0.35472	No

† WARNING: At least one cell had an expected value less than 5.

### 3 Diskuze

Americké záznamy z let 2009 - 2010 zaznamenávají, že kryptosporidióza se vyskytuje po celé USA. Za rok 2009 s četností 2,3 na 100 tisíc obyvatel a za rok 2010 2,9 na 100 tisíc obyvatel. Je tedy zaznamenán mírný vzestup. Časněji se projevují příznaky u dětí mezi 5 - 9 lety věku než u dospělých mezi 25 - 34 lety. To je dáno méně vyvinutou obranyschopností dětského organismu (Yoder et al. 2012).

Naše studie ukazuje vyšší hodnoty z několika důvodů. Jednak jsme hodnotili přítomnost oocyst kryptosporidií ve stolici, ne již propuknuté onemocnění. Hodnota morbidity je vždy nižší než hodnota prevalence. Při vyhodnocení našich výsledků musíme brát v potaz malý soubor testovaných pacientů a navíc se nejednalo o náhodně vybranou skupinu, nýbrž o suspektní pacienty KIN. I v našem případě bylo nejvíce případů zaznamenáno u dětí. V tom se výsledky studií shodují.

V pakistánské studii byl testován vybraný soubor 105 pacientů s akutním průjmem. Pacienti byli hospitalizováni na Klinice gastroenterologie. 53 pacientů byli muži. Vybraní pacienti buď již dříve prodělali kryptosporidiózu nebo jsou silně imunodeficientní např. díky HIV infekci, hematologické malignitě, po transplantaci orgánu nebo prodělávají steroidovou či jinou imunosupresivní terapii. Od všech byly získány vzorky stolice a barveny modifikovanou metodou barvení dle Ziehl-Nielsona. Oocysty kryptosporidií byly přítomné u 58 testovaných pacientů. Z toho u 31 (53,4 %) mužů a 27 (46,6 %) žen. Pozitivní pacienti byli rozděleni na věkové kategorie a procentuálně vyhodnoceni, viz tabulku 12.

**Tabulka 12:** Procentuální zastoupení věkových kategorií u pozitivních pacientů pakistánské studie.

Věk (roky)	Počet	Procenta
< 20	5	8,6
21 - 30	20	34,5
31 - 40	23	39,7
41 - 50	7	12,1
> 50	3	5,2

Vodnatou konzistenci stolice mělo z pozitivních pacientů 50 (86,2%) a z negativních jen 9 (19,1 %) (Ali et al. 2014).

Náš testovaný soubor pacientů obsahoval 42 pacientů KIN ve věku od 1 roku do 34,5 let, z toho 17 (40,5 %) mužů a 25 (59,5 %) žen. 2 muži (11,7 %) byli pozitivní. Z 25 žen bylo pozitivních 7 (28 %). Údaje o prevalenci kryptosporidii u jednotlivých pohlaví jsou zmíněny spíše jako doplňující informace, nelze z nich vyvodit směrodatné závěry (z důvodu malého souboru dat). Domníváme se však, že pohlaví na promořenost nemá žádný vliv. Zajímavé by však bylo zjistit rizikové chování související s hygienickými návyky pacientů. Experiment zaměřený na zhodnocení prevalence podle věku byli pacienti rozděleni do 6 kategorií na základě ontogenetických fází vývoje člověka, abychom mohli ověřit, zda je promořenost největší u dětí (viz tabulku 13).

**Tabulka 13:** Procentuální zastoupení věkových kategorií u pozitivních pacientů naší studie.

Věk (roky)	Počet	Procenta
1 - 2,5	1	14,3
3 - 5,5	2	13,3
6 - 11,5	3	23,1
12 - 14,5	2	66,7
15 - 17,5	0	0
> 18	1	33,3

Z tabulky 13 jasně vyplývá, že promořenost je skutečně největší u dětí. V pakistánské studii byli hodnoceni starší pacienti s imunodeficitem, kdežto v naší studii imunitní nedostatečností trpělo jen 29 (69,1 %) pacientů a jen 7 z nich (24,1 %) bylo pozitivních na přítomnost oocyst kryptosporidií ve stolici. Zajímavé je, že 7 z 9 pozitivních bylo imunodeficientních, což jasně naznačuje souvislost s přítomností parazita a imunodeficitu. V testovaném souboru se nacházeli pacienti především dětského věku a údaj tak nelze považovat za směrodatný. Domníváme se, že prevalence u dětí je zvýšená pro nedostatečné hygienické návyky v kombinaci s teprve vyvíjejícím se imunitním systémem. Měli bychom brát v potaz, že nejčastějším zdrojem nákazy je vodní zdroj kontaminovaný fekáliemi nakaženého



organismu, a proto se mohou kryptosporidie v dětském kolektivu rozšířit díky společnému koupání.

Zajímalo nás, jestli lze podle konzistence stolice určit, zda je pacient pozitivní či negativní. Vzhledem k tomu, že byla stolice v 7 případech z 9 tuhá a pouze ve 2 případech měla řidší či vodnatý charakter, pozitivitu podle charakteru stolice určit nelze. Stanovili jsme tedy tuto hypotézu: Četnost oocyst ve stolici nezávisí na její konzistenci. Správnou metodou by bylo porovnání četnosti mezi skupinou s tuhou stolicí a skupinou s řídkou stolicí. To bohužel udělat nebylo možné, protože ve skupině s řídkou stolicí byly pouze 2 subjekty. Byl tedy použit Fisherův přesný test: Nulová hypotéza nebyla zamítnuta. Mohlo by to tedy znamenat i to, že ani četnost oocyst ve stolici nemá vliv na její konzistenci. Přestože výsledky pakistánské studie souvislost mezi konzistencí stolice a přítomností kryptosporidií ve stolici prokázali, nelze nijak tuto hypotézu testovat, neboť vybraní pacienti byli silně imunodeficientní a na průjmu se mohlo podílet i více patogenů. Avšak i terapie antibiotika, jimiž byli pacienti z Pákistánu léčeni, mohla způsobit diarrheu.

Další analýza proběhla u závislosti imunodeficitu a četnosti oocyst. Hypotéza byla stanovena takto: Oslabený imunitní systém méně omezuje množení parazita. Při výpočtu byl použit stejný postup jako při hypotéze 1. Nulová hypotéza nebyla zamítnuta. Podle statistické analýzy je závěr takový, že ve střevě pacientů s diagnózou provázející imunodeficit probíhá množení parazita s větší četností.

Třetí statistická analýza proběhla při stanovení závislosti imunodeficitu a positivity. Naše hypotéza zněla: Pacienti s oslabenou imunitou jsou náchylnější ke kryptosporidiové infekci. Jako testovací metodu jsme použili testování hypotézy nezávislosti v kontingenční tabulce. Můžeme tedy říct, že imunodeficit má pozitivní vliv na vnímavost hostitelské buňky.

Celková promořenost nám vyšla poměrně vysoká (21,43 %). Přestože se jednalo o pacienty KIN, tak k této vysoké hodnotě přispěl fakt, že v podmínkách ČR se běžně nedagnostikuje výskyt kryptosporidií ve stolici a není tedy známá průměrná hodnota promořenosti tímto patogenem v populaci. Proto se může zdát být tato hodnota vysoká. Proč je nedostatek údajů o promořenosti V ČR: při normální tuhé stolici nemusí být podezření na kryptosporidiovou infekci a není provedena

diagnostika. Jak jsme však zjistili, konzistence stolice nemusí s infekcí souviset, přestože se průjem uvádí jako jeden z hlavních projevů. Stolice bývá poslána na parazitologické vyšetření někdy i po několika týdnech, během nichž může být kryptosporidióza vyléčena symptomatickou léčbou a nastolením vhodných hygienických podmínek. Nejprve totiž podle klinického obrazu probíhají bakteriologická a virologická vyšetření. Často se stává, že do laboratoře k parazitologickému vyšetření se materiál dostává až tehdy, když se v ostatních typech vyšetření nenajde žádný jiný původce. Běžně se tedy na vyšetření stolice na přítomnost oocyst kryptosporidií nedostane. To je také jedním z důvodů, proč je v ČR málo záchytů tohoto parazita. Důležitá je včasnost požadovaného parazitologického vyšetření, nejlépe hned na začátku hospitalizace pacienta. Na konci patentní periody vývoje kryptosporidie je intenzita vylučování oocyst ve stolici nízká. To je další zdůvodnění, proč nám vyšla promořenost tak vysoká. K odběru materiálu docházelo brzo po hospitalizaci pacienta.

Už ze starších publikací (Talaro et Talaro 1993, Chroust et al. 1998) víme, že největší prevalence kryptosporidií je v zemích třetího světa, především z důvodu neadekvátní hygieny. Další důvody již byly zmíněny v teoretické části. Výskyt oocyst ve stolici u lidí se pohybuje kolem 4 % u dětí a 1 – 2 % u dospělých, přičemž v různých zeměpisných šířkách může dosáhnout prevalence 6 – 27 %. To koresponduje i s našimi výsledky. I nám vyšla promořenost vyšší u dětí, avšak ve větším měřítku. Důvody proč tomu tak je, již byly zmíněny.

Studie provedená v Nigerii (Molloy et al. 2011) zjistila, že prevalence u dětí je 19,4 %. Tento údaj také koresponduje s našimi výsledky. Abdel-Messih et al. (2005) v Egyptě zjistili, že prevalence u dětí s průjmem je 17 %. U dětí do jednoho roku věku byla 2,4x větší pravděpodobnost, že jsou infikované oproti starším dětem. Děti ve věku 1 – 2 let měly 1,9x větší pravděpodobnost infekce než starší děti. Dále studie ukázala, že kojení má význam v ochraně proti onemocnění. V naší studii byla promořenost naopak vyšší u starších dětí. Řekla bych, že v našich podmínkách je to z důvodu trendu kojení dětí co nejdéle dobu a také jsou v ČR zajištěny lepší hygienické podmínky a přístup na většině území k velmi kvalitní pitné vodě. Zejména o mladší děti je také dobře postaráno, dbá se na jejich hygienu. Promořenost se zvyšuje až s navštěvováním předškolních a školních zařízení.

Pokud by byla provedena studie ve větším měřítku i na našem území a nejen u pacientů KIN, možná by se zjistilo, že promořenost kryptosporidii je daleko vyšší, než jak se dosud myslelo. Za zmínku stojí starší studie (Katsumata et al. 1998) provedená v Indonésii, kde byli vyšetřeni pacienti s akutním průjmovým onemocněním, u nichž byla promořenost oocystami 2,8 %, ale u kontrolní skupiny byla kryptosporidióza také, v 1,4 % případech. Tato práce potvrzuje, že by bylo vhodné otestovat nejen suspektní pacienty, ale i širší veřejnost. Další práce, která potvrzuje asymptomatickou kryptosporidiózu, proběhla v Bangladéši. Kirkpatrick et al. (2008) po dobu tří let sledovali 226 dětí ve věku od 2 do 5 let. U 42,5 % byla diagnostikována kryptosporidiová infekce. 22,6 % dětí mělo asymptomatickou infekci, 25,7 % mělo symptomatickou kryptosporidiózu, z nichž 29,3 % mělo recidivující onemocnění.

## Závěr

Hlavním cílem práce bylo stanovit promořenost kryptosporidii a zjistit, jaké faktory ovlivňují kryptosporidiovou infekci a jaká je její prevalence u pacientů hospitalizovaných v roce 2015 na Klinice infekčních nemocí ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, především těch dětských. Dále jsme stanovovali, zda četnost oocyst ve stolici nezávisí na její konzistenci, zda pacienti s oslabenou imunitou jsou náchylnější ke kryptosporidiové infekci a zda oslabený imunitní systém omezuje množení parazita.

Byl úspěšně obarven klinický materiál 42 pacientů po 7 vzorcích. Zjistili jsme, že 9 pacientů je pozitivních, tedy prevalence našeho souboru je 21,43 %. V souboru bylo 17 mužů a 25 žen. Nakaženo kryptosporidii bylo 7 žen a pouze 2 muži, prevalence u žen nám tedy vyšla 28 % a u mužů 11,76 %. Tento výsledek je ale spíše informativní kvůli malému souboru dat a poskytuje námět pro další možnou studii na toto téma.

Zjistili jsme, že promořenost u dětí do 12 let věku je největší. Opět toto zjištění je pouze informační, protože v našem souboru se nacházely především děti. Tyto výsledky by ale mohly také poskytnout základ pro další studie prevalence dětských pacientů.

Dále jsme zjistili, že z charakteru stolice nelze určit, zda je pacient pozitivní nebo negativní. Statistickými metodami jsme hodnotili závislost četnosti oocyst na konzistenci stolice. Došli jsme k závěru, že četnost oocyst ve stolici nemá vliv na její konzistenci.

Další stanovovanou závislostí byla závislost imunodeficitu a četnosti oocyst. Výsledkem bylo zjištění, že ve střevě pacientů s diagnózou provázející imunodeficit probíhá množení parazita s větší četností. Poslední zjišťovanou závislostí byla závislost imunodeficitu a positivity. Podle naší hypotézy jsou pacienti s oslabenou imunitou náchylnější ke kryptosporidiové infekci. Hypotéza nezávislosti nebyla zamítnuta. Imunodeficientní pacienti s diagnózou E 86 tedy mohou představovat rizikovou skupinu.

Závěrem je nutné říci, že jsme si vědomi toho, že byl otestován pouze malý soubor pacientů na to, aby byly výsledky směrodatné. Naše práce by se ale mohla stát výchozí pro další studie tématu prevalence kryptosporidii. Rovněž jsme ukázali, že diagnostika kryptosporidií nemusí být záležitostí pouze specializovaných laboratoří, ale je možné ji provádět i v běžných laboratorních podmínkách vhodnými barvicími metodami. Přestože dosud není vyvinuta efektivní léčba, tak díky včasnému rozpoznání kryptosporidiové infekce může být nasazena vhodná symptomatická a podpůrná léčba.

## Seznam použité literatury

1. Abdel-Messih I. A., Wierzba T. F., Abu-Elyazeed R., Ibrahim A. F., Ahmed S. F., Kamal K., Sanders J., Frenck R., (2005). Diarrhea associated with *Cryptosporidium parvum* among young children of the Nile River Delta in Egypt. *J. Trop. Pediatr.* 51: 154-159.
2. Ali S., Mumar S., Kalam K., Raja K., Baqi S. (2014). Prevalence, clinical presentation and Treatment outcome of Cryptosporidiosis in immunocompetent adult patients presenting with acute diarrhoea. *J. Pak. Med. Assoc.* 64(6): 613-8.
3. Anane S. (2011). Cryptosporidiosis – From Epidemiology to Treatment. *In: Microbes, Viruses and Parasites in AIDS Process.* Zajac V. (Ed.). InTech, Croatia. 402 p. ISBN: 978-953-307-601-0.
4. Atlas R. M. (1995). *Microorganisms in our World.* Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri. 765 p. ISBN 9780801678042.
5. Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. et al. (1996). *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, Virologie, Parazitologie.* Triton, Praha. 560 s. ISBN 859-4-315-0528-0.
6. Cacciò S. M., Pozio E., Guirano A., Albano F. (2009). Long-term consequences of *Cryptosporidium* infections in immunocompetent and immunodeficient individuals. *In: Sequealae and long-term consequences of incetious diseases.* Frantamico P. M., Smith J. L., Brogden K. A. (eds.). ASM Press, Washington, DC. P. 245-257.
7. Cacciò S. M., Putignani L. (2014). Epidemiology of Human Cryptosporidiosis. *In: Cryptosporidium: parasite and disease.* Cacciò S. M., Widmer G. (Eds.). Springer-Verlag, Vienna. 564 p. ISBN 978-3-7091-1561-9.
8. Cama V. A., Bern C., Roberts J., Cabrera L., Sterling Ch. R., Ortega Y., Gilman R. H., Xiao L. (2008). *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1567-1574.

9. Carey R. B., Schuster M. G., McGowan K. L. (2011). Lékařská mikrobiologie v klinických případech. Triton, Praha. 322 s. ISBN 978-80-7387-480-3.
10. Current W. L. (1988). The biology of *Cryptosporidium*. Am. Soc. Microbiol. News. 54: 605-611.
11. Current W. L., Upton S. J., Haynes T. B. (1986). The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiiadae) infecting chickens. J. Protozool. 33: 289-296.
12. Chroust K., Lukešová D., Modrý D., Svobodová V. (1998). Veterinární protozoologie. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno. 113 s. ISBN 80-85114-27-5.
13. 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.
14. Ditrich O. (2010). Jednobuněční paraziti v pitných vodách a metody jejich detekce. Sborník konference Pitná voda, České Budějovice. S. 65-70. ISBN 978-80-254-6854-8.
15. Ditrich O., Kváč M., Květoňová D. (2005). Kryptosporidióza: rizika pro imunokompetentní a imunodeficitní jedince. Seminář oportunní a opomíjené protozoární střevní nákazy. S. 21-26.
16. Ditrich O., Kváč M., Květoňová D., Sak B., Brůčková P., Kociánová J., Ryvolová K., Rousková L. (2010). Role vodních bezobratlých při odstraňování oocyst kryptosporidie z vody. Sborník konference Pitná voda, České Budějovice. S. 71-74. ISBN 978-80-254-6854-8.
17. Ditrich O., Ryvolová K., Květoňová D., Kváč M. (2004). Kryptosporidie ve vodách a význam mlžů jako indikátoru jejich výskytu. Sborník abstraktů, České a Slovenské parazitologické dny, Ostravice. S. 9.
18. Dobiáš L., Dobiášová S., Seman M. (2003). Obecná a speciální mikrobiologie. Multext Soft, Ostrava. 218 s.

19. Elwin K., Hadfield S., Robinson G., Crouch N., Chalmers R. (2012). *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007 – 2011. *Int. J. Parasitol.* 42: 675-182.
20. Fayer R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124: 90-97.
21. Fayer R., Morgan U., Upton S. J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30: 1305-1322.
22. Fayer R., Santín M., Macarasin D. (2010). *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172: 23-32.
23. Fayer R., Santín M., Xiao L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91: 624-629.
24. 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.
25. Fayer R., Trout J. M., Xiao L., Morgan U. M., Lai A. A., Dubey J. P. (2001). *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87: 1415-1422.
26. Forbes A., Blanshard C., Gazzard B. (1993). Natural history of AIDS related sclerosing cholangitis: a study of 20 cases. *Gut.* 43: 116-121.
27. Greenwood D., Slack R. C. B., Peutherer J. F. et al. (1999). *Lékařská mikrobiologie: Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie.* Avicentrum, Grada, Praha. 686 s. ISBN 80-7169-365-0.
28. Goering R. V., Dockrell H. M., Zuckerman M., Wakelin D., Roitt I. M., Mims C., Chiodini P. L. (2009). *Mims' Medical Microbiology.* Mosby Ltd., St. Louis, Missouri. 668 p. ISBN 978-0-323-04475-2.



29. Guk S. M., Yong T. S., Park S. J., Park J. H., Chai J. Y. (2004). Genotype and animal infectivity of human isolate of *Cryptosporidium parvum* in the Republic of Korea. Korean J. Parasitol. 42: 85-89.
30. Hasajová A., Valenčáková A., Malčeková B., Danišová O., Halán M., Goldová M., Sak B., Květoňová D., Kváč M., Halánová M. (2014). Significantly higher occurrence of *Cryptosporidium* infection in Roma children compared with non-Roma children in Slovakia. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 33: 1401-1406.
31. Hayward A. R., Levy J., Facchetti F., Notarangelo L., Ochs H. D., Etzioni A., Bonnefoy J. Y., Cosyns M., Weinberg A. (1997). Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver and biliary tree in boys with hyper IgM. J. Immunol. 158: 977-983.
32. Hubálek Z. (2000). Mikrobiální zoonózy a sapronózy. Masarykova univerzita, Brno. 153 s. ISBN 80-210-2446-1.
33. Iribarren J. A., Castiella A., Lobo C., Lopez P., Wichmann M. A. von, Arrizabalaga J. F., Rodriguez-Arondo J., Alzate L. F. (1997). AIDS associated cryptosporidiosis with antral narrowing. A new case. J. Clin. Gastroenterol. 25(4): 693-694.
34. Jagai J. S., Castronovo D. A., Monchak J., Naumova E. N. (2009). Seasonality of cryptosporidiosis: A meta-analysis approach. Environ. Res. 109(4): 465-478.
35. Jawetz E., Melnick J. L., Adelberg E. A. (1989). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. Appleton & Lange, East Norwalk. 732 p. Connecticut. ISBN 0-8385-6309-0.
36. Jex A. R., Smith H. V., Nolan M. J., Campbell B. E., Young N. D., Cantacessi C., Gasser R. B. (2011). Cryptic parasite revealed improved prospects for treatment and control of human cryptosporidiosis through advanced technologies. Adv. Parasitol. 77: 141-173.
37. Jílek P., Buchta V., Kubanová P., Förstl M. (2002). Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví. Karolinum, Praha.

38. Jíra J. (2009). Lékařská protozoologie. Galén, Praha. 567 s. ISBN 978-80-7262-381-5. 104 s. ISBN 80-246-0459-0.
39. Katsuma T., Hosea D., Wasito E. B., Kohno S., Hara K., Soeparto P., Rahun I. G. (1998). Cryptosporidiosis in Indonesia: a hospital-based study and a community-based survey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 628-632.
40. Kirkpatrick B. D., Haque R., Duggal P., Mondal D., Larsson C., Peterson K., Akter J., Lockhart L., Khan S., Petri W. A. Jr. (2008). Association between *Cryptosporidium* infection and human leukocyte antigen class I and class II alleles. *J. Infect. Dis.* 197(3): 474-478.
41. Kožíšek F. (2005). Metodické doporučení SZÚ – Národního referenčního centra pro pitnou vodu k opatřením bránící výskytu parazitických prvoků v pitné vodě. Praha. 10 s.
42. Kváč M., Květoňová D., Ditrich O. (2005). Kryptosporidie a životní prostředí. Seminář oportunní a opomíjené protozoární střevní nákazy. S. 27-30.
43. 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.* 191: 218-227.
44. Kváč M., Sak B., Květoňová D. (2013b). Molekulární diagnostika kryptosporidií, mikrosporidií a giardií. Seminář Molekulární diagnostika v parazitologii. S. 14-20.
45. Květoňová D., Kváč M., Sak B., Ditrich O., Kehoe S., Vítovec J. (2004). Synergický účinek UV záření a tepla na životaschopnost a infektivitu oocyst *Cryptosporidium parvum*. Seminář Problematika prvoků rodu *Cryptosporidium* a *Giardia* ve vodě, Státní zdravotní ústav v Praze.
46. Langmeier J., Krejčíková D. (2000). Vývojová psychologie. Grada, Praha. 343 s. ISBN 80-7169-195-X.

47. Lindsay D. S., Upton S. J., Owens D. S., Morgan U. M., Mead J. R., Blagburn B. L. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. J. Eukaryot. Microbiol. 47: 91-95.
48. McLauchlin J., Amar C., Pedraza-Díaz S., Nichols G. L. (2000). Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. J. Clin. Microbiol. 35(11): 3984-3990.
49. Meisel J. L., Perera D. R., Meligro C., Rubin C. E. (1976). Overwhelming watery diarrhoea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroenterology. 70: 1156-1160.
50. 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 Parasitologica. 32: 50.
51. Moon A., Spivak W., Brandt L. J. (1999). *Cryptosporidium*-induced gastric obstruction in a child with congenital HIV infection: case report and review of the literature. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 28(1): 108-111.
52. Molloy S. F., Tanner C. J., Kirwan P., Asaolu S. O., Smith H. V., Nichols R. A., Connelly L., Holland C. V. (2011). Sporadic *Cryptosporidium* infection in Nigerian children: a risk factors with species identification. Epidemiol. Infect. 139(6): 946-954.
53. Mølbak K., Andersen M., Aaby P., Højlyng N., Jakobsen M., Sodemann M., da Silva A. (1997). *Cryptosporidium* infection in infancy as a cause of malnutrition: a community study from Guinea-Bissau, west Africa. Am. J. Clin. Nutr. 65: 149-152.
54. Monge R., Arias M. L. (1996). Presence of various pathogenic microorganisms in fresh vegetables in Costa Rica. Arch. Latinoam. Nutr. 46: 292-294.
55. Nemes Z. (2009). Diarrhea from infectologist's point of view. Orv. Hetil. 150(8): 353-361.
56. Nester E. W. (1998). Microbiology: A Human Perspective. McGraw-Hill, Boston. 848 p. ISBN 0-697-28602-9.

57. Nime F. A., Burek J. D., Page D. L., Holscher M. A., Yardley J. H. (1976). Acute enterokolitis in a human being infected with protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 70: 592-598.
58. O'Donoghue P. J. (1995). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis on man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25: 139-195.
59. Oberhuber G., Lauer E., Stolte M., Borchard F. (1991). Cryptosporidiosis of the appendix vermiformis: a case report. *Z. Gastroenterol.* 29: 606-608.
60. Panciera R. J., Thomassen R. W., Garner F. M. (1971). Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 479-7484.
61. Pavlásek I. (1995). Kryptosporidie u savců. *Veterinářství*. 6: 265-271.
62. Power M. L., Ryan U. M. (2008.) A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J. Parasitol.* 94: 1114-1117.
63. Přecechtěl F., Bobulová D., Buček R., Burgetová D., Obdržálek V., Velgendová J., Votava M. (1990). *Lékařská mikrobiologie*. Masarykova Univerzita, Brno. 330 s. ISBN 80-210-0143-7.
64. Pumann P., Šašek J. (2004). Přístupy ke sedování parazitických prvoků ve vodách (s důrazem na *Cryptosporidium*). Seminář Problematika prvoků rodu *Cryptosporidium* a *Giardia* ve vodě, Státní zdravotní ústav v Praze.
65. Ramirez N., Ward L., Sreevatsan S. (2004). A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes. Infect.* 6: 773-785.
66. Rebanová V. (1998). *Protozoologie*. Jihočeská univerzita, České Budějovice. 151 s. ISBN 80-7040-260-1.
67. Ryan U. M., Power M., Xiao L. (2008). *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 55: 22-26.

68. Shirley D. A., Moonah S. N., Kotloff K. L. (2012). Burden disease from cryptosporidiosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25(5): 555-563.
69. Schindler J. (2014). *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. Grada, Praha. 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.
70. Slavin D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 65: 262-266.
71. Sréter T., Egyed Z., Széll Z., Kovács G., Nikolausz M., Márialigeti K., Varga I. (2000). Morphologic, host specificity and genetic characterization of a european *Cryptosporidium andersoni* isolate. *J. Parasitol.* 86: 1244-1249.
72. Sunnotel O., Lowery C. J., Moore J. E., Dooley J. S. G., Xiao L., Millar B. C., Rooney P. J., Snelling W. J. (2006). Under the microscope: *Cryptosporidium*. *Lett. Appl. Microbiol.* 43: 7-16.
73. Šlapeta J. (2006). *Cryptosporidium* species found in cattle: proposal for a new species. *T. Parasitol.* 22: 469-474.
74. Šlapeta J. and Morin-Adeline V. (2011). Apicomplexa Levine 1970. Sporozoa Leucart 1879. Version 18 May 2011. <<http://tolweb.org/Apicomplexa/2446/2011.05.18>>. In: The Tree of Life Web Project, <<http://tolweb.org/>>.
75. Šlapeta J. (2013). Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans. A thirty colour rainbow? *Inter. J. Parasitol.* 43: 957-970.
76. Švingalová D. (2002). Kapitoly z psychologie III. díl: Vývojová psychologie. Technická univerzita, Liberec. 51 s. ISBN: 80-7083-571-1.
77. Talaro K., Talaro A. (1993). *Foundations in Microbiology*. Wm. C. Brown Communications, Inc., Dubuque, IA. 782 p. ISBN 0-697-00530-5.
78. Tilley M., Upton S. J., Chrisp C. E. (1991). A comparative study on the biology of *Cryptosporidium* sp. from Guinea pigs *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *Can. J. Microbiol.* 37: 949-952.

79. Tyzzer E. E. (1907). A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 5: 12-13.
80. Tyzzer E. E. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenkd. 26: 394-412.
81. Tyzzer E. E. (1929). Coccidiosis in gallinaceous birds. Am. J. Hyg. 10: 269-383.
82. Vetterling J. M., Jervis H. R., Merrill T. G., Sprinz H. (1971). *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. J. Protozool. 18: 243-247.
83. Vohra P., Sharma M., Chaudhary U. (2012). Comprehensive review of diagnostic techniques for detection of *Cryptosporidium parvum* in stool samples. J. of Pharmacy. 2(5): 15-26.
84. Volf P., Horák P. et al. (2007). Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha. 318 s. ISBN 978-80-7387-008-9.
85. Votava M. (2003). Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
86. Votava M. (2010). Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody. Neptun, Brno. 495 s. ISBN 978-80-86850-04-8.
87. Votava M., Obdržálek V., Ondrovčík P., Růžička F., Zahradníček O., Woznicová V. (2000). Lékařská mikrobiologie II. Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii. Masarykova univerzita, Brno. 309 s. ISBN 80-210-2272-8.
88. Xiao L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Exp. Parasitol. 124: 80-89.
89. Xiao L., Alderisio K., Jiang J. (2006). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: effect of number of samples and analytic replicates on test results. Appl. Environ. Microbiol. 72: 5942-5947.
90. Xiao L., Alderisio K., Limor J., Royer M., Lal A. A. (2000). Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small subunit

rRNA – based diagnostic and genotyping tool. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5492-5498.

91. Xiao L., Fayer R. (2008). Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* 38: 1239-1255.
92. Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S. (2004a). *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 72-97.
93. Xiao L., Ryan U. M. (2008). Molecular epidemiology. *In: Cryptosporidium and cryptosporidiosis.* Fayer R., Xiao L. (eds.). CRC Press/IWA Publishing, Boca Raton. P. 119-171.
94. 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., Modrý D., Lal A. A. (2004b). Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 891-899.
95. 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.
96. Yoder J. S., Wallace R. M., Collier S. A., Beach M. J., Hlavsa M. C. (2012). Cryptosporidiosis Surveillance – United States, 2009 – 2010: Centers for disease and control prevention MMWR. 61(5): 1-12.