

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Kryptosporidiové infekce ježků

Bakalářská práce

Huclová Kristýna

Školitel: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

České Budějovice 2014

Huclová K., (2014): Kryptosporidiové infekce ježků [Cryptosporidial infection in hedgehog, Bc. Thesis, in Czech] – 50 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This study involves the morphological, biological, and molecular characteristics of *Cryptosporidium* spp. in hedgehogs. Course of infection based on 405 isolates from 15 hedgehogs obtained during a few months was observed. Morphological and molecular analyses were conducted to detect oocysts of *Cryptosporidium* spp. Altogether 69 (17.01%) samples from 11 hedgehogs were morphologically positive and 81 (19.9%) samples were molecular positive. Only 4 individuals remained negative, the cumulative prevalence represented 73.3 % of total samples. Oocysts from monitored hedgehogs measuring 4.9–4.7 μm (mean = 4.8 μm) \times 4.0–3.8 μm (mean = 3.9 μm) with a length to width ratio of 1.22 (1.26–1.20) (n = 50) in native were indistinguishable from those of *C. erinacei* and *C. parvum*. Molecular analyses based on small subunit rRNA, 60 kDa glycoprotein and *Cryptosporidium* oocyst wall protein revealed presence of *C. parvum* and *C. erinacei*. *Cryptosporidium parvum* IIdA18G1 was detected in 11 hedgehogs. Mixed infection with *C. parvum* with *C. erinacei* was observed in 3 animals. The *C. parvum* IIdA18G1 genotype has never been described in hedgehog before. It belongs to zoonotic IId subtype family frequently found in goats and lambs. This subtype was identified in lambs from Great Britain and Spain and also in children from Kuwait. *Cryptosporidium erinacei* is adapted to hedgehogs and it does not appear to cause clinical disease in hedgehogs. All positive individuals were juvenile and wild hedgehogs.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 13. 12. 2013

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za cenné rady a ohromnou trpělivost při vedení této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat MVDr. Ladě Hofmannové, která poskytla vzorky trusu ježků a bez které by se tato práce nemohla uskutečnit. Dále bych také poděkovala ostatním z laboratoře veterinární a medicínské protistologie, kteří vždy a ochotně odpovídali na mé dotazy. Děkuji rodině a přátelům, kteří stáli při psaní a studiu při mně.

OBSAH

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1. Biologie kryptosporidií	2
2.1.1. Životní cyklus kryptosporidií	2
2.1.2. Oocysty a prostředí	3
2.1.3. Projevy infekce	4
2.1.4. Přenos infekce	4
2.1.5. Morfologie	5
2.2. Hostitelská specifita	6
2.2.1. Platné druhy kryptosporidií a jejich hostitelé	7
2.2.2. Fylogeneze kryptosporidií	11
2.3. Kryptosporidie a kryptosporidióza hmyzožravců	12
2.3.1. Rejkovití	12
2.3.2. Krtkovití	13
2.3.3. Ježkovití	13
2.3.3.1. Výskyt a prevalence kryptosporidií u ježků	14
2.3.3.2. Klinické příznaky kryptosporidiózy ježků	14
2.3.3.3. Patogenita kryptosporidií infikujících ježky	15
2.3.3.4. Druhy a genotypy kryptosporidií infikujících ježky.....	16
2.3.3.5. Zoonotický potenciál kryptosporidií přenášených ježky	17
3. Cíle práce	18
4. Materiál a metodika	19
4.1. Materiál	19
4.2. Detekce oocyst kryptosporidií	19
4.2.1. Barvení oocyst kryptosporidií anilin-methyl-violet	19
4.2.2. Koncentrační metoda	20
4.3. Purifikace kryptosporidií	20

4.3.1. Sacharózový gradient	21
4.3.2. Cesium chloridový gradient	21
4.4. Morfometrická analýza oocyst	22
4.5. Molekulární analýza	22
4.5.1. Izolace DNA	22
4.5.2. Polymerázová řetězová reakce	22
4.5.3. Gelová elektroforéza	25
4.5.4. Příprava vzorků na sekvenaci	26
4.5.5. Extrakce z gelu a sekvenace vzorků	26
4.6. Experimentální infekce	27
5. Výsledky	28
5.1 Prevalence kryptosporidií	28
5.2. Molekulární analýza	29
5.3. Morfometrická analýza oocyst	30
5.4. Klinické příznaky	33
5.5. Experimentální infekce	34
6. Diskuze	35
7. Literatura	38

1. ÚVOD

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou jednobuněční paraziti, kteří žijí a rozmnožují se na epiteliálních buňkách respiračního a zažívacího traktu obratlovců (Current a kol., 1991). Kryptosporidie patří do kmene Apicomplexa (vlastní apikální komplex), třídy Sporozoasida (rozmnožování probíhá v pohlavních a nepohlavních cyklech, produkce oocyst), podtřídy Coccidiasina (životní cyklus zahrnuje merogonii, gametogonii a sporogonii), řádu Euccoccidioria (výskyt schizogonie), podřádu Eimeriorina (nezávislý vývoj mikro a makrogamet) (Egyed a kol., 2003). Molekulární studie prokázaly, že kryptosporidie jsou více příbuzné gregarinám než kokciíím (Carreno a kol., 1999). Jejich společným znakem je morfologická stavba organel sloužících k přichycení k hostitelské buňce (Valigurová a kol., 2007). V minulosti představovala morfologie oocyst základ pro taxonomii kryptosporidií. Protože oocysty mnohých druhů jsou si natolik podobné velikostí i strukturou, je k jejich rozlišení nutné použít molekulární metody. Současné studie využívají molekulární diagnostiku k určení druhu a genotypu a následné subtypizaci. V současnosti je uznáno 31 platných druhů rodu *Cryptosporidium*, ostatní zástupci rodu jsou označováni jako genotypy (Šlapeta, 2013). Při identifikaci druhů se nejčastěji používá PCR. Analýza používá specifických primerů k amplifikaci variabilního úseku genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA). Další používané markery pro analýzu kryptosporidií jsou gen kódující protein stěny oocyst (COWP), gen kódující aktin a gen kódující HSP70 (70 kDa heat shock protein) (Kimbell a kol., 1999; Sulaiman a kol., 1999). Další používaná metoda je PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) a následná subtypizace (Widmer a kol., 2012). Subtypizace je určení malých intragenomických variant v rámci druhu nebo genotypu. V rámci GP60 (gen kódující 60 kDa glykoprotein) byly identifikovány rodiny glykoproteinů odpovídající danému genotypu nebo druhu kryptosporidií. V rámci jednotlivých rodin se rozlišují subtypy na základě množství trinukleotidových opakování (Sulaiman a kol., 1999).

Vznikají z nich při procesu gametogonie samičí pohlavní stádia makrogamonty a samčí mikrogamonty (O'Donoghue, 1995). Z mikrogamontu se uvolní pohyblivé mikrogamety a z makrogamontu vznikají nepohyblivé makrogamety. Jejich splynutím dojde ke vzniku zygoty. Endogenní sporulací se vytvoří ze zygoty zralá oocysta. Následně vznikají dva typy oocyst. V prvním případě se jedná o odolné silnostěnné oocysty, které opouští hostitele trusem a slouží k přenosu infekce na další vnímavé hostitele, a v případě druhém se jedná o tenkostěnné oocysty neschopné přežít ve vnějším prostředí (Fayer, 2004). Tenkostěnné oocysty společně s merozoity slouží k infekci dalších částí trávicího traktu. Vývojová stádia kryptosporidií se nezanořují do cytoplazmy, ale nachází se v parazitoformním saku, umístěném v oblasti mikrovilů hostitelských buněk (Current a kol., 1991). Stejná stádia se u kokcií nacházejí hluboko v plazmatické membráně enterocyty. Oocysty *C. parvum* prodělávají sporogenezi uvnitř hostitele a infekční jsou uvolněny společně s výkaly. Oproti tomu oocysty kokcií neprochází sporulací, dokud nejsou uvolněny z hostitele a vystaveny kyslíku a teplotě pod 37 °C (Fayer a kol., 2000).

2.1.2. Oocysty a prostředí

V prostředí podléhá trus rozkladu vlivem povětrnostních podmínek a oocysty se uvolňují do půdy nebo do povrchových vod. Mnoho faktorů ovlivňuje přežívání oocyst v prostředí. Silná ochranná stěna umožňuje oocystě zůstat mnoho měsíců infekční, zvláště při nepříznivých podmínkách severního klimatu, kdy je teplota povrchových vod nízká, ale nad bodem mrazu. Například oocysty *C. parvum* byly schopné infikovat myši i po 6 měsíčním skladování v deionizované vodě o teplotě 0,5, 10, 15, 20 °C (Fayer, 2004). Jejich stěna je natolik odolná, že mohou přežít i poměrně dlouhou dobu v mořské vodě (Fayer, 2004). Životaschopnost oocyst v povrchových vodách dále závisí na množství heterotrofních bakterií a výskytu bezobratlých živočichů, kteří mohou oocysty pohltit společně s potravou a po průchodu trávicím traktem vířníků již oocysta není schopna další infekce (Fayer a kol., 2000).

Oocysty přicházejí do kontaktu s různými typy půd. V půdách se zásaditým nebo neutrálním pH bylo zjištěno nižší přežívání oocyst oproti půdám s kyselým pH (Ramirez a kol., 2004). Ze studie o přežívání oocyst *C. parvum* v půdách o různé zrnitosti vyplynulo, že nejdéle přežívají oocysty v půdách s největším obsahem jílu, neboť tyto půdy nejlépe zadržují vodu a chrání oocysty proti vysychání (Fayer a kol., 2000).

Oocysty jsou velmi odolné vůči běžným dezinfekčním prostředkům, jako jsou amoniak a formalín, používaných v lékařských zařízeních a laboratořích (Fayer a kol., 2000). Detekce

kryptosporidií v pitné vodě ukázalo, že běžné chlorování a ionizace používané na většinu vodních mikroorganismů, má jen velmi malý účinek na životaschopnost oocyst *C. parvum* (Ruecker a kol., 2007).

2.1.3. Projevy infekce

Hlavní příznaky kryptosporidiózy jsou vodnatý průjem spojený s křečemi v břiše, úbytek váhy, nevolnost, zvracení a celková slabost (Current a Garcia, 1991; MacKenzie a kol., 1994; Mathieu a kol., 2004). Nespecifickými příznaky mohou být bolest svalů a hlavy, celková slabost a malátnost (Ramirez a kol., 2004). Symptomy mají podobné znaky jak u dětí, tak u dospělých, ačkoli kryptosporidióza prodělaná v raném dětství může mít trvalý vliv na růst a vývoj dítěte (Mølbak a kol., 1997). Špatný imunitní stav jedince (HIV infekce, drogy, transplantace, chemoterapie, rizikové sexuální praktiky) přispívá k chronické kryptosporidióze (Turkcapar a kol., 2002; Tappeh a kol., 2006). Pacienti mohou trpět průjmem trvajícím více jak dva měsíce a během celé této doby dochází k vážné dehydrataci a podvýživě pacienta vedoucí až k jeho úmrtí (Farthing, 2000). Rizikovou skupinu představují děti a zaměstnanci v pečovatelských centrech, farmáři a zdravotní pracovníci (Fayer a kol., 2000). Turisté se vystavují nebezpečí nákazy při cestách do rozvojových zemí s vysokým stupněm výskytu infekce. Zdraví jedinci jsou schopni úplného uzdravení, délka trvání příznaků kryptosporidiózy je 9–15 dní (Ramirez a kol., 2004). Pouze předchozí vystavení parazitu vede k plné nebo částečné imunizaci.

2.1.4. Přenos infekce

Oocysty kryptosporidií jsou přenášeny z jednoho infekčního hostitele na dalšího vhodného hostitele. Možností přenosu je několik. Jako jedna z možností je například přenos z člověka na člověka přímým nebo nepřímým kontaktem (Fayer a Xiao, 2007). Jako další můžeme uvést přenos mezi zvířaty navzájem, dále přenos ze zvířete na člověka, přenos kontaminovanou potravou a pitnou nebo užitkovou vodou a také vzdušný přenos. Většina lidských infekcí je způsobena zoonotickým přenosem (Fayer a kol., 2000).

Přenos pomocí vody

Pro člověka představuje kontaminovaná voda hlavní zdroj kryptosporidiové infekce vedoucí často až k epidemiím (Ramirez a kol., 2004). Znečištění pitné vody oocystami kryptosporidií bývá často způsobeno silnými dešti, které v mnoha případech zapříčiní

prosakování odpadních vod (Yamamoto a kol., 2000). Jako příklad nejrozsáhlejší epidemie kryptosporidiózy je často uváděn případ Milwaukee, kde v roce 1993 bylo nakaženo více jak 400 000 obyvatel (MacKenzie a kol., 1995).

Přenos potravou

Vodní koryšši představují spolehlivé biologické indikátory vodních patogenů, protože filtrují velké množství vody a drobné částice se usazují v jejich žábrách (Fayer a kol., 2000). Oocysty *C. parvum* byly nalezeny v ústřicích sebraných v oblasti Chesapeake Bay, v mušlích na pobřeží Irska a v ústřicích z oblasti Galicie ve Španělsku (Gomez-Bautista a kol., 2000). Ačkoliv žádný z těchto nálezů nebyl spojen s epidemií kryptosporidiózy, opakované virové a bakteriální nemoci spojené s požíváním syrových koryššů by mohly sloužit jako varování (Graczyk a kol., 1999). Tepelná úprava koryššů by proto patrně omezila riziko onemocnění způsobené výše uvedenými patogeny. Oocysty *C. parvum* byly dále nalezeny na povrchu syrové zeleniny prodávané na tržištích Kostariky, Peru a Limy (Monge a kol., 1996). Zelenina může být kontaminována hnojivem ze zvířecího trusu nebo taktéž kontaminovanou vodou použitou při zavlažování. Jedním z výrazných faktorů, který přispívá k šíření těchto nákaz, mohou být i ne příliš pozitivní hygienické podmínky místních farmářů, kteří každodenně přicházejí se zeleninou do styku (Fayer a kol., 2000).

Vzdušný přenos

Smrtelná respirační kryptosporidióza byla zaznamenána u imunokompromitovaných jedinců s AIDS, maligními lymfomy a jedinci s transplantovanou kostní dření (Fayer a kol., 2000). Ptáci jsou postihováni respirační kryptosporidiózou častěji než savci (Ramirez a kol., 2004).

2.1.5. Morfologie vývojových stádií

Všechna vývojová stadia kryptosporidií jsou malá ve srovnání s ostatními střevními výtrusovci. Oocysty jsou kulovitě až oválného tvaru, plně vysporulované o průměru $7,4 \times 5,6 \mu\text{m}$ pro *C. muris* a $5,0 \times 4,5 \mu\text{m}$ pro *C. parvum* (Morgan a kol., 1999). Každá vysporulovaná oocysta obsahuje 4 sporozoity (bez sporocysty) a residuum, složené z velkého počtu malých granulí a kulovitých membránových globulí. Struktury jako mikropyle a polární čepička, běžně se vyskytující u kokcií, nejsou u kryptosporidií pozorovány (Fayer a kol.,

1986). Stěna oocyst kryptosporidií je hladká, bezbarvá, složena ze 2 vrstev oddělených tenkým prostorem (electron-lucent space) (O'Donoghue, 1995).

Sporozoiti mají obecně tvar půlměsíce s lehce zašpičatělým předním a zaobleným zadním koncem. V zadní části každého sporozoitu se nachází jádro.

Trofozoiti jsou kulaté nebo oválné formy o průměru 2–2,5 μm (Fayer a kol., 1986). Jsou přechodnou fází od sporozoitů a merozoitů k merontům. Trofozoiti a následující vývojová stádia se nacházejí uvnitř parazitoforního saku. Trofozoiti jsou dále charakterističtí velkým jádrem obsahujícím jadérko a absencí apikálního komplexu, charakteristického pro sporozoity a merozoity (Ditrich a kol., 2003).

Meronti typu I a II jsou morfologicky neodlišitelní. Mají tvar půlměsíce se zaobleným předním a zadním koncem. Obsahují jedno vezikulární jádro, endoplazmatické retikulum a množství granulí. Podobně jako merozoiti kokcií obsahují v přední části organely jako konoid, polární prstenec, mikronema. Od kokcií se liší absencí mitochondrií, mikropórů a polysacharidových granulí (O'Donoghue, 1995).

Mikrogamonti jsou krátce žijící samčí stádia. Zralé mikrogamety mají klínový tvar, jsou pokryty dvouvrstvou vnější membránou, která překrývá vnitřní membránu apikálního pólu. Na apikálním pólu se nachází polární prstenec (Fayer a kol., 1986).

Časná stádium makrogamontu (samičí stádium) je morfologicky neodlišitelné od trofozoitů.

Makrogamonti jsou kulovité útvary obsahující jedno velké jádro, endoplazmatické retikulum a jsou obklopeny dvojitou membránou.

2.2. Hostitelská specifita

Hostitelská specifita parazita představuje soubor hostitelů, které je daný parazit schopen infikovat a ukončit v nich vývojový cyklus. Přirozená hostitelská specifita je jedním ze základních znaků odlišujících od sebe jednotlivé druhy kryptosporidií (Xiao a kol., 2004). V rámci rodu *Cryptosporidium* lze obecně odlišit druhy s různou hostitelskou specifitou. Zatímco některé druhy kryptosporidií se vyznačují širokou hostitelskou specifitou a mohou nakazit velké množství hostitelů (*C. parvum*, *C. ubiquitum*), jiné se omezují pouze na skupiny hostitelů, jako jsou hlodavci nebo přežvýkavci (*C. muris* a *C. andersoni*) (Fayer a Xiao, 2008). Pro ověření hostitelského spektra jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií se používají oocysty získané z jednoho přirozeně infikovaného hostitele a jejich následný experimentální přenos na další hostitelské druhy.

2.2.1. Platné druhy kryptosporidií a jejich hostitelé

Kryptosporidie savců

Existuje nepřehledná genetická a biologická diverzita savčích druhů kryptosporidií. Hlavním důvodem proč došlo k takovému nárůstu, je velký počet provedených studií na toto téma.

***Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907**

V roce 1907 Ernest Edward Tyzzer popsal prvoka, kterého pozoroval v žaludečních žlázách pouze u laboratorních myši (Tyzzer, 1907). Meronti obsahují 6 merozoitů, každý s vlastním jádrem. Velikost oocyst je okolo $7,8 \times 5,6 \mu\text{m}$, přenos probíhá fekálně- orální cestou. Všechna stádia byla nalezena v oblasti žaludečních žláz (Tyzzer, 1907). Tento druh infikuje převážně hlodavce (křečky, sibiřské veverky, myšice, hraboše). Dále infikoval damany, velbloudy, kamzíky, makaky a lidi (Xiao a kol., 2004). Experimentálně byl kmen RN66 přenesen na druhy myšovitých, morčata, králíky, psy a kočky (Iseki a kol., 1989).

***Cryptosporidium andersoni* Lindsay, Upton, Owens, Morgan, Mead, Blagburn, 2000**

Tento druh infikuje žaludek (slez) skotu a produkuje oocysty morfologicky shodné s *C. muris* (Lindsay a kol., 2000). Oocysty jsou elipsovitého tvaru, plně vysporulované bez sporocyst, o velikosti $7,4 \times 5,5 \mu\text{m}$ (Sréter a kol., 2000). Narozdíl od oocyst *C. muris*, oocysty tohoto druhu neinfikují inbrední ani outbrední myši. Oocysty byly dále nalezeny u zubra, velblouda, bizona, imunosuprimovaného pacienta a experimentálně byla infekce přenesena na pískomily (Sréter a kol., 2000).

***Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912**

Tento druh byl prvně nalezen u myši. Lišil se od *C. muris* menší velikostí oocyst a místem infekce. *Cryptosporidium parvum* se vyskytuje v oblasti klků tenkého střeva. Infekce se často rozšiřuje i do tlustého střeva. Oocysty jsou malé, oválné o velikosti $5,0 \times 4,5 \mu\text{m}$ (Upton a kol., 1985). Více než 150 druhů savců bylo identifikováno jako hostitelé druhu *C. parvum*, podle současných molekulárních údajů se během evoluce kryptosporidií vyvinula rozsáhlá hostitelská adaptace (Widmer a kol., 2012). Tak se dřívější pojetí druhu *C. parvum* rozpadlo na několik genotypů, které byly prohlášeny za samostatné druhy. Genotyp 2 – tradiční *C. parvum* má široké rozmezí hostitelů včetně kopytníků, hlodavců, primátů a lidí (Widmer a kol., 2012).

***Cryptosporidium canis* Fayer, Trout, Xiao, Morgan, Lal, Dubey, 2001**

Kryptosporidie byly nalezeny ve výkalech psů po celém světě. Oocysty odebrány od přirozeně infikovaných psů měřily $4,9 \times 4,7 \mu\text{m}$ (Fayer a kol., 2001) a byly morfologicky neodlišitelné od oocyst *C. parvum*. Kryptosporidie z psů byly infekční pro velbloudy, ale narozdíl od *C. parvum* nebyly infekční pro myši. Na základě schopnosti infikovat člověka a

skot, a neschopnosti infikovat myši, dále podle značných genetických rozdílů od ostatních kryptosporidií, byl tento střevní parazit pojmenován *C. canis* (Fayer a kol., 2001).

***Cryptosporidium felis* Iseki, 1979**

Jedná se o druh kryptosporidií specializovaný na kočky. Přesto je infekční pro skot, myšice a člověka (Iseki, 1979). Oocysty jsou morfologicky podobné *C. parvum*. Infekční pro imunokompetentní i imunodeficitní jedince (Mtambo a kol., 1996).

***Cryptosporidium wrairi* Vetterling, Jervis, Merrill, Sprinz, 1971**

Střevní druh specializovaný na morčata. Parazit byl pozorován pouze u mláďat (Xiao a kol., 2004). Infekce není spojená s průjmem nebo se zjevnými známkami kryptosporidiózy, pouze s enteritidou (Vetterling a kol., 1971). Oocysty morfologicky podobné *C. parvum* o velikosti $5,4 \times 4,6 \mu\text{m}$ (Tilley a kol., 1991).

***Cryptosporidium hominis* Morgan-Ryan, Fall, Ward, Hijjawi, Sulaiman, Fayer, Thompson, Olson, Lal, Xiao, 2002**

Střevní druh infikující převážně člověka. Morfologicky identický druh s *C. parvum*, oocysty o velikosti $5,2 \times 4,7 \mu\text{m}$. Narozdíl od *C. parvum*, *C. hominis* není infekční pro myši, krysy, kočky, psy a skot (Morgan-Ryan a kol., 2002). Dalšími přirozenými hostiteli jsou opice, jehňata, moroň indický. Experimentálně byl druh přenesen na gnotobiotická prasata (Akiyoshi a kol., 2002). Pro člověka je velmi virulentní a často je původce epidemií přenášených pomocí vodních zdrojů.

***Cryptosporidium suis* Ryan, Monis, Enemark, Sulaiman, Samarasinghe, Read, Buddle, Robertson, Zhou, Thompson, Xiao, 2004**

Dříve označována jako pig genotype I (Morgan a kol., 1998). Tento druh není infekční pro myši a obtížně infikuje skot (Enemark a kol., 2003). Byl zaznamenán u přirozeně infikovaných prasat. Tento druh je vcelku běžný, ale nezpůsobuje klinické příznaky (Enemark a kol., 2003).

***Cryptosporidium bovis* Fayer, Santín, Xiao, 2005**

Tento druh byl označován jako *Cryptosporidium* genotype bovine B (Xiao a kol., 2002). Morfologicky jsou oocysty neodlišitelné od oocyst *C. parvum*, narozdíl od nich ale neinfikují BALB/c myši ani jehňata (Fayer a kol., 2005). Molekulární data ukazují rozšíření tohoto druhu u odstavených telat (Fayer a kol., 2005).

***Cryptosporidium fayeri* Ryan, Power, Xiao, 2008**

Druh byl identifikován jako *Cryptosporidium* marsupial genotype I. Jeho oocysty jsou neodlišitelné od oocyst *C. parvum* vyizolovaných z klokana rudého (Ryan a kol., 2008). Tento

druh je geneticky blízce příbuzný american opossum genotype I, a jeho hostitele představují výlučně vačnatci (Fayer, 2010).

***Cryptosporidium ryanae* Fayer, Santín, Trout, 2008**

Původně určený jako *Cryptosporidium* deer-like genotype (Xiao a kol., 2002). Nebyl nikdy nalezen u jelenovitých, ale byl po nich pojmenován díky sekvenci SSU rRNA, která byla velmi podobná deer genotypu (Xiao a kol., 2002). *Cryptosporidium ryanae* má nejmenší oocysty mezi kryptosporidii savců 2,9–4,4 $\mu\text{m} \times$ 2,9–3,7 μm . Infikuje výlučně skot (Fayer, 2010).

***Cryptosporidium macropodum* Power, Ryan, 2008**

Druh *Cryptosporidium macropodum* byl popsán na základě oocyst vyizolovaných z trusu klokana obrovského (*Macropus giganteus*), nerozeznatelných od *C. parvum*, *C. hominis*, *C. suis* a *C. canis* (Power a kol., 2008). Druh *C. macropodum* byl nalezen u klokana obrovského, klokana bažinného (*Wallabia bicolor*), klokana rudého (*Macropus rufus*) a klokana velkého (*Macropus fuliginosus*) (Power a kol., 2008).

***Cryptosporidium ubiquitum* Fayer, Santín, Macarisin, 2010**

Druh *Cryptosporidium ubiquitum*, dříve nazývaný *Cryptosporidium* cervine genotype byl nalezen u divoce žijících i domestikovaných přežvýkavců, hlodavců, masožravců, dikobrazů a primátů včetně člověka (Fayer a kol., 2010). Druh je celosvětově rozšířen a je infekční pro celou řadu savců, je nejčastějším druhem kryptosporidií nalezeným ve vodních zdrojích (Xiao a kol., 2000, 2006). Na základě morfologických, molekulárních a biologických dat byl tento kosmopolitní parazit, určen jako samostatný druh.

***Cryptosporidium scrofarum* Kváč, Kestřánová, Pinková, Květoňová, Kalinová, Wagnerová, Kotková, Vítovec, Ditrich, McEvoy, Stenger, Sak, 2013**

Druh byl původně určen jako *Cryptosporidium* pig genotype II, převažuje u dospělých prasat a geograficky se vyskytuje po celém světě. Oocysty *C. scrofarum* jsou morfologicky neodlišitelné od *C. parvum*. Rozměry oocyst se pohybují v rozmezí 4,8–6,0 $\mu\text{m} \times$ 4,2–5,3 μm (Kváč a kol., 2013). Oocysty of *C. scrofarum* získané z přirozeně infikovaných prasat jsou infekční pro 8 týdnů stará prasata, nejsou infekční pro prasata stará 4 týdny (Kváč a kol., 2013). Druh *Cryptosporidium scrofarum* nebyl infekční pro dospělé SCID myši, dospělé BALB/c myši.

***Cryptosporidium xiaoi* Fayer, Santín, 2009**

Tento nový druh byl popsán u ovcí ze Španělska, Tuniska, Velké Británie a USA. Oocysty *C. xiaoi*, dříve označované jako *Cryptosporidium* bovis-like genotype. Oocysty získané z přirozeně infikovaných ovcí byly infekční pro jehňata (Fayer a kol., 2009). Oocysty tohoto

druhu jsou podobné *C. bovis* jen nepatrně menší o rozměrech: $3,9 \times 3,4 \mu\text{m}$ (Fayer a kol., 2009). Oocysty *C. xiaoi* nejsou infekční pro BALB/c myši. Na základě morfologických, molekulárních a biologických údajů byl tento celosvětově rozšířený parazit rozpoznán jako nový druh.

***Cryptosporidium tyzzeri* Ren, Zhao, Zhang, Ning, Jian, Wang, Lv, Wang, Arrowood, Xiao, 2012**

Druh dříve nazývaný *C. parvum* mouse genotype I. Oocysty tohoto druhu mají rozměry přibližně: $4,6 \times 4,2 \mu\text{m}$ a jsou nepatrně menší než oocysty *C. parvum* (Ren a kol., 2012). Oocysty nejsou infekční pro jehňata a telata, druh je celosvětově rozšířen.

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

Tento nový druh byl určen mezi turisty Velké Británie s gastrointestinálními příznaky choroby, kteří navštívili Indický subkontinent. Epidemiologie byla u těchto případů odlišná od epidemiologie jiných druhů, například *Cryptosporidium parvum* a *Cryptosporidium hominis*. Symptomy zahrnovaly průjemy, bolesti břicha, nevolnost, zvracení a horečku (Elwin a kol., 2012).

***Cryptosporidium cuniculus* Inman, Takeuchi, 1979**

Cryptosporidium cuniculus byl původně nalezen v tenkém střevě králíků a byl zařazen mezi lidské patogeny. Byl původcem vodní epidemie v Northamptonshire ve Velké Británii. Klinickými příznaky se neliší od jiných druhů napadajících člověka.

***Cryptosporidium pestis* Šlapeta, 2006**

Tento druh byl určován jako *C. Parvum bovine* genotyp. Nachází se v tenkém střevě skotu.

Kryptosporidie ostatních obratlovců

Kryptosporidie byly zaznamenány u více než 30 druhů ptáků. Druhy *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* a *Cryptosporidium galli* jsou schopny infikovat velké množství ptačích druhů, ale liší se místem infekce (tabulka 1) (Xiao a kol., 2004). Dále byly kryptosporidie nalezeny přibližně u 80 druhů hadů, ještěřů a želv (Graczyk, 2008). Jsou rozpoznány dva druhy kryptosporidií plazů: *Cryptosporidium serpentis* – žaludeční parazit a *Cryptosporidium varanii* - střevní parazit (Fayer, 2010). Plazi, speciálně hadi, jsou skupina nejvážněji postižená kryptosporidiózou, infekce bývá často chronické povahy (Xiao a kol., 2004).

Tab.1: Seznam platných druhů kryptosporidií plazů, ptáků, obojživelníků a ryb

DRUH	HOSTITEL	LOKALIZACE
<i>C. fragile</i> Jirků a kol., 2008	obojživelníci	žaludek
<i>C. serpentis</i> Levine, 1980	plazi	žaludek
<i>C. varanii</i> Pavlásek a kol., 1995	plazi	žaludek, tenké střevo
<i>C. baileyi</i> Current a kol., 1986	drůbež	bursa Fabricii
<i>C. galli</i> Pavlásek, 1999	ptáci	žláznatý žaludek
<i>C. meleagridis</i> Slavin, 1955	ptáci	tenké střevo
<i>C. cichlidis</i> Paperna a kol., 1996	ryby	žaludek
<i>C. molnari</i> Alvarez-Pellitero a Sitjá-Bonadilla, 2002	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. reichenbachklinkei</i> Paperna a kol., 1996	ryby	žaludek
<i>C. scopthalmi</i> Alvarez-Pellitero a kol., 2004	platýs	střevo

2.2.2. Fylogeneze kryptosporidií

Studie dokazují existenci hostitelské adaptace a koevoluci parazita s hostitelem v průběhu evoluce kryptosporidií. Střevní a žaludeční druhy kryptosporidií tvoří jednu monofyletickou skupinu (Xiao a kol., 2004). Paraziti plazů (*C. ducismarci*, *C. serpentis*, *C. varanii*) tvoří bazální větev a většina parazitů savců je recentních (Xiao a kol., 2002). Geneticky příbuzné druhy kryptosporidií často napadají příbuzné druhy hostitelů (Xiao a kol., 2004). To dokazuje blízká příbuznost kryptosporidií vyizolovaných ze severoamerických vačnatců s kryptosporidii vyizolovanými z australských vačnatců (Xiao a kol., 2004). Z důvodu nedostatku fosilních záznamů a nepřesnosti molekulárních hodin vymezit dobu evolučních změn, je obtížné určit vznik rodu *Cryptosporidium* (Carreno a kol., 1999). Nicméně kryptosporidie tvoří sesterskou skupinu s gregarinami (paraziti bezobratlých), což naznačuje velmi časně oddělení od zbytku skupiny Apicomplexa (Carreno a kol., 1999). Časný vznik kryptosporidií je podporován i malou genetickou vzdáleností (0,38%) mezi kryptosporidii australských a amerických vačnatců, kteří byli odděleni před více než 50 miliony let v důsledku kontinentálnímu driftu (Xiao a kol., 2002). *Cryptosporidium baileyi* a ostatní kryptosporidie infikující kachny a husy jsou řazeny na bazální pozici střevních kryptosporidií. *Cryptosporidium meleagridis* je taxonomicky na stejné úrovni jako většina savčích kryptosporidií, a je blízce příbuzná *C. parvum*, *C. hominis*, *C. wrairi* (Xiao a kol., 2002). Z toho vyplývá, že *C. meleagridis* může být savčí kryptosporidie následně přizpůsobena na ptáky. Hostitelská adaptace je typická pro střevní kryptosporidie savců (Xiao a kol., 2000). Mnohé z nich byly dříve považovány za druh *C. parvum*. V mnohem menším rozsahu se hostitelská adaptace vyskytuje i u druhů infikujících plazy a ptáky.

2.3. Kryptosporidie a kryptosporidóza hmyzožravců

Hmyzožravci je fylogeneticky starý savčí řád, který je považován za vývojový základ ostatních placentálních savců (Riley a kol., 2005). Většinou jsou drobní s protáhlou lebkou a malou mozkovnou, jednoduše stavěným mozkiem s velkými čichovými laloky. Jedním z primitivních znaků je úplný chrup složený z velkého počtu (26–48) špičatých a tvarově podobných zubů (Riley a kol., 2005). Živí se hlavně bezobratlými živočichy a drobnými obratlovci. Orientují se převážně pomocí čichu a hmatu, někteří mají výborný sluch. Slabší zrak souvisí s převládající noční aktivitou. Do této skupiny patří čeledi štětinatcovití (Solenodontidae), ježkovití (Erinaceidae), rejskovití (Soricidae) a krtkovití (Talpidae).

2.3.1. Rejskovití

Tato čeleď obsahuje 310 druhů žijících kosmopolitně kromě Austrálie a J. Ameriky (Dungel a Gaisler, 1951). Bělozubka nejmenší (*Suncus etruscus*) je považována za nejmenšího savce (Jelínek a kol., 2005). Jedinci mají hlavu protaženou do dlouhého rypáčku, orientují se hlavně pomocí čichu a sluchu. Dokonce mohou vydávat ultrazvukové signály. Úkryty si vyhledávají pod zemí. Spotřebují velké množství potravy, živí se hlavně bezobratlými živočichy, někdy se u nich vyskytuje kanibalismus (Anděra, 2000). Páchnoucími výměšky žláz si vymezují teritorium a částečně se jimi chrání proti predátorům (Jelínek a kol., 2005). Jsou náchylní k ekologickým změnám a řada z nich je zákonem chráněná.

Kryptosporidie byly nalezeny u rejsků z centrální části Velké Británie v oblasti Warwickshire a na severovýchodě Španělska v oblasti Katalánska (Torres a kol., 2000, Sturdee a kol., 1999). Ve velké Británii byly mikroskopicky detekovány oocysty v trusu rejska obecného (*Sorex araneus*) a rejska malého (*Sorex minutus*). Na základě morfologie oocyst byly detekovány druhy *C. parvum* a *C. muris*, nicméně nebyla provedena molekulární determinace druhu/genotypu (Chalmers a kol., 1997, Sturdee a kol., 1998).

V oblasti Katalánska byly kryptosporidie detekovány u 14,8 % (13/88) bělozubky tmavé (*Crocidura russula*) (Torres a kol., 2000). Na základě morfologické charakteristiky byly oocysty určeny jako *C. parvum* (Torres a kol., 2000). Nebyl zjištěn žádný zjevný vztah mezi kryptosporidiovou infekcí a pohlavím nebo věkem zvířat.

2.3.2. Krtkovití

Krtkovití jsou přizpůsobeni k podzemnímu životu. Mají mohutné lopatovité přední končetiny s mohutnými drápy, hladkou hustou černou srst, dlouhý rypáček, na jehož konci se nachází hmatová tělíška (Smrž a kol., 2004). Chybí ušní boltce. Mají uzavíratelné zvukovody a drobné oči. Rozšíření jsou v holarktické oblasti v počtu asi 42 druhů (Anděra, 2000). V české fauně je čeleď zastoupena druhem krtek obecný (*Talpa europaea*). Nejsou žádné záznamy o výskytu kryptosporidií u zástupců této čeledi.

2.3.3. Ježkovití

Ježkovití jsou noční jedinci, mají pesíky na hřbetě a boku těla přeměněny v ostny. Ostny jsou tvořeny houbovým základem a vnější keratinovou slupkou (Riley a kol., 2005). Podkožní svalový vak umožňuje svinutí těla. Zimu přečkávají v hibernaci. Na většině našeho území žije Ježek východní (*Erinaceus concolor*) (Smrž a kol., 2004). Ježek západní (*Erinaceus europaeus*) je situován do západní Evropy. Ježci přenášejí řadu zoonotických chorob (tabulka 2; Riley a kol., 2005).

Tab. 2: Přehled původců zoonotických infekcí přenášených ježky

	Bakteriální	Protozoární	Virové	Mykotické
Potvrzené zoonotické nemoci přenášené ježky	<i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia</i> <i>Pseudotuberculosis</i> <i>Mycobacterium marinum</i>	<i>Cryptosporidium</i>	Herpesvirus Arboviry Lyssavirus	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Microsporum</i> spp.
Potenciální zoonotické nemoci přenášené ježky	<i>Chlamydia psittaci</i> <i>Coxiella burnetii</i> <i>Yersinia pestis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	Tahyna-Virus Flavivirus Nairovirus Bhanja virus Paramyxovirus	<i>Candida albicans</i>

Ježek západní (*Erinaceus europaeus*) a ježek východní (*Erinaceus concolor*) jsou chráněná divoká zvířata, která se dostanou k veterinářům z různých důvodů (zranění, podvýživa). Mláďata ježků narozená na konci léta lidé často odnáší do záchranných stanic. Tito jedinci mají nedostatek tukových zásob a nemohou proto hybernovat (Anděra, 2000). Po přezimování ve stanicích jsou následující jaro vypuštěni zpět do přírody. Zprávy o molekulární detekci kryptosporidií vyizolované ze stolice ježků jsou vzácné (Dyachenko a kol., 2009).

2.3.3.1. Výskyt a prevalence kryptosporidií u ježků

První případy kryptosporidiózy ježků zahrnují smrtelnou infekci juvenilního jedince (*Altretrix albiventris*) umístěného v zoo v Baltimore (Graczyk a kol., 1998) a další smrtelnou infekci dospělé samice ježka západního (*Erinaceus europaeus*) (Meredith a kol., 2009), nicméně druhy/genotypy způsobující tyto infekce nebyly identifikovány. Případy kryptosporidiózy u ježka *Erinaceus europaeus* byly dále potvrzeny v záchranných stanicích Německa na přelomu let 2007/2008, dále v roce 1999 v centrální části Velké Británie v oblasti Warwickshire a v roce 2002 u jednoho případu z Dánska (Dyachenko a kol., 2009; Sturdee a kol., 1999; Enemark a kol., 2002).

V oblasti Warwickshire byli testováni 4 ježci, pozitivita činila 25%, podle mikroskopické analýzy se jednalo o druh *C. parvum*. Ze 188 jedinců ze záchranných stanic Německa bylo 29,8 % pozitivních na kryptosporidie, podle mikroskopické a molekulární analýzy se jednalo o 3 genotypy druhu *C. parvum* VIIa A21R10, IIc A5G3, IIa A19G1R1. Dále zde byly nalezeny oocysty druhů *Isospora* spp. a *Capilaria* spp. Molekulární analýze byl podroben i jeden vzorek ježka z Dánska, byl identifikován jako *C. erinacei* AF469174 (Enemark a kol., 2002).

2.3.3.2. Klinické příznaky kryptosporidiózy ježků

Studie pojednávají o průjmovém onemocnění u jedinců pozitivních na kryptosporidie (Graczyk a kol., 1998; Meredith a kol., 2009), nicméně druhy/ genotypy kryptosporidií způsobující průjmová onemocnění nebyly identifikovány. Mezi hlavní příznaky postihující ježky s kryptosporidiózou patří slabost, letargie, snížená chuť k jídlu a vodnatý průjem (Dyachenko a kol., 2007). Mezi nespecifickými příznaky se objevily hemoragický průjem a polydipsie (Meredith a kol., 2009).

2.3.3.3. Patogenita kryptosporidií infikujících ježky

Případ úmrtí mláděte ježka afrického (*Alteletrix albiventris*) je první záznam střevní kryptosporidiózy hmyzožravců (Graczyk a kol., 1998). Tento jedinec byl chován v zajetí v zoo v Baltimore, kde byl nalezen mrtev bez vnějších příznaků nemoci, pouze s nafouklým žaludkem (Graczyk a kol., 1998). V roce 2009 byl zaznamenán první smrtelný případ kryptosporidiové infekce u dospělé samice ježka západního (*Erinaceus europaeus*) chované v zajetí v záchrané stanici ve Velké Británii. U samice se začala projevovat letargie a snížená chuť k jídlu a po několika týdnech byl u ježka diagnostikován hemoragický průjem a polydipsie (Meredith a kol., 2009).

Patologie

Ježek africký (*Alteletrix albiventris*) byl podroben pitvě, kde se zjistilo, že celý zažívací trakt byl naplněn čirou tekutinou (Graczyk a kol., 1998). Ve tkáni byla pod světelným mikroskopem viditelná vývojová stádia *Cryptosporidium* sp. (Graczyk a kol., 1998). Slezinná tkáň vykazovala extramedulární hematopoezi a úbytek bílých krvinek (Graczyk a kol., 1995). V oblasti lačníku byl přítomen extrémní počet vývojových stádií *Cryptosporidium* sp. (Graczyk a kol., 1998). Vývojová stádia kryptosporidií byla v nižším počtu přítomna i v oblasti kyčelníku a tračníku (Graczyk a kol., 1998). Více než 75% epitelárních buněk z oblasti lačníku bylo napadeno patogenem, byla objevena atrofie klků v oblasti lačníku i kyčelníku (Graczyk a kol., 1998). Slizniční hyperplázie postihla oblast tračníku (Graczyk a kol., 1998).

Příznaky u samice ježka západního byly stejného charakteru jako u ježka afrického. Zažívací trakt byl naplněn čirou tekutinou a malým množstvím hlenu v distální části tenkého a tlustého střeva (Meredith a kol., 2009). V zažívacím traktu nebyla nalezena žádná krev (Meredith a kol., 2009). Byla provedena bakteriální kultivace ze stěny lačníku, která neprokázala žádné střevní patogeny (Meredith a kol., 2009). Histopatologické vyšetření lačníku a kyčelníku ukázalo značný počet malých okrouhlých bazofilních organismů, typických pro kryptosporidie, nacházejících se na povrchu lumenu enterocytů (Meredith a kol., 2009). Oblast kyčelníku byla postižena těžkou atrofií klků (Meredith a kol., 2009). Makroskopické a histopatologické nálezy byly podobné nálezům v případě ježka afrického (*Alteletrix albiventris*). Distenze celého zažívacího traktu s obsahem čiré tekutiny, atrofie klků v kyčelníku a lačníku, nález oocyst v tračníku taktéž odpovídá předchozímu případu.

Imunitní odpověď na infekci

Na povrchu lumenu enterocytů byl přítomen zvýšený počet lymfocytů, makrofágů, žírných buněk a neutrofilů (Meredith a kol., 2009). Ve sliznici tračníku byl pouze mírný vzrůst počtu makrofágů, plazmatických buněk a lymfocytů (Meredith a kol., 2009). Mezenterické lymfatické uzliny byly zvětšené a obsahovaly velký počet plazmatických buněk v kortexu i dřeni (Meredith a kol., 2009). Germiální jádra byla malá, ale početná. Viscerální pleura (poplicnice) byla zhuštěná a obsahovala fibroblasty, makrofágy, několik lymfocytů a plazmatických buněk (Meredith a kol., 2009).

Vyšetření

Vzorky byly zpracovány Merifluor testem pro určení druhu kryptosporidií a giardií a následně fluorescenční mikroskopií (Graczyk a kol., 1995). Podle intenzity fluorescence (4+) byl určen typ vývojových stádií parazita jako *Cryptosporidium parvum* (Graczyk a kol., 1995). Závažná kryptosporidiální infekce vyvolala patologické změny vedoucí až k úmrtí jedince. Patologické změny a věk mrtvého ježka naznačuje, že nešlo o chronickou infekci, projevující se na chování jedince. Ačkoliv vývojová stádia kryptosporidií nalezena ve střevech ježka reagovala pozitivně v Merifluor testu pro detekci *C. parvum*, neproběhlo konečné stanovení druhu. Další testy by poskytly odpověď, zda se nejedná o jiné savčí druhy kryptosporidií nepřenosné na člověka (Meredith a kol., 2009).

V případě samice ježka západního byly pozorovány příznaky chronického zánětu, který mohl jedince predisponovat ke kryptosporidióze (Meredith a kol., 2009).

2.3.3.4. Druhy a genotypy kryptosporidií infikujících ježky

Molekulárními metodami bylo dosud vyšetřeno pouze 12 vzorků trusu ježka západního. Metodou nested PCR-RFLP (SSU rRNA) byly všechny vzorky detekovány jako *C. parvum*. Subtypizace (GP60) prokázala přítomnost 3 různých subtypů *C. parvum*. Pět vzorků bylo shodných s IIc subtypovou rodinou, 1 vzorek byl homologický s IIa subtypovou rodinou. Ostatních 6 vzorků představovalo sekvence s nízkou identitou k již známým sekvencím GP60. Tyto nové GP60 sekvence byly určeny jako nová VIIa subtypová rodina představující genotyp, který je geneticky a biologicky odlišný od všech předchozích druhů kryptosporidií se specializací na ježky. Použití dalších markerů zahrnujících gen kódující aktin a gen kódující HSP70 (70 kDa heat shock protein) potvrdilo identitu vzorků k *C. parvum* a vysoký stupeň odlišnosti mezi izoláty náležící k *C. parvum* bovine IIa a VIIa subtypu (Dyachenko a kol.,

2009). Nicméně publikace Lv a kol., 2009 přiřadila GP60 sekvence *Cryptosporidium wrairi* také do subtypové rodiny VII. Laatamna a kol., 2013 navrhl pokračovat v subtypové rodině VII pro *C. wrairi* a představil novou subtypovou rodinu XIII, pro *Cryptosporidium hedgehog* genotype. *Cryptosporidium hedgehog* genotype adaptovaný na ježky je geneticky, morfologicky a biologicky odlišný od ostatních popsanych druhů kryptosporidií, proto bylo navrženo řadit tento genotyp mezi samostatné druhy pod názvem *Cryptosporidium erinacei* (Kváč a kol., 2014b).

Jeden vzorek ježka *Erinaceus europaeus* z Dánska s příznaky vodnatého průjmu byl podroben molekulární analýze pro detekci kryptosporidií (Enemark a kol., 2002). Metoda PCR-RFLP pro gen kódující protein stěny oocyst (COWP) určila nový druh *Cryptosporidium erinacei* specializovaný na ježky (AF469174) (Enemark a kol., 2002).

2.3.3.5. Zoonotický potenciál kryptosporidií přenášených ježky

Zoonotický potenciál *Cryptosporidium erinacei* není dosud plně prozkoumán, nicméně byl zjištěn výskyt tohoto druhu u člověka v České Republice, hospitalizovaného z důvodu gastroenteritidy (Kváč a kol., 2014a). Jedinec netrpěl žádnou chorobou narušující imunitu a nebyl u něho prokázán výskyt žádné jiné bakteriální, virové nebo parazitární infekce (Kváč a kol., 2014a). Intenzita infekce, klinické příznaky a konzistence stolice jsou podobné dalším případům lidské kryptosporidiózy způsobené druhy *C. parum* a *C. tyzzeri* (Kváč a kol., 2014a). Dále byl výskyt *C. erinacei* potvrzen u arabských koní v Algerii (Laatamna a kol., 2013). Tento výskyt naznačuje, že hostitelská specifita tohoto druhu je větší než se předpokládalo. Zdroj infekce v obou případech není znám. Je možné, že tento druh může být přenášen přímo, pomocí infikovaných potravin a vody, nicméně nejsou žádné informace, které by potvrdily jeho způsob přenosu (Kváč a kol., 2014b). Jeden izolát *C. parvum* se zoonotickým potenciálem, přiřazený k subtypové rodině IIa (IIaA19G1R1), byl detekován u jedince ze záchranné stanice v Německu. Subtyp IIc donedávna považovaný za čistě antropogenní byl prvně detekován u ježků v Německu, z geograficky vzdálených záchranných stanic (Dyachenko a kol., 2005).

3. Cíle práce

- Zpracovat kriticky literární rešerši o tématu
- Pomocí molekulárních metod detekovat kryptosporidie ve vzorcích trusu ježků
- Popsat morfologii exogenních vývojových stádií kryptosporidií infikujících ježky
- Experimentálně ověřit infektivitu kryptosporidií infikujících ježky pro další hostitele

4. Materiál a metodika

4.1. Materiál

Vzorky trusu ježků byly sbírány v letech 2010 až 2011 a pocházely od juvenilních i dospělých ježků. Celkem bylo odebráno 405 vzorků od 15 domácích i dovokých zvířat, která byla hospitalizována z několika lokalit v Brně. Vzorky trusu byly uchovány v plastových nádobách v 2,5% dichromanu draselném při teplotě 4–6 °C.

4.2. Detekce kryptosporidií v trusu

Všechny odebrané vzorky byly mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu pomocí koncentračních a barvicích metod.

4.2.1. Barvení oocyst kryptosporidií anilin-methyl-violetí (Miláček et Vítovec 1985)

Použité roztoky:

Roztok anilin-karbol-methyl-violetí

0,6 g methyl violeti

1 ml anilinu

1 g fenolu

30 ml 96% alkoholu

70 ml deionizované vody

Roztok tartrazinu

1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

Kyselina sírová

2% kyselina sírová

Pracovní postup:

1. vzorek trusu natřít na podložní sklo, fixovat methanolem v plameni
2. barvit roztokem methylvioleti po dobu 30 minut
3. opláchnout proudem vody
4. nátěr diferencovat v kyselině sírové po dobu 1–2 minuty

5. opláchnout proudem vody
6. dobarvit tartrazinem po dobu 1–2 minuty
7. opláchnout proudem vody, nechat zaschnout

Vzorky byly prohlíženy světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Oocysty mají růžovou až fialovou barvu, pozadí se barví do zelena.

4.2.2. Koncentrační metoda

Je založena na principu použití flotačních roztoků, které mají vyšší specifickou hmotnost než běžné parazitické útvary. Při zpracování vzorku se oocysty kryptosporidií vyflotují a zkoncentrují se v povrchové blance.

Použitý roztok:

Sheaterův roztok: 259 ml vody; 405 g cukru; 7,29 g fenolu

Pracovní postup:

1. vzorek trusu o hmotnosti cca 1 g zhomogenizovat s vodou
2. zhomogenizovaný vzorek přecedit přes buničinu do 10 ml zkumavky
3. centrifugovat 5 minut při 1350 g
4. slít supernatant, aby na dně zkumavky zůstal sediment
5. do zkumavky se sedimentem přidat cca 2 ml Sheatherova roztoku a homogenizovat
6. doplnit zkumavku Sheatherovým roztokem 1 cm pod okraj
7. centrifugovat 5 minut při 1350 g
8. pomocí kličky odebrat ze zkumavky povrchovou blanku a přenést na podložní sklíčko (alespoň 3×)
9. překrýt krycím sklíčkem bez vzniku vzduchových bublin
10. mikroskopicky vyšetřit při zvětšení 100 až 400×

4.3. Purifikace oocyst

Vzorek trusu pozitivní na přítomnost oocyst kryptosporidií byl rozmělněn v třecí misce a převeden přes síto do 10 ml zkumavky a centrifugován při 1350 g po dobu 20 minut a supernatant odsán. Následně byl sediment obsahující oocysty kryptosporidií přečištěn na

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

4.3.1. Sacharózový gradient (Arrowood a Sterling, 1987)

Použité roztoky:

Sheaterův roztok: 259 ml vody; 405 g cukru; 7,29 g fenolu

1% PBS Tween: do 1 l PBS přidat 0,5 ml Tween 20

pracovní Sheaterovy roztoky: 1+2 (1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly PBS Tween)
 1+4 (1 díl Sheaterova roztoku + 4 díly PBS Tween)

Pracovní postup:

1. vzorek trusu homogenizovat ve třecí misce a přecedit přes sítko
2. navrstvit sacharózový gradient 30 ml roztoku 1 + 2; 30 ml roztoku 1 + 4; 15 ml vzorku
3. centrifugovat 30 minut při 1370 g
4. odsát supernatant do čisté zkumavky
5. doplnit objem deionizovanou vodou
6. centrifugovat 20 minut při 1370 g
7. odsát vodní vývěvou polovinu supernatatu a doplnit objem deionizovanou vodou
8. krok 6 a 7 opakovat 3×
9. purifikované oocysty kryptosporidií (sediment) uchovávat ve tmě při 4 °C

4.3.2. Cesium-chloridový gradient (Arrowood a Donaldson, 1996)

Použité roztoky:

CsCl cesium chloridový roztok: 21,07 g CsCl + 100 ml destilované vody

PBS: 0,025 M PBS; pH=7,2

Pracovní postup:

1. oocysty přečištěné na sacharózovém gradientu centrifugovat 10 minut při 1450 g
2. sediment rozmíchat v PBS
3. do 2 ml zkumavky napipetovat 1ml CsCl a převrstvit 0,5 ml suspenzí oocyst v PBS
4. centrifugovat 3 minuty při 16 000 g
5. na rozhraní CsCl a PBS jsou koncentrovány oocysty
6. odebrat prstenec obsahující oocysty do čisté zkumavky, naředit PBS

7. centrifugovat 3 minuty při 16 000 g
8. odebrat supernatant a pelet rozmíchat v PBS
9. centrifugovat 3 minuty při 16 000 g
10. odebrat supernatant, pelet rozmíchat s asi 200 μ l PBS
11. oocysty uchovávat při 4 °C v PBS

4.4. Morfometrická analýza oocyst

Pro morfologickou analýzu byly použity oocysty získané z pěti přirozeně infikovaných ježků. Vzorky trusu ježků byly purifikované pomocí sacharóзовého a následně cesium chloridového gradientu. Z každého vzorku bylo změřeno 50 oocyst. Oocysty byly vždy změřeny v nativním stavu (diferenciální interferenční kontrast). U každé oocysty byla změřena délka a šířka a byl vypočten index tvaru. Pro morfologickou analýzu byla použita digitální analýza obrazu, software M.I.S. QuickPHOTO Pro, fotoaparát Olympus Camedia C-5060WIDEZOOM, 5.1 megapixelů a mikroskop Olympus IX 70.

4.5. Molekulární analýza

Všechny vzorky, mikroskopicky pozitivní i negativní, byly vyšetřeny na přítomnost specifické DNA kryptosporidií pomocí nested PCR. Molekulární analýzy byla provedena pro všechny izoláty v triplikátu.

4.5.1. Izolace DNA

Extrakce DNA z trusu byla prováděna pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex).

Pracovní postup:

1. do mikrozkušavek (Safe Lock Tube; 2,5 ml) přidat asi 200 mg trusu, skleněné kuličky (\emptyset 0,5 mm)
2. přidat 1,2 ml Lysis Buffer P, zvortexovat
3. provést rozbíjení oocyst pomocí homogenizátoru (FASTPREP®-24 Instrument MP Biomedicals, Solon, OH, USA) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s
4. další kroky byly provedeny dle návodu poskytnutého výrobcem

4.5.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro identifikaci kryptosporidií ve vzorcích byla použita metoda nested PCR za použití rodově specifických primerů amplifikujících variabilní úsek genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) a gen kódující protein stěny oocysty kryptosporidií (COWP). Gen kódující 60 kDa glykoprotein (GP60) byl použit pro určení subtypu kryptosporidií (Jiang a kol. 2005; Alves a kol., 2003; Spano a kol., 1997). Objem reakční směsi pro jednotlivé polymerázové reakce byl 20 μ l (viz. Tab. 3, 4 a 5).

Chemikálie:

- deoxyribonukleosid trifosfáty (200 μ M dNTP's, 10 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- 10 \times koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- Taq purple DNA polymeráza (1 U/ μ l, Top-Bio, ČR)
- PCR H₂O (Top-Bio, ČR)
- MgCl₂ (25 mM, Top-Bio, ČR)
- bovinní sérový albumin (BSA 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, ČR)

Primery pro amplifikaci SSU rRNA

- Primární primery:

F 5'- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG -3

R 5'- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA -3'

- Sekundární primery:

F5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG -3'

R5'- CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A -3'

Primery pro amplifikaci GP60

- Primární primery:

F 5'- ATA GTC TCC GCT GTA TTC -3

R 5'- GGA AGG AAC GAT GTA TCT -3'

- Sekundární primery:

F5'- TCC GCT GTA TTC TCA GCC -3'

R5'- GCA GAG GAA CCA GCA TC -3'

Primery pro amplifikaci COWP

- primární primery:

F 5' - CGC ACC TGT TCC CAC TCA ATG TAA ACC C -3'

R 5' - ACC GCT TCT CAA CAA CCA TCT TGT CCT C -3'

- sekundární primery:

F 5' - GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G -3'

R 5' - GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G -3'

Tab. 3: Reakční směs pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA)

Primární reakce 55°C			Sekundární reakce 55°C		
chemikálie	koncentrace	objem (μl)	chemikálie	koncentrace	objem (μl)
H ₂ O	-----	12,30	H ₂ O	-----	13,10
MgCl ₂	(25 mM)	1,20	MgCl ₂	(25 mM)	1,20
10Xbuffer	-----	2,00	10Xbuffer	-----	2,00
dNTP	10 mM	0,40	dNTP	10 mM	0,40
forward	10 μM	0,40	forward	10 μM	0,40
reverse	10 μM	0,40	reverse	10 μM	0,40
BSA	(10 mg/ml)	0,80	-----	-----	
taq	(1U/1μl)	0,50	taq	(1U/1μl)	0,50
DNA	-----	2,00	DNA	-----	2,00
celkem	-----	20,00	celkem	-----	20,00

Tab. 4: Reakční směs pro amplifikaci části genu kódujícího 60 kDa glykoprotein (gp60)

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

Tab. 5: Reakční směs pro amplifikaci části genu kódujícího protein stěny oocysty kryptosporidií (COWP).

Primární reakce 65°C			Sekundární reakce 55°C		
chemikálie	koncentrace	objem (μl)	chemikálie	koncentrace	objem (μl)
H ₂ O	-----	10,66	H ₂ O	-----	10,26
MgCl ₂	(25 mM)	1,20	MgCl ₂	(25 mM)	1,20
10Xbuffer	-----	2,00	10Xbuffer	-----	2,00
dNTP	10 mM	0,50	dNTP	10 mM	0,50
forward	10 μM	0,72	forward	10 μM	0,72
reverse	10 μM	0,72	reverse	10 μM	0,72
BSA	(10 mg/ml)	0,40	-----	(10 mg/ml)	0,40
taq	(1U/1μl)	0,80	taq	(1U/1μl)	0,80
DNA	-----	3,00	DNA	-----	3,00
celkem	-----	20,00	celkem	-----	20,00

Jako pozitivní kontroly byly použity DNA *C. serpentis* a *C. hominis*. Sekundární reakční směs se lišila množstvím PCR vody, nepřidáním BSA a jako templát pro sekundární reakci byl použit amplifikát primární reakce. Všechny PCR protokoly zahrnovaly počáteční denaturaci 94 °C po dobu 3 minut a 35 cyklů skládajících se z 94 °C po dobu 45 s, specifické nasedací teploty (uvedeny v tabulkách 5, 6, 7) po dobu 45 s, 72 °C po dobu 60 s a finálním dosyntetizováním řetězců při 72 °C po dobu 10 minut.

4.5.3. Gelová elektroforéza

Velikost PCR fragmentů byla zjišťována gelovou elektroforézou.

Chemikálie:

- 50× TAE pufr: 242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA
- agaróza (Biotech, ČR)
- ethidium bromid (Sigma-Aldrich, ČR)
- 100 bp DNA Ladder (Biogen, ČR)

Pracovní postup:

1. smíchat agarózu s 1× TAE pufr (pro 1% gel smíchat 0,4 g agarózy se 40 ml 1× TAE pufru)
2. nechat agarózu rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou na teplotu přibližně 50 °C

3. přidat 3 μ l ethidium bromidu a promíchat
4. do předem připravené formy nalít gel, vložit hřeben a nechat ztuhnout
5. gel vložit do elektroforetické vany naplněné 1 \times TAE pufrem, do vzniklých jamek nanést 20 μ l PCR sekundárního produktu a 2 \times 10 μ l ladderu
6. nastavit napětí na 70 V a vyvíjet dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA
7. výsledný produkt detekovat pomocí UV transluminátoru (320 nm)

4.5.4. Příprava vzorků na sekvenaci

Extrakce z gelu byla prováděna pomocí komerčně dodávaného kitu Extraction QIAquick Gel Kit (Qiagen, Germany).

Pracovní postup:

1. fragment DNA opatrně vyříznout skalpelem z gelu a vložen do čisté mikrozkušavky
2. do mikrozkušavky připipetovat 400 μ l QG pufru a inkubovat při 50 °C po dobu 10 minut v termobloku
3. veškerý objem přepipetovat na kolonu a centrifugovat minutu při 16 000 g
4. odpad ze sběrné zkumavky vylít a opět použít s kolonou
5. na kolonu přidat 500 μ l OQ pufru a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g
6. odpad ze sběrné zkumavky vylít a opět použít s kolonou
7. na kolonu připipetovat 750 μ l PE pufru, inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě a mikrozkušavku centrifugovat minutu při 16 000 g
8. opět vylít odpad ze sběrné zkumavky a centrifugovat minutu při 16 000 g.
9. kolonu přemístit do nové 1,5 ml mikrozkušavky a přidat 30 μ l EB pufru na střed kolony.
10. po inkubaci 1 minutu při laboratorní teplotě je DNA extrahována z kolony centrifugací 1 minutu při 16 000 g
11. získaná DNA je vysušena ve vakuovém evaporizátoru a uskladněna při 4 °C.

4.5.5. Sekvence vzorků

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány za použití sekundárních primerů. K přípravě vzorků k sekvenaci byl použit ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

Sekvence byly upraveny v programu ChromasPro (Technelysium, Queensland, Australia). Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank programem ClustalX.

4.6. Experimentální infekce

Izoláty získané z pěti ježků byly použity k infekci 5 dospělých SCID myší (jedna myš na každý izolát). Zvířata byla infikována perorálně podáním 200 μ l suspenze s obsahem 1×10^5 životaschopných oocyst a denně individuálně vyšetřována na přítomnost oocyst kryptosporidii (viz metoda 4.2.1.) po dobu 20 dnů.

Počítání koncentrace oocyst pro infekční dávku

Pracovní postup:

1. do Bürkerovy komůrky přidat suspenzi s oocystami
2. komůrku prohlížet světelným mikroskopem (Olympus BX 51) při zvětšení 400 \times
3. oocysty spočítat v 25 různých čtvercích
4. Konečnou koncentraci oocyst v 1 ml suspenze stanovit součtem všech oocyst v 25 čtvercích vynásobených 10^4 .

5. Výsledky

5.1 Prevalence kryptosporidií

Byl sledován průběh infekce ježků po dobu několika měsíců. Celkem bylo vyšetřeno 405 vzorků trusu od 15 ježků. Všechny vzorky byly nejprve mikroskopicky vyhodnoceny na přítomnost oocyst kryptosporidií. Z celkového počtu 405 vyšetřených vzorků od 15 jedinců bylo 69 vzorků od 11 jedinců mikroskopicky pozitivních. Kumulativní pozorovaná prevalence byla tedy 73,3 %. Pomocí molekulárních metod bylo detekováno celkem 81 vzorků trusu od 11 jedinců pozitivních na kryptosporidie. U žádného ze čtyř mikroskopicky negativních ježků nebyla molekulárními metodami prokázána přítomnost specifické kryptosporidiové DNA. Hodnoty prevalence jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 6: Frekvence výskytu oocyst kryptosporidií v trusu u jednotlivých jedinců na základě mikroskopické a molekulární analýzy

Jedinec	Počet vyšetřených vzorků	Počet mikroskopicky pozitivních vzorků	Počet PCR pozitivních vzorků
ježek 1	23	10 (43,5 %)	9 (39,1 %)
ježek 2	25	6 (24,0 %)	7 (28,0 %)
ježek 3	24	9 (37,5 %)	13 (54,2 %)
ježek 4	25	10 (40,0 %)	11 (44,0 %)
ježek 5	23	8 (34,8 %)	8 (34,8 %)
ježek 6	22	7 (31,8 %)	5 (22,7 %)
ježek 7	25	4 (16,0 %)	6 (24,0 %)
ježek 8	23	0	0
ježek 9	21	0	0
ježek 10	25	0	0
ježek 11	22	0	0
ježek 12	25	3 (12,0 %)	6 (24,0 %)
ježek 13	25	4 (16,0 %)	7 (28,0 %)
ježek 14	19	5 (26,3 %)	4 (21,1 %)
ježek 15	22	3 (13,6 %)	5 (22,7 %)
celkem	405	17 %	20%

5.2. Molekulární analýza

Molekulární analýza byla provedena pro všechny izoláty jednotlivých ježků v triplikátu. Metoda PCR pro 18S ribosomální RNA a COWP gen určila kryptosporidie všech 11 pozitivních ježků v triplikátu jako druh *C. parvum*. Suptypizace pomocí GP60 ukázala přítomnost dvou genotypů *C. parvum*. První genotyp IId byl nalezen u všech 11 ježků, u tří jedinců (ježek 2, ježek 3 a ježek 12) byl nalezen nový genotyp označovaný jako XIIIa neboli *Cryptosporidium erinacei*, kryptosporidie specializovaná na ježky. Přehled genotypů pro jednotlivé ježky je uveden v tabulce 7. U zmíněných tří jedinců byla prokázána smíšená infekce s *C. parvum* IId genotypem.

Tab. 7: Genotypy nalezené u jednotlivých ježků

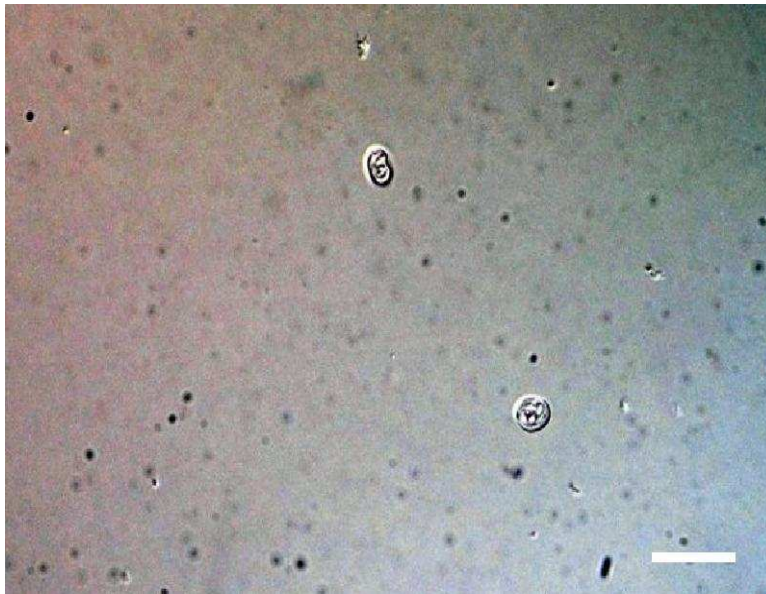
Jedinci	SSU, COWP	GP60
ježek 1	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIdA18G1
ježek 2	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIdA18G1 <i>C. eriancei</i> XIIIaA24R8
ježek 3	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIdA18G1 <i>C. eriancei</i> XIIIaA24R8
ježek 4	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIdA18G1
ježek 5	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIdA18G1
ježek 6	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIdA18G1
ježek 7	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIdA18G1
ježek 12	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIdA18G1 <i>C. eriancei</i> XIIIaA24R8
ježek 13	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIdA18G1
ježek 14	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIdA18G1
ježek 15	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIdA18G1

5.3. Morfometrická analýza oocyst

Veškeré naměřené hodnoty šířky a délky oocyst v nativním stavu byly vyhodnoceny na základě vypočítaných průměrných délek a šířek jednotlivých oocyst. Byl vypočten index tvaru pro oba izoláty uvedený v tabulce 8.

Tab. 8: Morfometrie oocyst *Cryptosporidium* spp. u jednotlivých jedinců

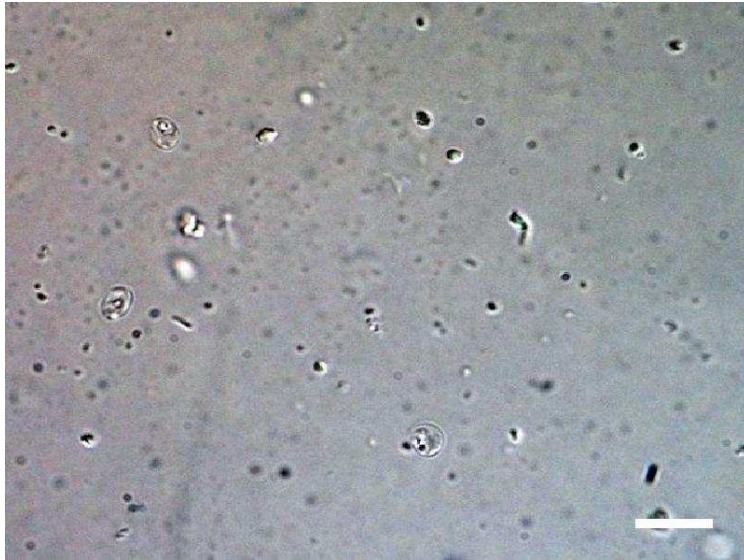
Jedinci	Délka (μm)	Šířka (μm)	Index tvaru
ježek 6	$4,77 \pm 0,48$	$3,82 \pm 0,41$	1,26
ježek 15	$4,83 \pm 0,46$	$3,92 \pm 0,50$	1,22
ježek 2	$4,86 \pm 0,48$	$3,96 \pm 0,52$	1,24
ježek 3	$4,66 \pm 0,45$	$3,90 \pm 0,48$	1,21
ježek 12	$4,68 \pm 0,43$	$3,83 \pm 0,43$	1,20



Obr. II: Oocysty *Cryptosporidium* spp. v diferenciálním interferenčním kontrastu, ježek 2. Měřítko = 10 μ m



Obr. III: Oocysty *Cryptosporidium* spp. v diferenciálním interferenčním kontrastu, ježek 6. Měřítko = 10 μ m



Obr. IV: Oocysty *Cryptosporidium* spp. v diferenciálním interferenčním kontrastu, ježek 12. Měřítko = 10 μ m



Obr. V: Oocysty *Cryptosporidium* spp. v diferenciálním interferenčním kontrastu, ježek 3. Měřítko = 10 μ m

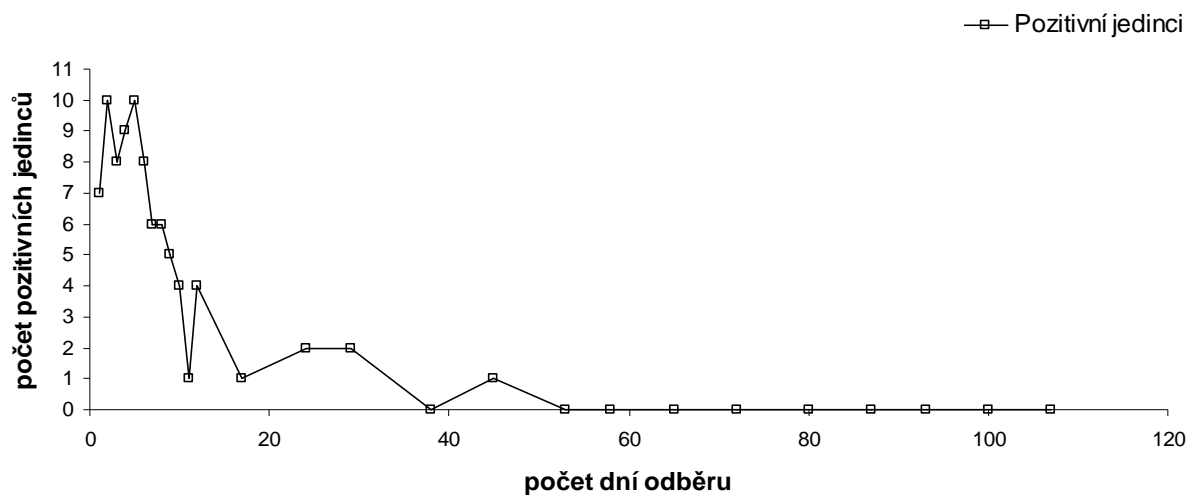
5.4. Klinické příznaky

Výrazné klinické příznaky se projevily u mladých ježků 12, 13, 14 a 15, kteří byli hospitalizováni s výrazně zápachajícím průjmem, slabostí, a dehydratací. U mladých jedinců (ježek 2, 3, 4, 5, 6 a 7) se občasně vyskytoval měkký trus, což mohlo být v důsledku onemocnění nebo krmením tekutou stravou. U dospělých jedinců (ježek 9, 10 a 11) a mladých ježků 1 a 8 nebyly zaznamenány žádné klinické příznaky kryptosporidiózy. U více než poloviny infikovaných zvířat bylo zaznamenáno nechutenství. Záznam všech pozorovaných klinických příznaků je uveden v tabulce 9.

Tab. 9: Klinické příznaky u ježků infikovaných *Cryptosporidium* spp.

Jedinci	Symptomy	stáří
ježek 1	–	nalezený, 3,5 měsíce
ježek 2	měkký trus	nalezený, 5 měsíců
ježek 3	měkký trus	nalezený, 5 měsíců
ježek 4	měkký trus	nalezený, 5 měsíců
ježek 5	měkký trus	nalezený, 4 měsíce
ježek 6	nechutenství, měkký trus	nalezený, 4 měsíce
ježek 7	nechutenství, měkký trus	nalezený, 4 měsíce
ježek 8	–	nalezený, 3,5 měsíce
ježek 9	–	nalezený, 2,3 roky
ježek 10	–	nalezený, 1,4 roky
ježek 11	–	stáří cca 7 let, 2,5 roku izolace od ostatních ježků
ježek 12	nechutenství, průjem, dehydratace, slabost	nalezený, 5 měsíců
ježek 13	nechutenství, průjem, dehydratace, slabost	nalezený, 5 měsíců
ježek 14	nechutenství, průjem, dehydratace, slabost	nalezený, 4 měsíce
ježek 15	nechutenství, průjem, dehydratace, slabost	nalezený, 4 měsíce

Mladí ježci, kteří byli hospitalizováni na základě závažných průjmů a dehydratace byli mikroskopicky i molekulárně pozitivní. Vnímavost jedince ke kryptosporidiální infekci by mohla souviset se stářím ježka. Infikovaní jedinci v prvních dnech hospitalizace vykazovali přítomnost kryptosporidií na základě molekulární i mikroskopické analýzy, po sedmnáctidenním intervalu se výskyt kryptosporidií u většiny jedinců snížil a po 53 dnech od prvního odběru byly všichni jedinci negativní (viz. Obr. VI).



Obr. VI: Počet infikovaných jedinců v průběhu sledování

5.5. Experimentální infekce

Žádná ze SCID myši inokulovaná suspenzí oocyst nebyla k infekci vnímavá. V průběhu 20 dnů nebyly v trusu detekovány žádné oocysty ani specifická kryptosporidiová DNA. Žádná z inokulovaných myši nevykazovala žádné klinické příznaky.

6. Diskuse

V naší práci byla zjištěna 73,3% kumulativní prevalence, což odpovídá vysokému stupni parazitární infekce u ježků celkově (Lowenstein a kol., 1991; Pantchev a kol., 2005). Prevalence této infekce u ježků byla popsána pouze v Německu a odpovídá 29,8%, což se liší od našich výsledků (Dyachenko a kol., 2009). V této práci byli všichni pozitivní jedinci staří pouze několik měsíců, což odpovídá výsledkům publikovaným v Německu, kdy 39,5% pozitivních vorků pocházelo od volně žijících mláďat, a pouze 14,8% pozitivních vzorků bylo od dospělých ježků pobývajících v záchanné stanici již několik měsíců (Dyachenko a kol., 2009). Vysoká prevalence v této práci mohla být způsobena těsným kontaktem zvířat, jejich juvenilitou, případně nízkou tělesnou hmotností. Naše výsledky odpovídají vysoké kumulativní prevalenci kryptosporidií například u telat ve Spojených Státech, kde kumulativní prevalence dosahovala 100% (Fayer a kol., 2006), dále u hříbat ze Spojených Států s kumulativní prevalencí 71% (Xiao a kol., 1994). Prevalence kryptosporidií u psů z Norska dosahovala 44,1% (Hamnes a kol., 2007) a u prasat ve Španělsku 21,9%.

Oocysty kryptosporidií získaných z námi sledovaných ježků o rozměrech 4,9–4,7 μm (průměr = 4,8 μm) \times 4,0–3,8 μm (průměr = 3,9 μm) jsou morfologicky neodlišitelné od oocyst *C. erinacei* získané z přirozeně infikovaných ježků o rozměrech (4,9 \times 4,4 μm) a mají nepatrně menší velikost než oocysty *C. parvum* (5,3 \times 4,7 μm), podobají se velikostí i tvarem (Kváč a kol., 2014b). Na základě zhodnocení výsledků velikosti oocyst získaných z přirozeně infikovaných ježků nelze říci, zda se jednalo o oocysty druhu *C. parvum* nebo *C. erinacei*.

Cryptosporidium erinacei se zdá být pro ježky specifický. Kromě případu infekce u člověka v České Republice a případu infekce u arabských koní v Algerii (Laatamna a kol., 2013; Kváč a kol., 2014a), byla přirozená infekce *C. erinacei* zaznamenána pouze u ježků. Nicméně patogenita pro ježky u tohoto druhu kryptosporidie nebyla zaznamenána. Ačkoliv byly popsány případy průjmového onemocnění u kryptosporidium pozitivních ježků (Graczyk a kol., 1998; Meredith a Milne, 2009), druhy nebo genotypy kryptosporidií způsobující průjmy však nebyly identifikovány. Podobně jako u jiných druhů kryptosporidií specifických pro určitého hostitele, jako jsou *C. suis* a *C. scrofarum* pro prasata, *C. tyzzeri* pro myši a *C. ryanae* pro skot, infekce *C. erinacei* nezpůsobuje u ježků výraznější klinické příznaky (Fayer a kol., 2008; Kváč a kol., 2013; Ren a kol., 2012). Infekce je dále charakteristická malým uvolňováním oocyst (Kváč a kol., 2014b). Koně infikované *C. erinacei* taktéž nevykazovaly žádné klinické příznaky (Laatamna et al., 2013). Přibližně 30% ježků infikovaných současně

druhem *C. erinacei* a *C. parvum* trpělo průjmovým onemocněním (Dyachenko a kol., 2010), což naznačuje, že *C. erinacei* může v určitých podmínkách být pro ježky patogenní. Nicméně nevíme, zda byl průjem vyvolán infekcí samotnou *C. parvum* nebo jestli k jeho vypuknutí bylo třeba smíšené infekce s *C. erinacei*. V námi sledovaných případech byly detekovány klinické příznaky kryptosporidiózy (dehydratace, průjem) jak u jedinců s monoinfekcí *C. parvum*, tak i u ježků se smíšenou infekcí *C. parvum* a *C. erinacei*. Na základě výsledků předchozích studií soudíme, že za klinické příznaky ježků je spíše zodpovědný druh *C. parvum*. Podle předchozí studie (Dyachenko a kol., 2010) by věk sledovaných zvířat mohl souviset s jejich vnímavostí ke kryptosporidiové infekci. Přestože všichni dospělí jedinci v této práci byli negativní, nelze z našich výsledků vyvozovat žádný závěr o věkové specificitě *C. erinacei*. Navíc nejsou k dispozici žádné údaje o předchozím vystavení dospělých zvířat infekci kryptosporidii.

V této práci byly u sledovaných ježků nalezeny dva druhy kryptosporidií: *C. parvum* IIdA18G1 a *C. erinacei* XIIIaA24R8.

Subtyp *C. parvum* IIdA18G1 byl u ježka nalezen poprvé. V předešlých studiích byly u ježků nalezeny dvě jiné subtypové rodiny *C. parvum* (Dyachenko a kol., 2009). Subtypová rodina IIa (IIaA19G1R1) se silným zoonotickým potenciálem a IIc subtypová rodina (IIcA5G3), která byla považována za čistě lidský subtyp *C. parvum*, a nikdy předtím nebyla vyizolována z jiného druhu (Dyachenko a kol., 2009). Subtyp IIdA18G1, nalezený v této práci, byl dále detekován u jehňat chovaných na farmách severovýchodního Španělska v roce 2008, dále u člověka ve Velké Británii v roce 2011 a u dětí v Kuwaitu v roce 2005 (Sulaiman a kol., 2005; Quiñez a kol., 2008; Chalmers a kol., 2011). V případě ovcí byli všichni pozitivní jedinci mláďata stará několik dní, trpící průjmovým onemocněním, z čehož vyplývá, že tento subtyp je pro ovce patogenní (Quiñez a kol., 2008). Subtyp IIdA18G1 byl také popsán jako příčina gastroenteritidy u dětí, většina dětí trpěla průjmy, u některých se objevily bolesti břicha a zvracení. Ojedinele infekce horních dýchacích cest (Sulaiman a kol., 2005). V případě tohoto subtypu nebyla potvrzena souvislost infekce s věkem nebo pohlavím člověka, všichni pacienti trpěli průjmovým onemocněním (Sulaiman a kol., 2005). Nákaza člověka subtypem IIa, je mnohem více podmíněna návštěvou farmy, kontaktem s hospodářskými zvířaty, nebo s jejich výkaly, než nákaza subtypem IId. Zoonotický potenciál je tedy vyšší u subtypové rodiny IIa (Sulaiman a kol., 2005). Nicméně *C. parvum* IId je adaptovaná na ovce a kozy, které tak mohou být nejdůležitějším zoonotickým zdrojem infekce pro člověka (Sulaiman a kol., 2005; Quiñez a kol., 2008; Chalmers a kol., 2011).

U všech námi studovaných ježků infikovaných *C. eriancei* byl podle dříve popsané nomenklatury pro označování alelický rodin genu kódujícího 60 kDa glykoprotein kryptosporidií (Sulaiman a kol. 2005) detekován nový subtyp XIIIa A24R8. V předešlých studiích u ježků ze záchraných stanic Německa byly nalezeny subtypy A21R10 (GQ214085), A22R9 (KC305644), A19R12 (GQ214081) a A22R11 (GQ259140) (Dyachenko a kol., 2009). U arabských koní v Algerii byl nalezen subtyp *C. eriancei* A22R9 (Laatamna a kol., 2013).

Subtyp *Cryptosporidium parvum* IIa, zmiňovaný u ježků ze záchraných stanic Německa (Dyachenko a kol., 2009) a subtyp IId, nalezený u ježků v této práci, patří k zoonotické subtypové rodině. Cesta přenosu na člověka se nejčastěji uskutečňuje kontaktem s hospodářskými zvířaty. Ve městech, kde je styk s hospodářskými zvířaty minimální, nabývají důležitosti jiné způsoby přenosu, jako konzumace kontaminovaných potravin nebo vody. Dále je možné, že některé ze subtypů, řazených k zoonotickým, se šíří v lidské populaci bez kontaktu se zvířecím hostitelem (Sulaiman a kol., 2005).

Subtyp IId dominuje v zemích středního východu a subtyp IIa je celosvětově nejčetnější subtyp *C. parvum* a druhým nejčastěji detekovaným subtypem způsobující infekce člověka (Jex a Gasser, 2010). Převládá u skotu a je zaznamenán v mnoha zemích po celém světě včetně Austrálie, Kanady, Anglie, Maďarska, Íránu, Irska, Nového Zélandu, Portugalska a USA (Ng a kol., 2008; O'Brien a kol., 2008; Trotz-Williams a kol., 2006; Brook a kol., 2009; Plutzer a Karanis, 2007; Nazemalhosseini-Mojarad a kol., 2011; Thompson a kol., 2007; Grinberg a kol., 2008; Alves a kol., 2006; Peng a kol., 2003).

Subtypová rodina IIc byla donedávna považována za původce lidské kryptosporidiové infekce, která se šíří mezi lidmi bez podílu zvířecích hostitelů (Xiao a Fayer, 2008). Přirozené lidské infekce vyvolané *C. parvum* IIc byly popsány v Evropě, Austrálii, jižní a severní Americe a Asii (Weilinga a kol., 2008; Xiao a Fayer, 2008). Tento subtyp byl prvně detekován u ježků v Německu, z geograficky vzdálených záchraných stanic, což naznačuje, že mezi ježky probíhá cyklus přenosu tohoto subtypu (Dyachenko a kol., 2005). Nicméně není jasné, zda ježek přímo přispívá k IIc transmisnímu cyklu *C. parvum* nebo je jeho infekce důsledkem kontaminace prostředí oocystami, pocházejícími od člověka.

Způsob přenosu *C. eriancei* nebyl dosud určen. Divoká zvířata nepředstavují vážnou hrozbu pro lidské zdraví, nicméně relativně častý výskyt kryptosporidiových infekcí u juvenilních ježků postižených průjmami, by mohl představovat riziko přenosu infekce na člověka. Zvláště pro lidi, kteří přicházejí často do kontaktu s postiženými ježky, ať už jsou to ošetřovatelé v záchraných stanicích nebo lidé, kteří ježka chovají jako domácího mazlíčka.

7. Seznam použité literatury:

Akiyoshi D.E., Feng X., Buckholt M.A., Widmer G., Tzipori S., (2002): Genetic analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passaged through different host species. *Infect. Immun.* 70, 5670-5675.

Alves M., Xiao L., Antunes F., Matos O., (2006): Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol. Res.* 99, 287-292.

Alves M., Xiao M., Sulaiman I., Lal A., Matos O., Antunes F., (2003): Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2744-2747.

Anděra M., (2000): Atlas rozšíření savců v České republice, verze III Hmyzožravci (Insectivora). Národní muzeum Praha. 56-57.

Awad-el-Kariem F.M., (1999): Does *Cryptosporidium parvum* have a clonal population structure? *Parasitol. Today.* 15, 502-504.

Carreno R.A., Martin D.S., Barta J.R., (1999): *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85, 899-904.

Chalmers R., Smith R., Hadfield S., Giles K., (2011): Zoonotic linkage and variation in *Cryptosporidium parvum* from patients in the United Kingdom. *Parasitol. Res.*, 108, 1321-1325.

Chalmers R., Robinson G., Elwin K., Hadfield S.J., Xiao L., Ryan U., Modha D. Mallaghan C. (2009): *Cryptosporidium* sp. rabbit genotype, a newly identified human pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 829-830.

Current W.L., Garcia L.S., (1991): *Cryptosporidiosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 325-358.

Ditrich O., Kváč M., Květoňová D., Sak B., Brůčková P., Kociánová J., Ryvolová K., Rousková L. (2010): Role vodních bezobratlých při odstraňování oocyst kryptosporidií z vody. Sborník konference Pitná voda 2010. Jihočeská universita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 37005 České Budějovice. p. 71-74.

Dungel J., Gaisler J., (2002): Atlas savců České a Slovenské republiky. Academia, Praha. 116.

Dyachenko V., Kuhnert Y., Schmaeschke R., Etzold M., Pantchev N., Dauschies A., (2009): Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. genotypes in European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Germany. Parasitology. 137, 205-216.

Egyed Z., Sréter T., Széll Z., Varga I., (2003): Characterization of *Cryptosporidium* spp.- recent developments and future needs. Vet. Parasitol. 111, 103-114.

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.

Enemark H.L., Ahrens P., Juel C.D., Petersen E., Petersen R.F., Andersen J.S., Lind P., Thamsborg S.M., (2002): Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. Parasitology. 125, 331-341.

Enemark H.L., Ahrens P., Bille-Hansen V., Heegaard P.M., Vigre H., Thamsborg S.M., Lind P., (2003): *Cryptosporidium parvum*, infectivity and pathogenicity of the “porcine” genotype. Parasitology 126, 407-416.

Fall A., Thompson R.C., Hobbs R.P., Morgan-Ryan U., (2003): Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. J. Parasitol. 89, 399-402.

Farthing M., (2000): Clinical aspects of human cryptosporidiosis. Contrib. Microbiol. 6, 50-74.

Fayer R., (2004): *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 126, 37-56.

Fayer R., Santín M., Xiao L., (2005): *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). J. Parasitol. 91, 624-629.

Fayer R., Morgan U., Upton S.J., (2000): Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. J. Parasitol. 30, 1305-1322.

Fayer R., Santín M., Macarisin D., (2010): *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. Vet. Parasitol. 172, 23-32.

Fayer R., (2010): Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp. Parasitol. 124, 90-97.

Fayer R., Santín M., (2009): *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). Vet. Parasitol. 164, 192-200.

Fayer R., Santin M., Trout J.M., (2008): *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). Vet. Parasitol. 156, 191-198.

Fayer R., Xiao L., (2007): *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press. 560.

Fayer R., Ungar B.L.P., (1986): *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. Microbiol. Rev. 50, 458-483.

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.

Fayer R., (1994): Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2732-2735.

Feng X., Rich S.M., Akiyoshi D., Tumwine J.K., Kekitiinwa A., Nabukeera N., Tzipori S., Widmer G., (2002): Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3344-3349.

Gomez-Bautista M., Ortega-Mora L., Tabares E., Lopes-Rodas V., Costas E., (2000): Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galoprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). Appl. Environ. Microbiol. 66, 1866-1870.

Graczyk T.K., (2008): Fish, amphibians, and reptiles. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 387-394.

Graczyk T.K., Fayer R., Lewis E.J., Trout J.M., Farley C.A., (1999): *Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. Parasitol. Res. 85, 518-521.

Graczyk T.K., Cranfield M.R., Duning C., Strandberg J.D., (1998): Fatal *Cryptosporidiosis* in a juvenile captive African hedgehog (*Altelatrix albiventris*). J. Parasitol. 84, 178-180.

Grinberg A., Learmonth J., Kwan E., Pomroy W., Lopez Villalobos N., Gibson I., Widmer G., (2008): Genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* causing foal diarrhea. J. Clin. Microbiol. 46, 2396-2398.

Hamnes I.S., Gjerde B.K., Robertson L.J., (2007): A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. Acta. Vet. Scan. 49, 22.

Hansen J.S., Ongerth J.E., (1991): Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. Appl. Environ. Microbiol. 57, 2790-2795.

Insulander M., Silverla C., Lebbad S., Karlsson L., Mattsson J., (2013): Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. Epidemiol. Infect. 141, 1009-1020.

Iseki M., Maekawa T., Moriya K., Uni S., Takada S., (1989): Infectivity of *Cryptosporidium muris* (Strain RN 66) in various laboratory animals. Parasitol. Res. 75, 218-222.

Iseki, M., 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. Jpn. J. Parasitol. 28, 285-307.

Jelínek J., Zicháček V., (2005): Biologie pro gymnázia. Nakladatelství Olomouc. 190.

Jex A.R., Gasser R.B., (2005): Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of "next generation" technologies--research review. Biotechnol. Adv. 28, 17-26.

Khalidi M., Torres J., Samsó B., Miquel J., Biche M., Benyettou M., Barech G., Benelkadi H.A., Ribas A., (2011): Endoparasites (helminths and coccidians) in the hedgehogs *Atelerix algirus* and *Paraechinus aethiopicus* from Algeria. African Zoology. 47, 48-54.

Kimbell L.M., Miller D.L., Chavez W., Altman N., (1999): Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium serpentis* in a wild-caught corn snake (*Elaphe guttata guttata*) and a five-species restriction fragment length polymorphism- based assay that can additionally discern *C. parvum* from *C. wrairi*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5345-5349.

Kváč M., Hofmannová L., Hlasková L., Kvetonová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B., (2014b): *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. Vet. Parasitol. 17, 9-17.

Kváč M., Saková K., Květoňová D., Kicia M., Wesolowska M., McEvoy J., Sak B., (2014a): Gastroenteritis caused by the *Cryptosporidium* hedgehog genotype in an immunocompetent man. J. Clin. Microbiol. 52, 347-349.

Kváč M., Kestránová M., Pinková M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B., (2013): *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). Vet. Parasitol. 191, 218-227.

Laatamna E., Wagnerova P., Květoňová D., Aissi M., Rost M., Kváč M., (2013): Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog genotype in Algeria. Vet. Parasitol. 197, 350-353.

Levine N.D., (1894): Taxonomy review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). J. Protozool. 31, 94-98.

Lindsay D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R., Blagburn B.L., (2000): *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. J. Eukaryot. Microbiol. 47, 91-95.

Lowenstein M., Prosl H., Loupal G., (1991): Parasitosen des Igels und deren Bekämpfung. WTM. 78, 127-135.

MacKenzie W.R., Hoxie N.J., Proctor M.E., Gradus M.S., Blair K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addiss D.G., Fox K.R., Rose J.B., Davis J.P., (1994): A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N. Engl. J. Med. 331, 161-167.

MacKenzie W.R., Kazmierczak J.J., Davis J.P., (1995): An outbreak of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool. *Epidemiol. Infect.* 115, 545-553.

Mathieu E., Levy D.A., Veverka F., Parrish M.K., Sarisky J., Shapiro N., Johnston S., Handzel T., Hightower A., Xiao L., Lee Y.M., York S., Arrowood M., Lee R., Jones J. L., (2004): Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 582-589.

Meredith A.L., (2009): Cryptosporidial infection in a captive european hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 40, 809-811.

Miláček P., Vítovec J., (1985): Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32-50.

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.

Monge R., Arias M. L., (1996): Presence of various pathogenic microorganisms in fresh vegetables in Costa Rica. *Arch. Latinoam. Nutr.* 46, 292-294.

Morgan U.M., Sargent K.D., Deplazes P., Forbes D.A., Spano F., Hertzberg H., Elliot A., Thompson R.C., (1998): Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology.* 117, 31-37.

Morgan U.M., Xiao L., Fayer R., Lal A.A., Thompson R.C., (1999): Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *Int. J. Parasitol.* 29, 1733-1751.

Morgan-Ryan U.M., Fall A., Ward L.A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R.A., Olson M., Lal A., Xiao L., (2002): *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. J. Eukaryot. Microbiol. 49, 433-440.

Mtambo M.M., Wright E., Nash A.S., Blewett D.A., (1996): Infectivity of a *Cryptosporidium* species isolated from a domestic cat (*Felis domestica*) in lambs and mice. Res. Vet. Sci. 60, 61-64.

Nagamani K., Pavuluri P.R.R., Gyaneshwari M., Prasanthi K., Rao M.I.S., Saxena N.K., (2007): Molecular characterisation of *Cryptosporidium*: An emerging parasite. Indian. J. Med. Microbiol. 25, 133-136.

Nazemalhosseini-Mojarad E., Haghghi A., Taghipour N., Keshavarz A., Mohebi S.R., Zali M.R., Xiao L., (2011): Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. Vet. Parasitol. 30, 250-252.

Ng J., Eastwood K., Durrheim D., Massey P., Walker B., Armson A., Ryan U., (2008): Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in rural New South Wales. Exp. Parasitol. 119, 192-195.

O'Brien E., McInnes L., Ryan U., (2008): *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. Exp. Parasitol. 118, 118-21.

O'Donoghue P., (1995): *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. Int. J. Parasitol. 25, 139-195.

Pantchev N., Globokar-Vrhovec M., Beck W., (2005): Endoparasitosen bei Kleinsäugetern aus privater Haltung und Igel. Labordiagnostische Befunde der koprologischen, serologischen und Urinuntersuchung (2002-2004). Tierärztliche Praxis. 33, 296-306.

Pavlásek I., (2005): První nález oocyst morfometricky podobných druhům *Cryptosporidium muris* a *C. andersoni* u kočky. Veterinářství. 55, 480-483.

Peng M.M., Wilson M.L., Holland R.E. Meshnick S.R., Lal A.A., Xiao L., (2003): Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. Parasitol. Res. 90, 175-180.

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.

Plutzer J., Karanis P., (2007): Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. Vet. Parasitol. 31, 357-362.

Quílez J., Sánchez-Acedo C., Clavel A., del Cacho E., López-Bernad F., (1996): Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). Vet. Parasitol. 2, 83-88.

Quílez J., Torres E., Chalmers R., Hadfield S., del Cacho E., Sa´nchez-Acedo C., (2008): *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. Appl. Environ. Microbiol. 74, 6026-6031.

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.

Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning C., Jian F., Wang R., Lv C., Wang Q., Arrowood M., Xiao L., (2012): *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). Exp. Parasitol. 130, 274-281.

Ruecker N.J., Braithwaite S.L., Topp E., Edge T., Lapen D.R., Wilkes G., Robertson W., Medeiros D., Sensen C.W., Neumann N.F., (2007): Tracking host sources of

Cryptosporidium spp. in raw water for improved health risk assessment. Appl. Environ. Microbiol. 73, 3945-3957.

Riley P.Y., Chomel B.B., (2005): Hedgehog zoonoses. Emerg. Infect. Dis. 11, 1-5.

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.

Simpson V.R., (2002): Wild animals as a reservoirs of infectious diseases. Vet. J. 163, 128-146.

Smith H.W., Nichols R.A.B., (2010): *Cryptosporidium*: Detection in water and food. Exp. Parasitol. 124, 61-79.

Smrž J., Horáček I., Švátora M., (2004): Biologie živočichů. F. Talián, Fortuna Praha. 187-188.

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.

Sréter T., Kovács G., da Silva A.J., Pieniazek N.J., Széll Z., Márialigeti K., Varga I., (2000): Morphologic, host specificity and molecular characterization of hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. Appl. Environ. Microbiol. 66, 735-738.

Sturdee A.P., Chalmer R.M., Bull S.A., (1999): Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. Vet. Parasitol. 80, 273-280.

Sulaiman I., Hira P., Zhou L., Al-Ali F., Al-Shelahi F., Shweiki H., Iqbal J., Khalid N., Xiao L. (2005): Unique Endemicity of Cryptosporidiosis in Children in Kuwait. J. Clin. microbiol. 43, 2805-2809.

Sulaiman I.M., Xiao L., Lal A.A., (1999): Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4431-4435.

Tappeh K.H., Gharavi M.J., Makhdoumi K., Rahbar M., Taghizadeh A. 2006. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. Infection in Renal Transplant and Hemodialysis Patients. Iranian. J. Publ. Health. 35, 54-57.

Thompson H.P., Dooley J.S., Kenny J., McCoy M., Lowery C.J., Moore J.E., Xiao L., (2007): Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. Parasitol. Res. 100, 619-624.

Tilley M., Upton S.J., Chrisp C.E., (1991): A comparative study on the biology of *Cryptosporidium* sp. from guinea pigs and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). Can. J. Microbiol. 37, 949-952.

Torres J., Gracenea M., Gómez S.M., Arrizabalaga M., González-Moreno O., (2000): The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. Vet. Parasitol. 92, 253-260.

Trotz-Williams L.A., Martin D.S., Gatei W., Cama V., Peregrine A.S., Martin S.W., Nydam D.V., Jamieson F., Xiao L., (2006): Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. Parasitol. Res. 96, 346-352.

Turkcapar N., Kutlay S., Nergizoglu G., Atli T., Duman N., (2002): Prevalence of cryptosporidium infection in hemodialysis patients. Nephron. 90, 344-346.

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

Upton S.J., Current W.L., (1985): The species of *Cryptosporidium* infecting mammals. J. Parasitol. 71, 625-629.

Valigurová A., Hofmannová L., Koudela B., Vávra J., (2007): An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. J. Eucaryot. Microbiol. 54, 495-510.

Valigurová A., Jirků M., Koudela B., Gelnar M., Modrý D., Šlapeta J., (2008): *Cryptosporidia*: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. Int. J. Parasitol. 38, 913-922.

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.

Widmer G., Sullivan S., (2012): Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. Parasite. Immunol. 34, 61-71.

Wielinga P.R., de Vries A., van der Goot T.H., Mank T., Mars M.H., Kortbeek L.M., van der Giessen J.W., (2008): Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. Int. J. Parasitol. 38, 809-817.

Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S., (2004): *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev. 17, 72-97.

Xiao L., Morgan U.M., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Thompson R.C., Fayer R., Lal A.A., (1999): Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3386-3391.

Xiao L., Herd R.P., (1994): *Epidemiology of equine Cryptosporidium and Giardia* infections. Equine. Vet. J. 26, 14-17.

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.

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.

Xiao L., Alderisio K., Jiang J., (2006): Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: effect of the number of samples and analytic replicates on test results. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5942-5947.

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.

Yamamoto N., Urabe K., Takaoka M., Nakazawa K., Gotoh A., Haga M., Fuchigami H., Kimata I., Iseki, M., (2000): Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. *Kansenshogaku Zasshi.* 74, 518-526.

ELEKTRONICKE ZDROJE : **Kváč M., Ditrich O., Květoňová D., Sak B., (2010):** Novinky v taxonomii kryptosporidií a jejich souvislost s epidemiologií.