

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
Zemědělská fakulta v Českých Budějovicích

Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat

Studijní program: M4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Diplomová práce:

Kryptosporidiové a mikrosporidiové infekce v chovech prasat

**Cryptosporidial and microsporidial infection on the pig farms, in the
Czech Republic**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Konzultant:

RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

Vypracovala:

Dagmar Hanzlíková

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „**Kryptosporidiové a mikrosporidiové infekce v chovech prasat**“ vypracovala na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích dne 30. dubna 2008

.....

Podpis

Ráda bych tímto poděkovala Ing. M. Kváčovi, Ph.D a RNDr. B. Sakovi, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům laboratoře Lékařské a veterinární parazitologie, kteří mi pomáhali při práci v laboratoři a také zemědělskému družstvu a jeho zaměstnancům za poskytnuté informace a materiály. V neposlední řadě patří mé poděkování také celé mé rodině.

Tato diplomová práce byla finančně podpořena grantovým projektem:

MSM 6007665806

GA ČR číslo 523/07/P117 Zoonotický potenciál kryptosporidií infikující skot a prasata

OBSAH

1. Úvod	1
2. Cíle	2
3. Literární přehled.....	3
3.1. Kryptosporidie a kryptosporidióza	3
3.1.1. Systematické řazení kryptosporidií	3
3.1.2. Životní cyklus kryptosporidií	4
3.1.3. Lokalizace kryptosporidií.....	6
3.1.4. Klinické příznaky kryptosporidiózy	6
3.1.5. Způsoby přenosu	6
3.1.6. Terapie kryptosporidiózy a preventivní opatření	7
3.1.7. . Kryptosporidie a kryptosporidióza u prasat	8
3.1.7.1. <i>Cryptosporidium parvum</i>	9
3.1.7.2. <i>Cryptosporidium suis</i>	10
3.1.7.3. <i>Cryptosporidium pig</i> genotyp II	10
3.1.7.4. Ostatní kryptosporidie a genotypy u prasat	11
3.1.8. Zoonotický potenciál kryptosporidií infikujících prasata	11
3.2. Mikrosporidie a mikrosporidióza.....	12
3.2.1. Systematické řazení mikrosporidií	12
3.2.2. Životní cyklus mikrosporidií	13
3.2.3. Lokalizace mikrosporidií.....	16
3.2.4. Klinické příznaky mikrosporidiózy	16
3.2.5. Způsoby přenosu	17
3.2.6. Terapie mikrosporidiózy a preventivní opatření	17
3.2.7. Mikrosporidie a mikrosporidióza u prasat.....	18
3.2.7.1. <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	18
3.2.7.2. <i>Encephalitozoon intestinalis</i>	19
3.2.7.3. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	20
4. Materiál a metodiky.....	22
4.1. Charakteristika sledovaných chovů.....	22
4.2. Odběr biologického materiálu pro parazitologické vyšetření.....	23
4.3. Barvení oocyst kryptosporidií anilin-karbol-methyl-violetí dle Miláčka a Vítovce (1985)	23
4.4. Barvení spor mikrosporidií pomocí roztoku calcofluoru	

White M2R	24
4.5. Hodnocení intenzity infekce nalezených parazitů.....	25
4.5.1. Odhad intenzity kryptosporidiových infekcí.....	25
4.5.2. Hodnocení intenzity mikrosporidiových infekcí semikvantitativní metodou.....	25
4.6. Genotypizace kryptosporidií a mikrosporidií.....	26
4.6.1. Izolace DNA.....	26
4.6.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	26
4.6.2.1. PCR – Kryptosporidie	26
4.6.2.2. PCR – Mikrosporidie.....	27
4.6.3. Gelová elektroforéza	29
4.6.4. Příprava vzorků na sekvenci.....	29
4.6.5. PCR-RFLP analýza kryptosporidií.....	30
5. Výsledky.....	31
5.1. Kryptosporidie	31
5.1.1. Intenzita kryptosporidiových infekcí.....	31
5.1.2. Frekvence výskytu na jednotlivých farmách.....	32
5.1.2.1. Velký Pěčín.....	32
5.1.2.2. Jersice	32
5.1.2.3. Malý Pěčín	32
5.1.3. Molekulární charakterizace	33
5.2. Mikrosporidie.....	34
5.2.1. Intenzita mikrosporidiových infekcí	35
5.2.2. Frekvence výskytu na jednotlivých farmách.....	35
5.2.2.1. Velký Pěčín.....	35
5.2.2.2. Jersice	35
5.2.2.3. Malý Pěčín	35
5.2.3. Genotypizace	36
6. Diskuse	37
6.1. Kryptosporidie	37
6.2. Mikrosporidie.....	40
7. Závěr	42
8. Summary.....	43
9. Přehled použité literatury	44
10. Přílohy.....	64

1. ÚVOD

Chov prasat v České republice má již dlouholetou tradici a patří, stejně jako ve většině států Evropské unie, k významným a dlouhodobě poměrně stabilním agrárním odvětvím. Aby čeští chovatelé prasat obstáli na trhu s vepřovým masem, musí se zaměřit na vysokou a standardní kvalitu vepřového masa. Jedním ze základních předpokladů zlepšení ekonomiky produkce a dosahování vysoké kvality vepřového masa je zdravotní stav prasat.

Zdravotní problematika prasat je nesmírně široká a zahrnuje choroby neinfekční a infekční. Mezi nejrozšířenější infekční onemocnění v našich chovech prasat patří parazitózy. Původci parazitóz nezpůsobují většinou úhyny a výrazná klinická onemocnění, ale ovlivňují parametry užitkovosti u všech kategorií prasat.

Používání chovných technologií prasat bez výběhů výrazně ovlivnilo druhové složení střevních parazitů. V těchto technologiích se již nesečkáváme s parazity, kteří mají nepřímý vývoj a potřebují pro ukončení vývojového cyklu mezipřehostitele. Ve srovnání s tradičními chovy se v současných intenzivních chovech prasat snížil počet druhů střevních parazitů. Naproti tomu používání moderních technologií vytváří vhodné podmínky pro šíření parazitů s přímým vývojem. Limitujícím faktorem je vliv chovných technologií na vývoj a přežívání volně žijících stádií parazitů, kterými se infikují další hostitelé. Obecně vytvářejí tyto technologie vhodné podmínky pro snadné šíření parazitóz především v důsledku přítomnosti velkého počtu vnímavých hostitelů.

Průjmová onemocnění sajících a odstavených selat jsou velmi častým a závažným problémem, způsobující velké ekonomické ztráty. Konkrétní vyčíslení vlivu střevních parazitóz je však velmi obtížné. Za nejčastější a nejvýznamnější bakteriální původce jsou považovány enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli* (ETEC) a *Clostridium perfringens* typ C a A. Za nejčastější původce virových průjmů selat jsou považovány rotaviry a koronaviry.

Onemocnění způsobená parazitickými prvky byla v minulosti považována za méně důležitá s malým praktickým významem. Změněné podmínky chovů prasat spojené s vysokými koncentracemi zvířat vytvářejí vhodné podmínky pro šíření parazitických prvků. Jejich význam v posledních desetiletích roste a je jim věnována stále větší pozornost a to zejména ve spojení s oportunními infekcemi lidí, zvláště imunodeficitních jedinců.

2. CÍLE

Cílem této diplomové práce je:

- Vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí ve vybraných chovech prasat.
- Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp.
- Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. KRYPTOSPORIDIE A KRYPTOSPORIDIÓZA

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření jednobuněční intracelulární paraziti, kteří infikují epiteliální buňky trávicího a dýchacího aparátu celé řady obratlovců, včetně člověka (O'Donoghue 1995). Některé druhy kryptosporidií infikují celou řadu hostitelů (*C. parvum*), zatím co jiné jsou pravděpodobně specializované na určitou skupinu hostitelů jako jsou například hlodavci nebo přežvýkavci (*C. muris* nebo *C. andersoni*) a u některých druhů je znám pouze jeden jediný hostitel (*C. wrairi*).

Kryptosporidie byly poprvé popsány E. E. Tyzzerem, který roku 1907 našel prvoka parazitujícího v buňkách žaludečního epitelu u laboratorních myší a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris*. K intenzivnímu studiu však došlo až v 70-tých letech dvacátého století v souvislosti s popisy klinické kryptosporidiózy u novorozenečků telat a jehňat s těžkými vodnatými průjmy, které se nedařilo vyléčit žádnými dostupnými chemoterapeutiky a často končili úhynem (Panciera a kol. 1971). Dalším impulsem ke studiu kryptosporidiových infekcí byly první nálezy kryptosporidiových infekcí u lidí (Nime a kol. 1976, Meisel a kol. 1976). Avšak k výraznému zvýšení zájmu došlo v roce 1993 v souvislosti s masivní infekcí z vody více než 400 000 lidí v Milwaukee (Wisconsin, USA) (MacKenzie a kol. 1994).

V Československu byl výskyt kryptosporidií vůbec poprvé zaznamenán u dvou nuceně odporažených 14-ti denních býčků v jižních Čechách v roce 1979 (Pavlásek 1981).

V současnosti je uznáváno celkem 17 druhů kryptosporidií, které byly rozlišeny na základě molekulárních rozdílů, morfologie oocyst, lokalizace vývojového cyklu v hostiteli a hostitelské specifity. Dále je popsáno velké množství genotypů, u kterých lze v budoucnu předpokládat, že budou potvrzeny jako samostatné druhy (Xiao a kol. 2004).

3.1.1. Systematické řazení kryptosporidií

Dříve byly kryptosporidie řazeny do blízkosti rodu *Eimeria*, řád Coccidia. Podle výsledků molekulární analýzy bylo prokázáno, že jsou více příbuzné gregarinám, jimž se podobá i jejich vývojový cyklus (Hijjawi a kol. 2002). Kryptosporidie patří do kmene

Apicomplexa, který je pojmenován podle tzv. apikálního komplexu, což je soubor organel na předním konci zoitů. Celý tento komplikovaný systém umožňuje průnik do hostitelské buňky a podílí se na výstavbě stěny parazitoformní vakuoly, ve které je prvok v hostitelské buňce lokalizován (Hausmann a Hülsmann 2003).

3.1.2. Životní cyklus kryptosporidií (obrázek 1)

Nejvíce probádaný je cyklus druhu *Cryptosporidium parvum*, u ostatních druhů je předpokládán stejný vývoj nebo může probíhat s menšími odlišnostmi.

Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní (Fayer a kol. 1997, Thompson a kol. 2005). K nakažení dochází fekálně-orální cestou, pozřením oocysty.

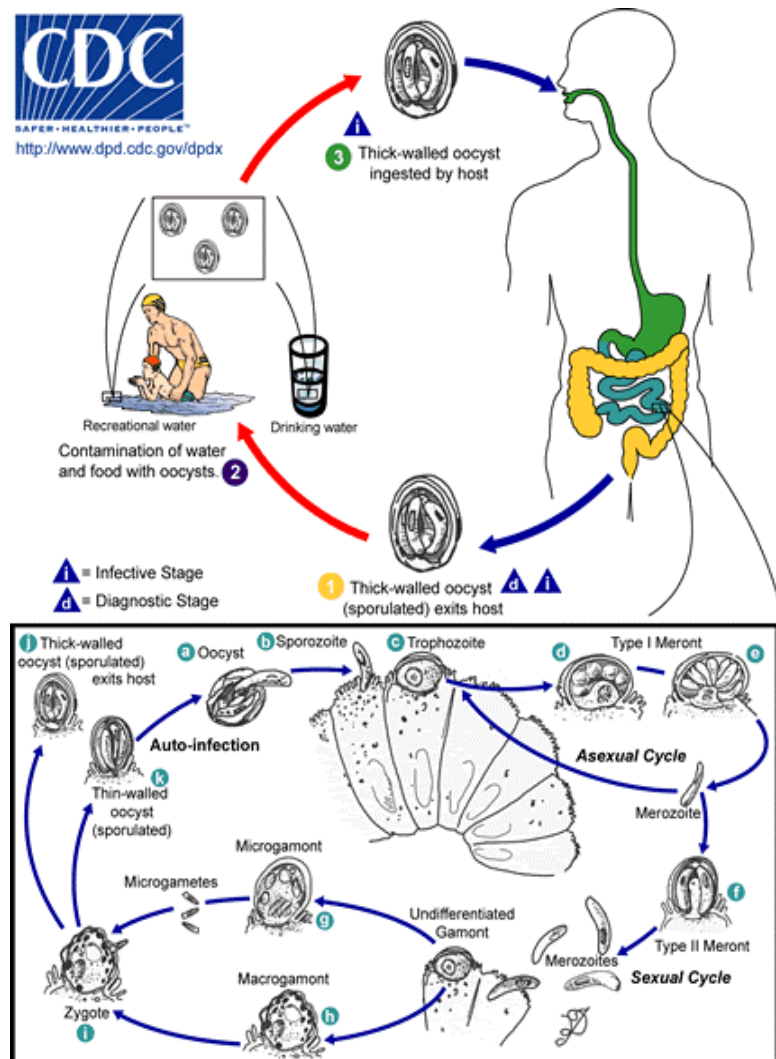
Velikost oocyst se liší podle druhu. Oocysty kryptosporidií obsahují 4 volně uložené sporozoity a poměrně velké reziduální tělísko. Nemají mikropyle a jejich stěna je téměř bezbarvá s charakteristickou suturou na jednom pólu, kterou sporozoiti opouštějí oocystu během excystace. Jsou kulovito-vejčitého tvaru, silně světlolomné (Fayer 2007).

Celý cyklus většinou probíhá v gastrointestinálním traktu hostitele (Current a Blagburn 1990). Spolknuté oocysty v hostiteli excystují, proteolytické enzymy (serinové a cysteinové endopeptidázy, aminopeptidázy) degradují suturu. Z oocysty se posléze uvolní infekční stádia – sporozoiti, kteří adherují k hostitelským buňkám. Na rozdíl od kokcií se nezanořují do cytoplazmy, ale zůstávají uloženy intracelulárně extracytoplazmaticky. Sporozoiti se mění na trofozoity uzavřené v parazitoformní vakuole v enterocytech mikroklků. Jádro trofozoita se dělí a dochází k asexuálnímu množení – merogonii. Vznikají dva typy merontů: meront typu I (vytváří 8 merozoitů) z něhož následně vzniká meront typu II (vytváří 4 merozoity). Merozoiti z meronta typu I se dále množí asexuálně, zatímco merozoiti z meronta typu II vstupují do sexuální fáze – gametogonie. Merozoiti typu II napadají hostitelské buňky, ve kterých se transformují v pohlavní stádia – jednojaderné makrogamonty a vícejaderné mikrogamonty. Z mikrogamontu se uvolňují pohyblivé mikrogamety, které oplodní makrogamety vzniklé z makrogamontů, splynutím vznikne zygota. Během endogenní sporulace vznikají ze zygoty dva typy oocyst – silnostěnné a tenkostěnné.

Silnostěnné oocysty opouštějí tělo hostitele s trusem (stolicí) a slouží k přenosu infekce na další vnímavé hostitele. Na rozdíl od oocyst kokcií jsou oocysty kryptosporidií plně infekční již po vyloučení z těla hostitele.

Tenkostěnné oocysty, kterých je u druhu *C. parvum* asi 20 %, excystují ještě v těle hostitele. Infekční stádia (sporozoiti) se aktivně uvolňují z oocyst a velmi rychle pronikají do zatím neinfikovaných mikrokřků střeva (Current 1988). Tento jev je popisován jako tzv. autoinfekce.

Obrázek 1: Vývojový cyklus kryptosporidií



V rámci rodu *Cryptosporidium* lze rozlišit 2 monofyletické linie: žaludeční a střevní kryptosporidie (Xiao a kol. 2004). Střevní kryptosporidie (např. *C. parvum*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. felis*, *C. canis*) mají menší kulaté oocysty, na rozdíl od žaludečních druhů (např. *C. muris*, *C. andersoni*, *C. molnari*, *C. galli*, *C. serpentis*), které mají oocysty větší a oválné.

3.1.3. Lokalizace kryptosporidií

Kryptosporidiové infekce probíhají ve většině případů hlavně v gastrointestinálním traktu (Guselle a kol. 2003). Parazit se však může vyvíjet také v orgánech dýchacího a vylučovacího aparátu (Goodstein a kol. 1989), v játrech, pankreatu a žlučníku (Kahn a kol. 1987, Hinnant a kol. 1989).

3.1.4. Klinické příznaky kryptosporidiózy

U imunokompetentních jedinců se klinické příznaky liší podle lokalizace a druhu kryptosporidie. U většiny střevních druhů, které jsou lokalizovány převážně v tenkém střevě, je původním příznakem onemocnění vodnatý průjem v důsledku snížené resorpční schopnosti střeva. Ve většině případů dochází ve 4-10 dnech k samovolnému vyléčení, tzv. jev „self-cure“. Dalšími příznaky mohou být křeče v břiše, zvracení, mírně zvýšená teplota, nevolnost, slabost, únava, nechutenství, zimnice a zvýšené pocení (Fayer 2003). U střevních druhů kryptosporidií s lokalizací v tlustém střevě probíhá kryptosporidióza často bez typických příznaků (Vítovec a kol. 2006). Kryptosporidióza způsobená žaludečními druhy má ve většině případů asymptomatický průběh, pouze v několika případech byly popsány klinické příznaky spojené s anorexií, úbytkem hmotnosti a poklesem produkčních ukazatelů (Anderson 1987, Pospischil a kol. 1987).

U imunodeficitních jedinců/osob je průběh kryptosporidiózy odlišný. Často přechází v chronickou formu onemocnění a probíhá ve vlnách. U těchto osob se jedná o významnou oportunní infekci, která vede k ohrožení na životě v důsledku způsobeného průjmu a celkového selhání organismu.

3.1.5. Způsoby přenosu

Kryptosporidie jsou přenášeny fekálně orální cestou, přičemž přenos může probíhat kontaktem (zvíře-člověk, člověk-člověk, člověk-zvíře) nebo pozřením kontaminované vody (pitná, rekreační i mořská voda, led) a potravy (mléko, ovoce, mořské plody, saláty). Nejčastějším zdrojem infekce stále zůstávají kontaminované vodní zdroje znečištěné trusem nebo stolicí (Fayer a kol. 2000a).

3.1.6. Terapie kryptosporidiózy a preventivní opatření

Kryptosporidie jsou jedním z mnoha parazitů, proti kterým doposud nebyla vyvinuta účinná léčba. Tento fakt představuje velké nebezpečí hlavně pro imunodeficitní jedince (O'Donoghue 1995, Fayer a kol. 1997, Dillingham a kol. 2002).

Například u lidí s AIDS se využívá antiretrovirální léčba, která slouží k posílení imunitního systému a symptomatická léčba, která zahrnuje především rehydrataci organismu.

Oocysty kryptosporidií jsou velmi odolné ve vnějším prostředí, dlouho přežívají ve vlhkém a vodním prostředí a také v přirozených přírodních podmínkách. Nejvýznamnější faktor, který ovlivňuje jejich životaschopnost a infektivitu ve vnějším prostředí, je teplota. Právě vysoké teploty (65 °C po dobu 20 minut, vroucí voda do 1 minuty) je spolehlivě ničí, stejně jako mrazení (teploty pod -20 °C), peroxid vodíku a chlordioxid. Kryptosporidie odolávají běžným dezinfekčním prostředkům užívaným při úpravě vody. Pro tento účel se dá využít ozonizace vody nebo také UV-záření (Betancourt a Rosei 2004).

Další možností při tlumení či případné léčbě kryptosporidiózy je využití probiotických bakterií. K pokusům byly použity *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp. U zástupců obou rodů byly zaznamenány pozitivní účinky na ústup kryptosporidiózy a měly značný vliv na inaktivaci oocyst kryptosporidií (Foster a kol. 2003, Glass a kol. 2004, Pickerd a Tuthill 2004, Salminen a kol. 2004).

Hlavním způsobem prevence však zůstávají, stejně jako u ostatních infekcí s fekálně-orálním přenosem, hygienická opatření jako je budování kanalizací, jejichž cílem je zamezit kontaminaci povrchových vod splašky obsahujícími lidské a zvířecí výkaly nebo čištění odpadních vod. Právě tato opatření představují hlavní problém v rozvojových zemích. Při cestování do těchto zemí je proto nutné vyvarovat se jídla, které by mohlo být kontaminované, jako například: tepelně neupravené, syrové ovoce a zelenina, voda z vodovodního kohoutku používaná na mytí nebo pro přípravu ledu, nepasterizované mléko a mléčné výrobky či potraviny koupené od pouličních prodavačů, které mohou být taktéž kontaminované.

3.1.7. Kryptosporidie a kryptosporidióza u prasat

Kryptosporidiové infekce u prasat byly poprvé popsány v USA (Bergeland 1977, Kennedy a kol. 1977). Od druhé poloviny osmdesátých let byl pozorován kosmopolitní výskyt a to zejména u selat po odstavu.

Přirozeně se vyskytující kryptosporidióza prasat byla popsána celosvětově (Koudela a kol. 1986, Xiao a kol. 1994, Quílez a kol. 1996, Izumiyama a kol. 2001, Wieler a kol. 2001, Guselle a kol. 2003, Maddox-Hyttel a kol. 2006, Vítovec a kol. 2006, Xiao a kol. 2006, Langkjær a kol. 2007, Suárez-Luengas a kol. 2007, Zintl a kol. 2007). Její význam a prevalence však nejsou doposud tak dobře prozkoumány jako u dalších zvířecích druhů (např. přežvýkavci; De Graaf a kol. 1999). V našich podmínkách se výskytem kryptosporidiózy u prasat zabývali Vítovec a Koudela (1987), Zajíček (1988 a 1989), Vítovec a kol. (1990), Vítovec a Koudela (1992), Pavlásek (1997), Vítovec a kol. (2006).

Za jediného původce kryptosporidiózy u prasat byl dlouho považován druh *Cryptosporidium parvum*, který byl poprvé popsán E. E. Tyzzerem v roce 1912 ve střevním epitelu myši. V roce 1998 byl pomocí molekulárních analýz popsán nový genotyp prasečích kryptosporidií - *Cryptosporidium pig* genotype I (Morgan a kol. 1998). O čtyři roky později popsali Ryan a kol. (2003) další prasečí genotyp kryptosporidií – *Cryptosporidium pig* genotype II. Na základě biologických a molekulárních studií byl následně *Cryptosporidium pig* genotype I popsán jako nový druh *Cryptosporidium suis* (Ryan a kol. 2004).

Obecně lze říci, že přirozené kryptosporidiové infekce u prasat se nejčastěji objevují u selat starších 1 měsíce, ale ne starších 6 měsíců věku (Fleta a kol. 1995, Quílez a kol. 1996, Atwill a kol. 1997). Méně často jsou popisovány infekce u selat mladších než 1 měsíc nebo u dospělých prasat (Sanford 1983, 1987, Fleta a kol. 1995, Quílez a kol. 1996, Wieler a kol. 2001, Hamnes a kol. 2006, Maddox-Hyttel a kol. 2006, Vítovec a kol. 2006).

Infekce jsou omezené pouze na střevo s lokalizací v tenkém a/nebo tlustém střevě (Vítovec a Koudela 1987, Morfitt a Pohlenz 1989, Vítovec a kol. 1990, Coates 1991, Vítovec a Koudela 1992).

Průjem u selat je obvykle multifaktoriálním problémem způsobený celou řadou patogenů jako kokcidie, *Strongyloides* sp., *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, adenoviry, rotaviry nebo cirkoviry (Sanford 1987, Enemark a kol. 2003, Nùñez a kol. 2003). Na rozdíl od kryptosporidiových infekcí telat (Rommel a kol.

2000) probíhá onemocnění u selat většinou jako bezpříznakové a obvykle s nízkými intenzitami infekce (Vítovec a kol. 2006).

Atwill a kol. (1997) předpokládají, že i divoká prasata mohou sloužit jako enviromentální reservoár kryptosporidií.

Kryptosporidióza prasat je nejčastěji způsobena třemi rozdílnými druhy/genotypy kryptosporidií: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium pig* genotype II.

3.1.7.1. *Cryptosporidium parvum*

Druh *C. parvum* je nejrozšířenější kryptosporidií s nejnižší hostitelskou specifitou, jehož velikost oocyst je $5,0 \times 4,5 \mu\text{m}$ ($4,5-5,4 \times 4,2-5,0$). Předpokládá se, že je infekční pro většinu savců (de Graaf a kol. 1999, Fayer a kol. 2000a). Nejčastějším hostitelem bývá dobytek. Přestože existuje řada studií zabývajících se výskytem *C. parvum* v chovech prasat (Xiao a kol. 1994, Quilez a kol. 1996, Olson a kol. 1997, Izumiyama a kol. 2001, Wieler a kol. 2001), je nutné brát na zřetel, že většina těchto prací vznikla před popisem nových druhů/genotypů prasečích kryptosporidií bez patřičné podpory pomocí molekulárních analýz. I když jsou experimentálně infikovaná prasata k tomuto druhu velmi vnímavá, nedávné studie odhalily, že přirozené infekce prasat touto kryptosporidií jsou vzácné (Morgan a kol. 1999, Enemark a kol. 2003, Widmer a kol. 2004, Langkjaer a kol. 2007, Zintl a kol. 2007). I přes ojedinělé infekce však mohou prasata hrát významnou roli v jeho přenášení mezi lidmi a zvířaty (Morgan a kol. 1999, Ryan a kol. 2003).

Patogenita *C. parvum* pro prasata byla potvrzena v experimentálních infekcích na konvenčních a gnotobiotických selatech (Moon a Bemrick 1981, Tzipori a kol. 1982, Vítovec a Koudela 1992). Příznaky infekce u těchto selat se lišily podle podané infekční dávky. U selate s dávkou 5×10^6 oocyst probíhala infekce v oblasti duodena a jejunu, později pak ilea. Selata trpěla vodnatými průjmy žluté barvy s příměsí hlenu. Sliznice v úseku jejunu a ilea byla zesílená v důsledku překrvení a s velkým množstvím hlenu. Přilehlé mízní uzliny byly zvětšené a infiltrované. Selata s dávkou $2,5 \times 10^5$ oocyst nevykazovala žádné výraznější klinické příznaky. Infekce probíhala v části jejunu, později ilea.

Histopatologické změny v tenkém střevě jsou podobné jako v případě infekce u přežvýkavců. Jedná se o zploštění kartáčového lemu, atrofii střevních klků s následnou

malabsorpcí. Dochází k postupné dilataci střevních krypt a ke snížení enzymatické aktivity střevní mukózy. Sliznice postižených orgánů je infiltrovaná lymfocyty, monocyty, neutrofilů a makrofágy (Heine a kol. 1984, Rommel a kol. 2000).

3.1.7.2. *Cryptosporidium suis*

Druh *C. suis* (dříve *Cryptosporidium pig* genotype I) je dnes nejčastěji diagnostikovanou kryptosporidií u prasat. Je velmi dobře přizpůsobený prasečím hostitelům, slabě infekční pro dobytek (Enemark a kol. 2003) a neinfekční pro neonatální myši (Morgan a kol. 1999).

Tento druh kryptosporidií se vyskytuje převážně u sajících selat (Langkjaer a kol. 2007). Vzhledem k tomu, že nebyly popsány infekce tímto druhem u prasnic, zdrojem infekce pro selata bude pravděpodobně stájové prostředí.

Ryan a kol. (2004) popsali velikost oocyst *C. suis* morfoloogicky podobnou druhu *C. parvum* s velikostí 4,6×4,2 μm (4,4-4,9×4,0-4,3). Naopak Vítovec a kol. (2006) uvedli velikost oocyst signifikantně větší 6,2×5,5 μm (6,0–6,8× 5.3–5.7).

Histologické vyšetření přirozeně infikovaných selat ukázalo jako nejčastější místo lokalizace tlusté střevo, zvláště pak část tračníku. Kryptosporidie se také běžně nalézaly v lymfoglandulárních komplexech v submukóze tlustého střeva (Vítovec a kol. 2006).

U prasat nakažených touto kryptosporidií nebyly pozorované žádné klinické příznaky onemocnění ani makroskopické změny na orgánech (Vítovec a kol. 2006). Pouze v některých případech byl pozorován mírný průjem (Enemark a kol. 2003).

3.1.7.3. *Cryptosporidium pig* genotyp II

O tomto genotypu kryptosporidií prasat je známo poměrně málo. Nejčastěji se vyskytuje u starších prasat (Langkjaer a kol. 2007). Byl izolován z prasat ze západní Austrálie, u sajícího selete v Norsku či v prasečí kejďě z irských farem a v průmyslových odpadních vodách v Sydney (Ryan a kol. 2003, 2005, Xiao a kol. 2006, Hamnes a kol. 2007).

Jeho lokalizace v zažívacím traktu ani tvar či velikost oocyst nebyly doposud dostatečně popsány.

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

3.1.7.4. Ostatní kryptosporidie a genotypy u prasat

Vyjma výše popsaných druhů a genotypů mohou být prasata infikována i dalšími druhy kryptosporidií.

Morgan a kol. (2002) experimentálně infikovali gnotobiotická selata oocystami *Cryptosporidium hominis*. Infekce byla lokalizována v ileu a kolonu s nižší intenzitou infekce a s mírnějšími klinickými příznaky než v případě infekce *C. parvum*.

Dále byly popsány „přirozené infekce“ prasat kryptosporidii specifickými pro jiné druhy hostitelů. V prasečí kejďě získané na irských farmách byla popsána přítomnost *Cryptosporidium muris* (Xiao a kol. 2006). Ve východní Číně byl z prasečích výkalů izolován *Cryptosporidium parvum* myší genotyp (Chen a Huang 2007). Typickými přirozenými hostiteli těchto kryptosporidií jsou hlodavci z čeledi myšovitých a křečkovitých (Hůrková a Modrý 2003).

3.1.8. Zoonotický potenciál kryptosporidií infikujících prasata

Všechny výše uvedené druhy a genotypy kryptosporidií jsou schopné kromě svého přirozeného hostitele infikovat také člověka, což naznačuje jejich zoonotický potenciál.

Například u *Cryptosporidium parvum* byl jasně prokázán zoonotický potenciál, tedy infekčnost pro člověka, zejména pro HIV pozitivní jedince (Rommel a kol. 2000).

Další kryptosporidií je *Cryptosporidium suis*, která byla izolovaná od HIV pacienta (Xiao a kol. 2002). Přesto je její zoonotický potenciál nejistý a vyžaduje další studium. Pravděpodobně však představuje určité riziko pro imunodeficitní jedince.

V poslední době byly zaznamenány nálezy oocyst *C. muris* u člověka, jednalo se o HIV-pozitivní pacienty (Katsumata a kol. 2000, Cama a kol. 2007).

Cryptosporidium hominis patří mezi nejčastější původce lidské kryptosporidiózy (Morgan-Ryan a kol. 2002). Infekce společně s *C. parvum* byly popsány v řadě evropských zemích jako jsou Česká republika (Hajdušek a kol. 2004), Anglie (Leoni a kol. 2006), Dánsko (Enemark a kol. 2002), Francie (Guyot a kol. 2001), Nizozemí (Homan a kol. 1999), Severní Irsko (Lowery a kol. 2001), Švýcarsko (Fretz a kol. 2003, Glaeser a kol. 2004) a Skotsko (Mallon a kol. 2003).

3.2. MIKROSPORIDIE A MIKROSPORIDIÓZA

Mikrosporidie jsou eukaryotní obligátní vnitrobuněční paraziti infikující široké spektrum bezobratlých a obratlovců včetně člověka (Didier a Weiss 2006). Většina z nich je parazitem členovců a ryb (Wittner 1999). V současné době je mikrosporidióza řazena mezi oportunní infekce nejen imunodeficitních (Weber a kol. 2000), ale i imunokompetentních jedinců (Lores a kol. 2002b).

Parazit byl poprvé popsán roku 1857, kdy Nägeli identifikoval nového parazita v housenkách bource morušového (*Bombix mori*), který pustošil celé chovy a hrozilo tak zničení celého hedvábného průmyslu v Evropě. Tohoto parazita pojmenoval *Nosema bombycis*.

V současné době představují mikrosporidie největší problém především v komerčním chovu ryb, hedvábnictví a včelařství (Becnel a Andreadis 1999, Shaw a Kent 1999).

První mikrosporidií popsanou u savců byla *Encephalitozoon cuniculi*, původně popsaná u králíků v roce 1922. Dnes je tento druh známý u širokého spektra savců.

V roce 1959 byly poprvé popsány infekce mikrosporidií u lidí (Matsubayashi a kol. 1959). Jednalo se spíše o vzácné případy. Od poloviny sedmdesátých let však dramaticky vzrostl počet identifikovaných infekcí u imunodeficitních jedinců postižených virem HIV nebo s imunitou sníženou v důsledku používání imunosuprimujících léků (Weber a kol. 1994). Od té doby bylo popsáno mnoho dalších druhů a zájem o studie mikrosporidií vzrostl.

Kmen Microsporidia v současnosti zahrnuje velké množství druhů, doposud jich bylo popsáno přibližně 1300 (Larson 1999).

3.2.1. Systematické řazení mikrosporidií

Mikrosporidie byly donedávna považovány za samostatný kmen prvoků. Na základě recentně provedených studií bylo však prokázáno, že mikrosporidie jsou dobře definovanou skupinou bez příbuznosti k protozoím a proto jsou řazeny do samostatného kmene Microsporidia (Cavalier-Smith 1998). I když se mikrosporidie strukturálně nepodobají žádnému klasickému houbovému organismu, mají společné předky s houbami (Thomarat a kol. 2004). V současnosti jsou mikrosporidie zařazeny v rámci říše Fungi (Keeling a kol. 2000, Keeling 2003).

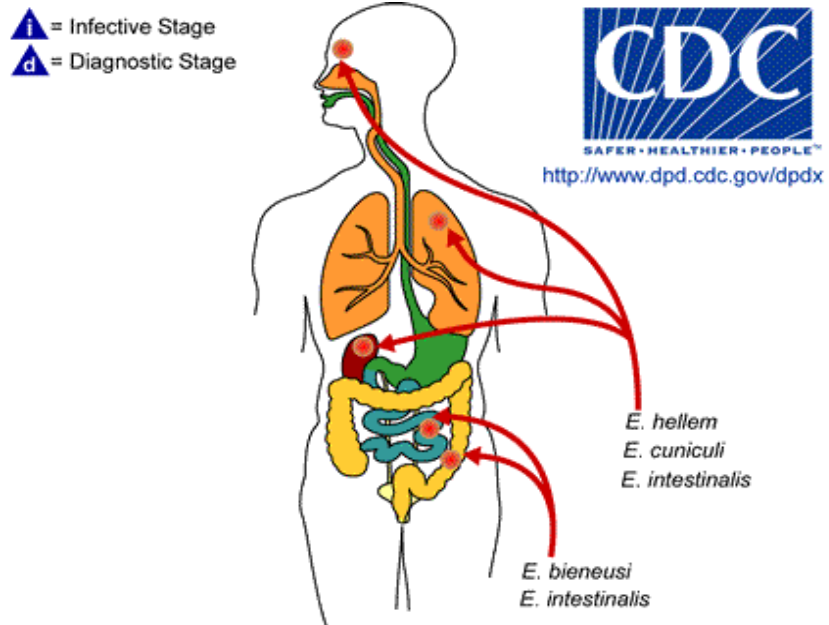
3.2.2. Životní cyklus mikrosporidií

Životní cyklus mikrosporidií můžeme obecně rozdělit na tři fáze: infekční fáze, proliferativní fáze a fáze sporogonie (Cali a Takvorian 1999). Vývoj parazita může probíhat uvnitř parazitoformní vakuoly (např. *Encephalitozoon* spp.), která odděluje cytoplazmu hostitelské buňky od mikrosporidie. Mechanismus, kterým mikrosporidie tuto vakuolu vytvářejí, není doposud znám. Většinou je vývojový cyklus lokalizován volně v cytoplasmě hostitelské buňky (např. *Enterocytozoon bieneusi*, *Nosema* spp.) (obrázek 2).

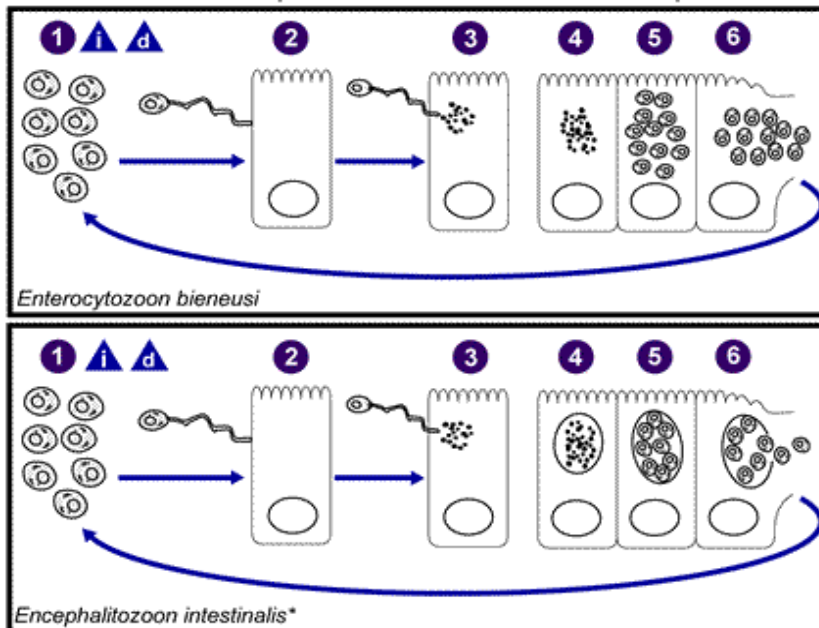
Nejčastěji se zralá spora dostává do těla hostitele pozřením nebo vdechnutím. Možná je také přímá oční infekce či transplacentární infekce, která byla prokázána u myší, králíků, psů, koní a opic (Canning a Lom 1986). U člověka zatím tento přenos zaznamenaný nebyl (Didier a kol. 1998). Mechanismus, kterým mikrosporidie pronikají do hostitelské buňky, je jedním z nejvíce sofistikovaných mechanismů vůbec. Umožňuje jim proniknout do hostitelské buňky téměř nepozorovaně a zároveň je chrání před obrannými mechanismy hostitele (Franzen 2005).

Byly objeveny dva způsoby, kterými mikrosporidie mohou pronikat do hostitelské buňky. Prvním způsobem je vystřelení pólové trubice. Tento mechanismus je často přirovnáván ke svlékání prstu rukavice zevnitř ven. Toto obrácení začíná na vrcholku spory po prolomení její ztenčené stěny (Keohane a Weiss 1999). Dalším způsobem, kterým mohou mikrosporidie pronikat do hostitelské buňky, je fagocytóza. Spora je pohlcena buňkou a fagozom s pohlcenou sporou dospívá v lysozom. Sporoplasma je schopna uniknout z dospělého lysozomu a infikovat cytoplazmu hostitelské buňky vystřelením pólové trubice (Franzen 2005).

Obrázek 2: Vývojový cyklus mikrosporidií



Intracellular development of *E. bienersi* and *E. intestinalis* spores.



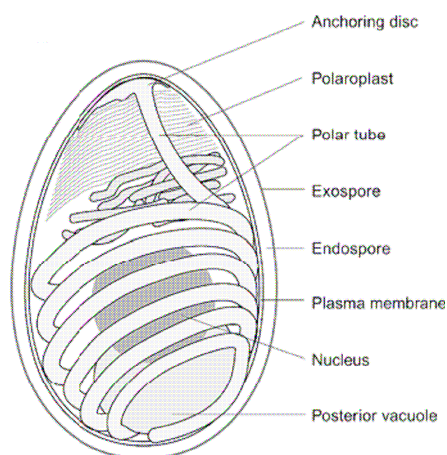
*Development inside parasitophorous vacuole also occurs in *E. hellem* and *E. cuniculi*.

Spora je ve vhodném prostředí stimulována k vystřelení pólové trubice a následnému průniku infekční sporoplasmy skrz ní do hostitelské buňky a zahájení proliferativní vegetativní fáze zvané merogonie. Mikrosporidie projde během svého životního cyklu merogonií a sporogonií, které mohou probíhat ve stejné hostitelské tkáni nebo v různých tkáních stejného hostitele nebo dokonce v různých generacích stejného hostitelského druhu. Merogonie trvá kratší dobu a vzniká při ní meront, který dozrává ze sporoplasmy. Po období růstu a jaderného dělení vznikají dceřinné buňky-merozoity. Meronty a merozoity jsou morfologicky identické. Při sporogonii dochází k dělení sporontů, kteří jsou odvozeni z merozoitů a jejich dceřinných buněk a vyvíjí se sporoblast s částečně vytvořeným vystřelovacím aparátem, který dozrává v infekční spory (Vávra a Larrison 1999). Až do stádia vzniku spor nejsou buňky hostitele viditelně poškozovány. Když je cytoplasma hostitelské buňky naplněna sporami, dochází k rozpadu buňky a uvolnění spor do prostředí. Z těla hostitele se spory dostávají močí, trusem, bronchiálním sekretem nebo až po smrti hostitele.

Silná mnohvrstevná stěna spory se skládá z proteinové exospory, z chitinové endospory a vnitřní plazmatické membrány (Prigneau a kol. 2000). Vnitřní prostor spory je vyplněný cytoplasmou s eukaryotním jádrem (sporoplasma, infekční améboidní zárodek). Dominantní strukturou uvnitř zralé spory je tzv. vystřelovací aparát, tvořený dutou stočenou pólovou trubicí, která je ukotvená na předním pólu spory v místě nazývaném kotvící disk, polaroplastem vytvořeným navrstvením těsně přiložených membránových lamel a vezikul a zadní vakuolou, která je dobře viditelná ve světelném mikroskopu (obrázek 3). Počet závitů pólové trubice a jejich uspořádání je druhově specifické. K dalším buněčným organelám mikrosporidií patří hrubé endoplazmatické retikulum, volné ribosomy a drobné váčky připomínající Golgiho aparát.

Spory mají nejčastěji oválný tvar, vyskytují se i tvary tyčkovité, kulovité či hruškovité. Mohou vznikat dva typy těchto spor. Prvním typem jsou „vnější spory“, které jsou produkovány ve velkém počtu a jsou uvolňovány z hostitele. Mají relativně silnou stěnu a jsou odolné ve vnějším prostředí. Druhým typem jsou „vnitřní spory“, ty jsou produkovány v menších počtech a mají tenčí stěnu než spory „vnější“. Tyto spory vznikají většinou množením v tkáni střevního traktu, který byl napadený mikrosporidii. K jejich vystřelení dochází samovolně v těle původního hostitele.

Obrázek 3: Spora mikrosporidie (Franzen 2005)



V současnosti se mikrosporidie dělí do 2 tříd podle buněčného cyklu, typu hostitele, morfologie spor a typu přenosu. Do třídy Dihaplophasea jsou řazeny mikrosporidie, jejichž jádro během životního cyklu tvoří diplokaryon, dvě trvale sdružená synchronně se dělící jádra (např. u rodu *Nosema*). Do třídy Haplophasea řadíme mikrosporidie, které ve všech fázích svého životního cyklu mají pouze jedno izolované jádro (např. u rodu *Encephalitozoon*) (Sprague a kol. 1992).

3.2.3. Lokalizace mikrosporidií

Mikrosporidiové infekce probíhají ve většině případů v gastrointestinálním traktu. Mezi další možná místa patří např. dýchací ústrojí, žlučník a žlučové cesty, dvanáctník, močový měchýř, oko a mnoho dalších orgánů (Vávra a Larrison 1999).

3.2.4. Klinické příznaky mikrosporidiózy

Projev mikrosporidiových infekcí závisí na druhu mikrosporidií, druhu infekce, druhu a věku hostitele v době infekce a schopnosti imunitní odpovědi hostitelského organismu.

Nejběžnějším symptomem onemocnění je dlouhotrvající průjem, který však nemusí být pravidlem. Bylo popsáno i vážnější systémové onemocnění, jako keratokonjunktivitida, zánět dutin, zánět průdušnice a průdušek, zánět mozku,

intersticiální zánět ledvin, hepatitida, zánět žlučníku, zánět kostí a kostní dřeně a myositis (Kolter a kol. 1998, Didier a kol. 2004).

Zatímco u imunokompetentních jedinců často probíhá mikrosporidíóza jako mírné nebo spontánně mizející onemocnění, u pacientů s AIDS nebo jinak imunodeficitních jedinců je onemocnění provázené chronickými průjmy, které vedou k malabsorbci živin, úbytku hmotnosti, vyčerpání a často končí smrtí jedince (Orenstein a kol. 1990, Kotler a kol. 1994). Nejvíce ohroženi jsou lidé s AIDS, po transplantaci orgánů, děti, cestovatelé, nositelé kontaktních čoček a lidé vyššího věku (Bryan a Schwartz 1999, Deplazes a kol. 2000).

3.2.5. Způsoby přenosu

Mikrosporidiové spory mohou být do životního prostředí uvolněny stolicí, močí nebo dýchacími sekrety. Jejich výskyt byl popsán v mnoha prostředích, jako jsou voda, půda a potraviny, kde zůstávají po dlouhou dobu infekční (Dowd a kol. 1998, Cotte a kol. 1999, Fournier a kol. 2000). Zdrojem infekce jsou i osoby nebo zvířata nakažená mikrosporidii, která vylučují spory. Avšak zdroje těchto infekcí u lidí nejsou ještě zcela objasněny (Dengjel a kol. 2001, Drosten a kol. 2005), ale zvířata patří mezi ty nejpravděpodobnější.

3.2.6. Terapie mikrosporidíózy a preventivní opatření

Jelikož způsoby přenosu a zdroje infekce nejsou zatím zcela objasněny, možným způsobem ochrany je vyhnout se přijímání spor spolu s kontaminovanou vodou či potravinami.

Na rozdíl od kryptosporidíózy již existují léky proti dvěma nejčastějším původcům lidské mikrosporidíózy. Infekce způsobené *Enterocytozoon bieneusi* je možné léčit pomocí fumagilinu (antibiotikum z *Aspergillus fumigatum*), který je však relativně toxický, proto se zkoušejí jeho deriváty. Méně citlivý je vůči albendazolu a jemu podobným benzimidazolovým preparátům, které jsou však účinné proti druhému nejčastějšímu původci lidské mikrosporidíózy *Encephalitozoon intestinalis*.

U pacientů s AIDS se používá taktéž antiretrovirální léčba, která slouží k posílení imunitního systému.

3.2.7. Mikrosporidie a mikrosporidióza u prasat

Mikrosporidie jsou celosvětově rozšíření oportunní paraziti se širokým hostitelským spektrem, které zahrnuje taktéž prasata. Právě prasata byla označena, mimo jiná zvířata, za možné rezervoáry některých lidských genotypů mikrosporidií. Vzhledem k dlouhodobé chronické formě onemocnění, která u prasat probíhá, se do prostředí dostává velké množství spor, které představují zdroj infekce nejen pro vnímavá prasata, ale také pro člověka.

3.2.7.1. *Enterocytozoon bieneusi*

Jedná se jednoznačně o nejrozšířenější mikrosporidii parazitující u lidí. Poprvé byla popsána v roce 1985 v enterocytech pacienta s AIDS (Desportes a kol. 1985). Dlouhou dobu se *Enterocytozoon bieneusi* pokládal za parazita infikujícího výhradně člověka. Po více než deseti letech od popisu bylo zjištěno, že může infikovat i prasata (Deplazes a kol. 1996b) a podílet se na život ohrožujících průjmech. Tato mikrosporidie byla postupně identifikována u celé řady hospodářských a domácích zvířat jako jsou telata (Rinder a kol. 2000, Santín a kol. 2004, 2005, Sulaiman a kol. 2004), kozy (Lores a kol. 2002a), lamy (Dengjel a kol. 2001), kočky (Mathis a kol. 1999), psi (Del Aguila a kol. 1999), králíci (Del Aguila a kol. 1999), také u makaků (Chalifoux a kol. 1998, Mansfield a kol. 1998, Schwarz a kol. 1998, Pourrut a kol. 2002), černé zvěře (Del Aguila a kol. 2004), bobrů, lišek, ondatery, vyder a mývalů (Sulaiman a kol. 2003) a také u ptáků, jako jsou kuřata (Reetz a kol. 2002), pštrosi a holubi (Del Aguila a kol. 2004; Haro a kol. 2005). Toto široké hostitelské spektrum naznačuje možný zoonotický potenciál této mikrosporidie.

Enterocytozoon bieneusi se vyznačuje výraznou tkáňovou afinitou k enterocytům tenkého střeva, zvláště v částech duodena a jejunu. Vzácněji může infikovat epitel žlučových cest.

Při pozorování v elektronovém mikroskopu je tento druh charakteristický a dobře rozeznatelný. Jeho spory jsou velmi malé ($1,6 \mu\text{m} \times 1,0 \mu\text{m}$), tenkostěnné, ale velmi odolné. Vyvíjí se mimo parazitoformní vakuolu. Vývojová stádia jsou nejprve jednojaderná, během rychlého dospívání se mění v mnohojaderná kulovitá plasmodia, ve kterých se zanedlouho vytvoří materiál budoucích organel spory. Mnohojaderné plasmodium se nakonec rozpadne na velké množství spor s charakteristickou ultrastrukturou.

Molekulárními studii bylo zjištěno, že *Enterocytozoon bieneusi* není jednotný. V současnosti je známo přes 50 různých genotypů (Sulaiman a kol. 2003). Z toho 34 genotypů bylo nalezených u lidí (Mathis a kol. 2005). U prasat se nejčastěji vyskytuje genotyp F, který však z hlediska lidského zdraví nepředstavuje výrazné nebezpečí. Na rozdíl od genotypů D, E nebo Peru 9, které byly v minulosti popsány jako původci lidské mikrosporidie. Lidské genotypy nevytváří žádnou vyhraněnou skupinu a mnoho z nich je podobných prasečím a opičím genotypům. Experimentálně se podařily přenosy lidských izolátů na prase a makaka (Kondova a kol. 1998, Green a kol. 2004).

U prasat probíhá infekce často asymptomaticky nebo jako chronické onemocnění. Výrazně vyšší výskyt byl pozorován u selat po odstavu, u kterých je původce označován za jednu z možných příčin průjmu. Pro dospělá prasata se zdá být *Enterocytozoon bieneusi* nepatogenní (Breitenmoser a kol. 1999, Mathis a kol. 2005).

Infekce u lidí je většinou spojena s průjmovým onemocněním, ale někdy může toto onemocnění probíhat asymptomaticky, zvláště u imunokompetentních jedinců.

3.2.7.2. *Encephalitozoon intestinalis*

Tato mikrosporidie je druhou nejčastěji diagnostikovanou u lidí. Poprvé byla nalezena v roce 1992 u pacienta s AIDS, který trpěl chronickým průjmem (Blanshard a kol. 1992). Původně byl její název *Septata intestinalis* (Cali a kol. 1993) kvůli přítomnosti mimobuněčného materiálu, který rozděluje parazitoformní vakuolu na jednotlivé oblasti-septa. Na základě morfologických, genetických, imunologických a biochemických znaků byla *Septata intestinalis* reklasifikována do rodu *Encephalitozoon* (Hartskeerl a kol. 1995).

Donedávna byl tento druh popsán pouze u člověka, později byl identifikován pomocí metody PCR v trusu osla, psa, prasete, krávy a kozy (Bornay-Llinares a kol. 1998).

V roce 2006 byl identifikován první případ *Encephalitozoon intestinalis* u prasnic v Evropě (Valenčáková a kol. 2006).

Nejčastějším místem lokalizace této mikrosporidie jsou enterocyty tenkého střeva. Může se ale rozšířit i do dalších tkání a orgánů mimo zažívací trakt nebo způsobit systémové infekce. V těle se šíří krevní cestou, prostřednictvím makrofágů, do dalších orgánů jako jsou játra, slezina, nadledvinky, plíce, myokard a placenta (Nordstoga a kol. 1972, van Dellen a kol. 1978, Steward a kol. 1979, Mohn a kol. 1981, 1982, Zeman a Baskin 1985, , Canning a Hollister 1987, van Dellen a kol. 1989).

V elektronovém mikroskopu je tato mikrosporidie zřetelně rozeznatelná od ostatních druhů (Cali a kol. 1993). Vývoj probíhá uvnitř parazitoformní vakuoly. Během vývojového cyklu jsou všechna vývojová stádia jednojaderná a leží v buňce ve velké vakuole. V proliferativní fázi se binárním dělením tvoří meronty, které mají jednoduchou cytoplazmatickou membránu, izolované jádro a jednoduché cytoplazmatické orgány. Fáze sporogonie je charakterizována zesílením plazmalemy. Vzniklé sporonty jsou většinou umístěny uprostřed parazitoformní vakuoly a binárně se dělí za vzniku sporoblastů. Následným posledním dělením se utvářejí orgány charakteristické pro sporu. Spory *E. intestinalis* měří $1,2 \mu\text{m} \times 2,0 \mu\text{m}$.

3.2.7.3. *Encephalitozoon cuniculi*

Tento druh mikrosporidie byl poprvé izolován z mozku, míchy a ledvin králíka s motorickou paralýzou v roce 1922 (Wright a Craighead 1922) a následný rok byl pojmenován (Levaditi a kol. 1923). Ze všech druhů, infikujících savce, má nejširší hostitelské spektrum zahrnující celou řadu savců. Přirozené infekce byly popsány u hlodavců, zajíců, šelem, přežvýkavců a také u primátů (Canning a Hollister 1987, Didier a kol. 1998).

Encephalitozoon cuniculi je schopný infikovat celou řadu hostitelských buněk, ve kterých způsobuje zánětlivé změny. Nejčastěji to jsou např. endoteliální buňky cév a tubulů ledvin, epitelální buňky a ostatní buňky ve většině tkání, hlavně však mozku a ledvin. V těle se šíří prostřednictvím makrofágů. Nejčastějším způsobem nakažení je inhalace nebo ingesce, infekční spory se pak do vnějšího prostředí šíří močí nebo výkaly.

Vývoj této mikrosporidie probíhá uvnitř parazitoformní vakuoly. Všechna vývojová stádia mají během vývoje jednoduché jádro. Meronti, vzniklé binárním dělením, zůstávají v blízkosti membrány vakuoly. Sporonti se pak nacházejí volně v centru vakuoly. Po vyplnění vakuoly sporami dochází k prasknutí její stěny a poté i k ruptuře membrány hostitelské buňky a spory jsou uvolněny do okolního prostředí. Spory mají velikost $2,0-2,5 \mu\text{m} \times 1,0-1,5 \mu\text{m}$.

Na základě imunologických, biochemických a molekulárních studií byly popsány tři genotypy *E. cuniculi*. Genotyp I byl původně izolovaný z králíků (Shaddock 1969), byl

ale identifikovaný i u HIV pozitivního pacienta ze Švýcarska (Deplazes a kol. 1996a, 1996b). Genotyp II pochází z myší a později byl identifikovaný jako přirozená infekce u polárních lišek (Didier a kol. 1995), nikdy však nebyl zaznamenán u lidí (Didier a kol. 1995). Poslední genotyp III byl původně izolován u psů (Shadduck a kol. 1978) a také byl popsán u pacienta s AIDS v USA (Didier a kol. 1996).

V elektronovém mikroskopu je *E. cuniculi* morfologicky neodližitelný od mikrosporidie *Encephalitozoon hellem*.

4. MATERIÁL A METODIKY

4.1. CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH CHOVŮ

Parazitologické sledování bylo provedeno v zemědělském družstvu Hříšice, okres Jindřichův Hradec. Chov prasat byl situován na farmách Jersice a Velký Pěčín, kde byly ustájeny prasnice a odstavená selata. Selata ve stáří cca 2 měsíců byla převážena z těchto dvou farem do předvýkrmu na farmě v Malém Pěčíně a odtud do výkrmu na farmy v Hříšici a Bílkově.

Chov prasnic a odstavených selat

Na farmě Jersice bylo chováno 80 ks prasnic. Jalové a březí prasnice byly ustájeny ve skupinových kotcích s krmením do společných žlabů. Asi 14 dní před porodem byly převáděny na porodnu do individuálních kotců, kde se mohly volně pohybovat. Jeden roh kotce byl přehrazen. Zde měla selata doupe, nádobu na příkrm a napaječku. V těchto kotcích byla selata spolu s prasnicemi až do odstavu ve 4. týdnu věku, kdy byla umístěna do skupinových kotců s krmením do společných žlabů. Každý kotec byl vybaven napaječkou a doupeťem. Zvířata byla ustájena na betonové podlaze se slamnatou podestýlkou. Odkliz hnoje a krmení byl prováděn 2× denně.

Ve Velkém Pěčíně bylo chováno 90 ks prasnic. Jalové a březí prasnice byly ustájeny ve skupinových kotcích s krmením do individuálních žlabů. Na porodnu byly převáděny stejně jako v Jersicích asi 14 dní před porodem do individuálních porodních boxů. V obou stájích se prasnicím nepodestýlala žádná sláma. V porodním boxu v prostoru pro selata bylo nastláno velké množství slámy, protože zde selata neměla k dispozici žádné doupe. V tomto prostoru měla také napaječku a nádobu na příkrm. Krmení pro prasnice bylo plně automatizováno. Po odstavu byla selata umístěna do skupinových kotců se slamnatou podestýlkou, napaječkou, doupeťem a krmením do společných žlabů. Odkliz hnoje a krmení byl prováděn 2× denně.

U všech selat při odstavu byl aplikován přípravek Colivet® proti průjmům. Prasnicím byl 1× za rok aplikován Ivomec®.

Brakace prasnic se pohybovala kolem 25 %. Stavby byly doplněny prasničkami z vlastního chovu.

Předvýkrm

Ve stáří cca 2 měsíců byla selata převážena do předvýkrmu na farmu v Malém Pěčíně. Zde byla ustájena ve společných kotcích se slamnatou podestýlkou po 20 nebo 30 kusech. Selata byla krmena *ad libitum*. Odkliz hnoje byl prováděn 2× denně. Celková kapacita stáje byla 360 kusů. Podle intenzity růstu byla za 6-7 týdnů prasata převezena do výkrmu na farmu v Hříšici či Bílkově.

4.2. ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU PRO PARAZITOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Odběry byly prováděny v letech 2006 a 2007 v nepravidelných intervalech. Vzorky trusu byly individuálně odebírány hned po vykání zvířete, uloženy do plastových kelímků, označeny a vyšetřeny ihned po příjezdu z chovu nebo do 24 hodin po odběru. Do té doby byly uchovávány při teplotě 4 °C. Pro diagnostiku byly odebírány 3 g výkalů. Vzorky nebyly fixovány žádným fixačním roztokem. Celkem bylo odebráno 411 vzorků. Z toho bylo 39 vzorků od kojících prasnic, 127 vzorků od sajících selat ve stáří do 4 týdnů, 122 vzorků od selat odstavených ve stáří 5-8 týdnů a 123 vzorků od selat v předvýkrmu ve stáří 9-14 týdnů.

4.3. BARVENÍ OOCYST KRYPTOSPORIDIÍ ANILIN-KARBOL-METHYL- VIOLETÍ DLE MILÁČKA A VÍTOVCE (1985)

ZÁSOBNÍ ROZTOKY:

- **Roztok anilin-karbol-methyl-violeti**
 - 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) Vzorčky výkalů natřít na podložní sklo, fixovat methanolem v plameni (sklo ponořit krátce do methanolu a po vyjmutí zapálit).
- 2) Barvit v anilin-karbol-methyl-violeti po dobu 30 minut.
- 3) Omýt tekoucí vodou.
- 4) Diferencovat v 2 % kyselině sírové po dobu 2 minut.
- 5) Omýt tekoucí vodou.
- 6) Dobarvit tartrazinem po dobu 1-2 minut.
- 7) Omýt tekoucí vodou.

VÝSLEDEK BARVENÍ: oocysty se barví modrofialově na žlutém pozadí.

Všechny preparáty byly vyšetřeny světelným mikroskopem (Olympus IX70) při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Vždy byl prohlédnut celý preparát.

4.4. BARVENÍ SPOR MIKROSPORIDIÍ POMOCÍ ROZTOKU CALCOFLUORU WHITE M2R

ZÁSOBNÍ ROZTOKY:

- **Evansova modř**
0,5% roztok Evansovy modři v PBS
- **Calcofluor White M2R**
0,1% roztok calcofluoru v PBS
- **PBS**
fosforečnan sodný 3,6 g, dihydrogenfosforečnan draselný 9,1 g, chlorid sodný 8,5 g, doplnit deionizovanou vodou do 1 l, pH 7,2-7,4

PRACOVNÍ POSTUP:

- 1) Rozetřít trus na podložní sklíčko a ponechat volně zaschnout.
- 2) Fixovat methanolem po dobu 2 minut, opět ponechat zaschnout.
- 3) Barvit calcoflourem po dobu 10 minut.
- 4) Opláchnout v PBS.

- 5) Dobarvit Evansovou modří po dobu 30 sekund.
- 6) Opláchnout v PBS a opět ponechat zaschnout.

VÝSLEDEK BARVENÍ: obarvené spory svítí jasně modrobíle.

Takto připravená sklíčka byla prohlížena fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX70) při zvětšení 1000× s olejovou imerzí při vlnové délce 490 nm.

4.5. HODNOCENÍ INTENZITY INFEKCE NALEZENÝCH PARAZITŮ

4.5.1. Odhad intenzity kryptosporidiových infekcí (tabulka 1)

POSTUP ODHADU:

- 1) Zvážit podložní sklo před provedením nátěru s přesností na 0,001 g.
- 2) Natřít vzorek trusu.
- 3) Ihned zvážit hmotnost natřeného vzorku.
- 4) Barvit metodou dle Miláčka a Vítovce.
- 5) Spočítat všechny oocysty v nátěru.

Na základě hmotnosti vzorku a počtu oocyst odhadnout počet oocyst v gramu trusu (OPG).

Tabulka 1: **Hodnocení intenzity infekce na základě OPG**

Intenzita infekce	OPG
Ojedinělá (oj.)	$<10^3$
+	10^3-10^4
++	10^4-10^5
+++	$>10^5$

4.5.2. Hodnocení intenzity mikrosporidiových infekcí semikvantitativní metodou (tabulka 2)

Tabulka 2: **Semikvantitativní hodnocení intenzity mikrosporidiových infekcí**

Intenzita infekce	Počet spor v zorném poli
Slabá infekce	1-5
Středně silná infekce	5-20
Silná infekce	Více než 20

4.6. GENOTYPIZACE KRYPTOSPORIDIÍ A MIKROSPORIDIÍ

4.6.1. Izolace DNA

Celková DNA byla extrahována přímo z trusu pomocí komerčního kitu QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

K 180-200 mg trusu bylo do mikrozkušavky (1,5 ml) přidáno 200 µl ASL pufru a 150 mg skleněných kuliček (Ø 0,5 mm). Poté bylo provedeno rozbíjení oocyst/spor pomocí homogenizátoru (MINI-BEADBEATER™, Biospec, USA) po dobu 2 minut při rychlosti 5000 kmitů/min. Dále bylo postupováno podle návodu, který je součástí kitu. Získaná DNA byla uchována při teplotě -20 °C.

4.6.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

POUŽITÉ CHEMIKÁLIE:

- **Deoxyribonukleosid trifosfáty** (dNTP's, 1,25 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- **10× koncentrovaný kompletní pufr pro *Taq* purple DNA polymerázu** (15 mM MgCl₂)
- ***Taq* purple DNA polymeráza** (1 U/µl, Top-Bio, ČR)
- **PCR H₂O** (Top-Bio, ČR)
- **MgCl₂** (25 mM, Top-Bio, ČR)
- **Bovinní sérový albumin** (BSA 10 mg/ml, Sigma)

4.6.2.1. PCR – Kryptosporidie

Byl použit nested PCR protokol pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA; Jiang a kol. 2005). Celkový objem reakční směsi pro jednotlivé polymerázové reakce byl 30 a 50 µl (tabulka 3).

- Primery (10 µM)

Primární primery

F 5'-TCTAGAGCTAATACATGCG-3'

R 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'

Sekundární primery

F 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

R 5'-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3'

Tabulka 3: **Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku**

	Primární reakce		Sekundární reakce	
	koncentrace	objem (μl)	koncentrace	objem (μl)
H ₂ O	-	13,05	-	26,75
MgCl ₂	25mM	1,80	25 mM	3,00
10×buffer	-	3,00	-	5,00
dNTP	1,0 mM	6,00	1,0 mM	10,00
Primer forward	10 μM	0,60	10 μM	1,00
Primer reverse	10 μM	0,60	10 μM	1,00
BSA	10 mg/ml	1,20	-	-
Taq	1U/1 μl	0,75	1U/1 μl	1,25
DNA	-	3,00	-	2,00
CELKEM	-	30,00	-	50,00

Při primární a sekundární PCR byl použit stejný amplifikační program (tabulka 4).

Tabulka 4: **Amplifikační program pro termocycler (Bioer, Krd) pro dvojici primerů**

35 cyklů	Počáteční denaturace	94 °C	3 min.
	Denaturace	94 °C	45 s
	Nasedání primerů	55 °C	45 s
	Dosyntetizování nového řetězce	72 °C	60 s
	Finální extenze	72 °C	7 min.

4.6.2.2. PCR – Mikrosporidie

Byl použit nested PCR protokol pro amplifikaci části 508 bp dlouhého fragmentu skládajícího se ze 122 bp na 3' konci z SSU rRNA genu, 243 bp ITS (internal transcribed spacer) a 143 bp na 5' konci z LSU rRNA genu (velká ribozomální

podjednotka) (Katzwinkel-Wladarsch a kol. 1996). Celkový objem reakční směsi pro jednotlivé polymerázové reakce byl 25 μ l (tabulka 5).

- Primery (10 μ M)

Primární primery

F 5'- TGAATGKGTCCTGT -3'

R 5'- GTTCATTCGCACTACT -3'

Sekundární primery

F 5'- GGAATTCACACCGCCCGTCVYTAT -3'

R 5'- CCAAGCTTATGCTTAAGTCCAGGGAG -3'

Tabulka 5: **Reakční směs pro nested PCR protokol pro amplifikaci ITS**

	Primární reakce		Sekundární reakce	
	koncentrace	objem (μ l)	koncentrace	objem (μ l)
H ₂ O	-	8,37	-	12,37
MgCl ₂	25mM	1,50	25 mM	1,50
10 \times buffer	-	2,50	-	2,50
dNTP	1,0 mM	5,00	1,0 mM	5,00
Primer forward	10 μ M	0,50	10 μ M	0,50
Primer reverse	10 μ M	0,50	10 μ M	0,50
BSA	10 mg/ml	1,00	-	-
Taq	1U/1 μ l	0,63	1U/1 μ l	0,63
DNA	-	5,00	-	2,00
CELKEM	-	25,00		25,00

Při primární a sekundární PCR byl použit stejný amplifikační program (tabulka 6).

Tabulka 6: **Amplifikační program pro termocycler (Bioer, Krd) pro dvojici primerů**

35 cyklů	{	Počáteční denaturace	94 °C	3 min.
		Denaturace	94 °C	45 s
		Nasedání primerů	52 °C	45 s
		Dosyntetizování nového řetězce	72 °C	60 s
		Finální extenze	72 °C	7 min.

4.6.3. Gelová elektroforéza

Velikost PCR fragmentů byla ověřována gelovou elektroforézou. Výsledný PCR produkt byl detekován na 1% agarózovém gelu s přídavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (302 nm).

POUŽITÉ CHEMIKÁLIE:

- **50× TAE pufr** (242 g tris báze, 47,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA)
- **agaróza** (Serva)
- **ethidium-bromid** (Sigma)
- **100 bp DNA Ladder** (O'Gene Ruler™)

PRACOVNÍ POSTUP:

- 1) Smíchat agarózu s 1× TAE pufrém (výsledná koncentrace je 1%), nechat rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou na teplotu přibližně 50 °C.
- 2) Přidat ethidium-bromid (výsledná koncentrace v gelu 0,5 µg na 1 ml).
- 3) Gel nalít do předem připravené formy, vložit hřeben a nechat ztuhnout.
- 4) Gel vložit do elektroforetického tanku naplněného 1× TAE pufrém. Do vzniklých jamek nanést 10 µl PCR sekundárního produktu a 2× 10 µl ladderu.
- 5) Nastavit napětí na 70 V a spustit na dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA.
- 6) Pro vizualizaci DNA fragmentů použít UV transiluminátor.

4.6.4. Příprava vzorků na sekvenaci

K přípravě byl použit kit BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. Pro každý primer byla namíchána reakční směs (viz níže). V tabulce 7 je uveden amplifikační program. Vzorky byly sekvenovány z obou stran za použití primerů pro sekundární PCR.

Složení reakční směsi:

- PET 2 μ l
- Pufř (5 \times) 4 μ l
- Primer 1 μ l
- PCR produkt (sekundární PCR) 5 μ l
- PCR H₂O 8 μ l

Tabulka 7: **Amplifikační program pro termocycler (Bioer, Krd)**

30 cyklů	Denaturace	94 °C	10 s
	Nasedání primerů	50 °C	5 s
	Dosyntetizování	60 °C	4 min.

PRACOVNÍ POSTUP:

- 1) K produktu sekvenční PCR přidat 1 μ l glykogenu pro zviditelnění peletu.
- 2) Napipetovat 5 μ l 0,1 M EDTA a 60 μ l 96% etanolu.
- 3) Vzorek protřepat a inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě.
- 4) Centrifugovat po dobu 30 minut při 4 °C (21910 g).
- 5) Odsát supernatant a vysráženou DNA vysušit při laboratorní teplotě po dobu přibližně 30 minut.
- 6) Odeslat k sekvenování (komerční laboratoř, Macrogen, Soul, Jižní Korea).

Získané sekvence byly upraveny v programu Chromas Pro, Bioedit a Clusal X a srovnány se sekvencemi uloženými v GenBank.

4.6.5. PCR-RFLP analýza kryptosporidií

Pro rozlišení jednotlivých druhů kryptosporidií byla použita metoda PCR-RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů). Pro restriční analýzu bylo použito 10 μ l sekundárního PCR produktu do 30 μ l reakce obsahující 10 U *SspI* nebo 10 U *VspI* restričního enzymu (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) a 3 μ l restričního pufřu. Inkubace 8 hod. při 37 °C.

5. VÝSLEDKY

5.1. KRYPTOSPORIDIE

V průběhu sledování bylo vyšetřeno ze 3 farem celkem 127 vzorků trusu sajících selat, 122 vzorků trusu odstavených selat, 123 vzorků trusu z předvýkrmu a 39 vzorků trusu prasnic.

Z celkového počtu 411 vzorků bylo 84 pozitivních (20 %). Počet a procento pozitivních zvířat v jednotlivých věkových kategoriích je uveden v tabulce 8. Kryptosporidiové infekce byly nalezeny na všech třech farmách, kdy výskyt na farmě ve Velkém Pěčíně byl statisticky významně nejvyšší ($P < 0,05$). Na základě mikroskopického vyšetření byl nejvyšší výskyt zaznamenán v kategorii odstav (27 %). Pouze jedno z pozitivních selat trpělo průjmem. To znamená, že v tomto případě nebylo prokázáno spojení mezi průjmem a kryptosporidiovými infekcemi ($P < 0,001$). Nejmladší sele, u kterého byly v trusu nalezeny oocysty kryptosporidií, bylo 7 dní staré.

Tabulka 8: Frekvence výskytu oocyst kryptosporidií v jednotlivých věkových kategoriích prasat

KATEGORIE	VYŠETŘENO	NEGATIVNÍ	POZITIVNÍ	PRŮJEM	BEZ PRŮJMU	PRŮJEM POZITIVNÍ
Selata	127	96	31 (24 %)	9	118	0
Odstav	122	89	33 (27 %)	9	113	1
Předvýkrm	123	104	19 (15 %)	8	115	0
Prasnice	39	38	1 (3 %)	0	39	0
CELKEM	411	327	84 (20 %)	26	385	1

5.1.1. Intenzita kryptosporidiových infekcí

U pozitivních vzorků byla na základě hodnocení kvantitativní metodou určena intenzita infekce. Tabulka 9 uvádí intenzitu infekce v jednotlivých kategoriích. Lze si povšimnout, že nejčastěji se vyskytovaly ojedinělé infekce, tedy do 10^3 oocyst/g trusu (OPG).

Tabulka 9: **Intenzita infekce v jednotlivých věkových kategoriích prasat**

Kategorie	Negativní	Intenzita infekce			
		Oj.	+	++	+++
Selata	96	17	2	11	1
Odstav	89	24	5	4	0
Předvýkrm	104	19	0	0	0
Prasnice	38	0	1	0	0

5.1.2. Frekvence výskytu na jednotlivých farmách

5.1.2.1. Velký Pěčín

Na farmě ve Velkém Pěčíně bylo odebráno celkem 138 vzorků trusu (63 vzorků od selat, 51 vzorků z kategorie odstav, všechny selata ve stáří 1-9 týdnů a 24 vzorků od prasnic). Z tohoto počtu bylo 44 vzorků pozitivních (32 %), a to 43 vzorků u selat a 1 vzorek u prasnice. Nejmladší z pozitivních selat bylo sedmidenní. Nejvyšší frekvence výskytu byla zaznamenána u selat v 5. týdnu věku (graf 1). Žádné z pozitivních selat netrpělo průjmem.

5.1.2.2. Jersice

Na této farmě bylo odebráno celkem 150 vzorků trusu (64 vzorků od selat, 71 vzorků z kategorie odstav, všechny selata ve stáří 1-8 týdnů a 15 vzorků od prasnic). Na základě mikroskopického vyšetření byla přítomnost oocyst potvrzena ve 21 vzorcích trusu (14 %), všechny vzorky pocházely od selat. Nejmladší z pozitivních selat bylo ve věku 12 dní. Nejvyšší frekvence výskytu byla opět zaznamenána u selat v 5. týdnu věku stejně jako u předchozího chovu (graf 1). Pouze jedno z pozitivních selat trpělo průjmem.

5.1.2.3. Malý Pěčín

Na farmě v Malém Pěčíně bylo odebráno celkem 123 vzorků trusu z kategorie předvýkrm. Následným vyšetřením bylo 19 vzorků určeno jako pozitivních (15 %). Žádné z pozitivních selat netrpělo průjmem.

5.1.3. Molekulární charakterizace

Na základě molekulárních analýz byly všechny pozitivní vzorky zpracovány a následně vyhodnoceny.

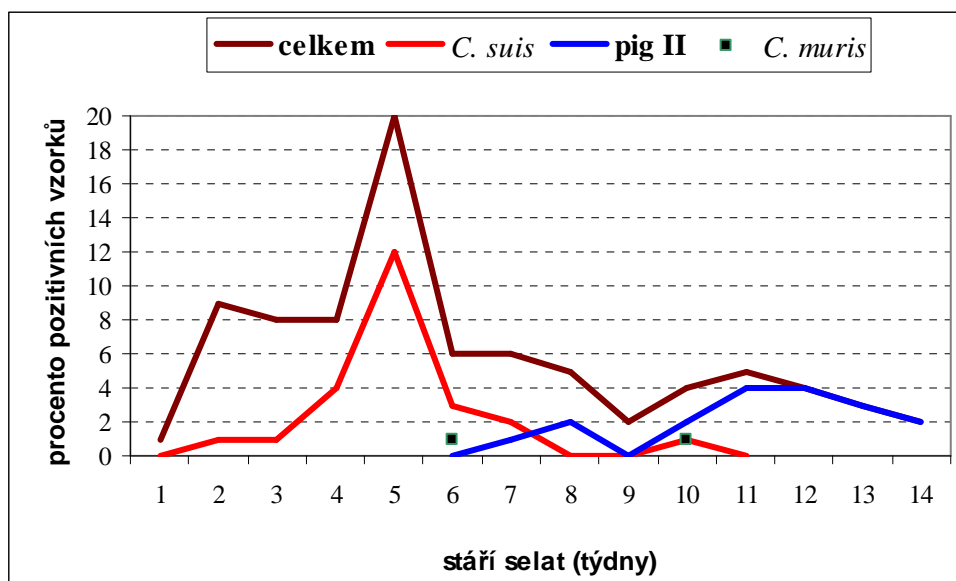
U 23 vzorků trusu (27 %) byl potvrzen druh *Cryptosporidium suis*. V grafu 1 lze pozorovat, že tento druh kryptosporidie se vyskytoval převážně u selat ve stáří 5 týdnů. Jeho první výskyt byl pozorován u selete ve stáří přibližně 2 týdnů věku, naopak nejstaršímu seleti bylo 10 týdnů.

Dalším druhem nalezeným na těchto farmách byl *Cryptosporidium pig* genotyp II. Celkem byl potvrzen u 16 vzorků (19 %). Vyskytoval se převážně v kategorii předvýkrmu, tj. u selat ve stáří 9 až 14 týdnů.

U dalších 2 vzorků trusu, selete po odstavu a selete v předvýkrmu, byl nalezen druh kryptosporidie, netypický pro prasata, *Cryptosporidium muris*.

Ve všech případech se jednalo o monoinfekce. U zbývajících pozitivních vzorků se nepodařilo druh kryptosporidií určit.

Graf 1: Výskyt jednotlivých druhů kryptosporidií



5.2. MIKROSPORIDIE

V průběhu sledování bylo vyšetřeno ze 3 farem celkem 88 vzorků trusu sajících selat, 103 vzorků trusu odstavených selat, 122 vzorků trusu z předvýkrmu a 29 vzorků trusu prasnic.

Z celkového počtu 342 vzorků trusu bylo 258 vzorků pozitivních (75 %). Počet a procento pozitivních zvířat v jednotlivých věkových kategoriích je uveden v tabulce 10. Mikrosporidiové infekce byly nalezeny na všech třech farmách, kdy výskyt na farmě v Malém Pěčíně byl statisticky nejvýznamnější ($P < 0,05$). Procento pozitivních vzorků je ve všech kategoriích poměrně vysoké. Nejvyšší frekvence výskytu byla zaznamenána u kategorie předvýkrmu (87 %). Na základě PCR diagnostiky bylo zjištěno, že při mikroskopické diagnostice nedochází k odhalení velmi nízkých intenzit infekce, které jsou následně vyhodnoceny jako negativní. Proto lze tedy odhadovat, že skutečná prevalence v jednotlivých kategoriích je vyšší o 10 až 20 %. V tabulce 11 je srovnání těchto dvou metod, mikroskopické vyšetření vs. PCR.

Nejmladší sele, u kterého byly mikroskopicky potvrzeny spory mikrosporidií, bylo 1 den staré.

Tabulka 10: Frekvence výskytu spor mikrosporidií u různých věkových kategorií prasat

KATEGORIE	VYŠETŘENO	NEGATIVNÍ	POZITIVNÍ	PRŮJEM	BEZ PRŮJMU	PRŮJEM POZITIVNÍ
Selata	88	24	64 (73 %)	7	81	2
Odstav	103	37	66 (64 %)	9	94	4
Předvýkrm	122	17	105 (86 %)	8	114	6
Prasnice	29	6	23 (79 %)	0	29	0
CELKEM	342	84	258 (75 %)	24	318	12

Tabulka 11: Frekvence *Enterocytozoon bieneusi* v různých věkových kategoriích prasat na jednotlivých farmách, použití světelné mikroskopie a genotypizace (Sak a kol. 2008)

	věkové kategorie	vyšetřeno		genotypy F/D/Peru 9
		microskopie (pozitivní/vyšetřeno)	PCR	
Jersice	selata	19/21	21/21	21/0/0
	odstav	10/13	13/13	13/0/0
	prasnice	7/11	9/11	9/0/0
Velký Pěčín	selata	9/10	10/10	8/0/2
	odstav	2/3	2/3	2/0/0
	prasnice	3/4	3/4	3/0/0
Malý Pěčín	předvýkrm	15/17	16/17	14/2/0

5.2.1. Intenzita mikrosporidiových infekcí

Na základě semikvantitativní metody byla u pozitivních vzorků hodnocena intenzita infekce. Ve všech věkových kategoriích, kromě kategorie předvýkrmu, kde se vyskytovaly převážně silné infekce, se jednalo o infekce střední intenzity (tabulka 12).

Tabulka 12: **Intenzita infekce v jednotlivých věkových kategoriích prasat**

Kategorie	Negativní	Intenzita infekce		
		slabá	střední	silná
Selata	24	15	37	12
Odstav	37	10	47	9
Předvýkrm	17	17	39	49
Prasnice	6	4	10	9

5.2.2. Frekvence výskytu na jednotlivých farmách

5.2.2.1. Velký Pěčín

Na této farmě bylo odebráno pro vyšetření celkem 108 vzorků trusu (44 vzorků od selat, 46 vzorků z kategorie odstav, všechna selata ve stáří 1-9 týdnů a 18 vzorků od prasnic). Z tohoto počtu bylo 71 vzorků pozitivních (66 %). Nejvyšší výskyt byl zaznamenán u selat ve věku 4 a 5 týdnů a také u prasnic (graf 2). Z celkového počtu pozitivních selat pouze dvě trpěla průjmem. Nejmladší sele, u kterého byla zjištěna infekce, bylo 1 den staré.

5.2.2.2. Jersice

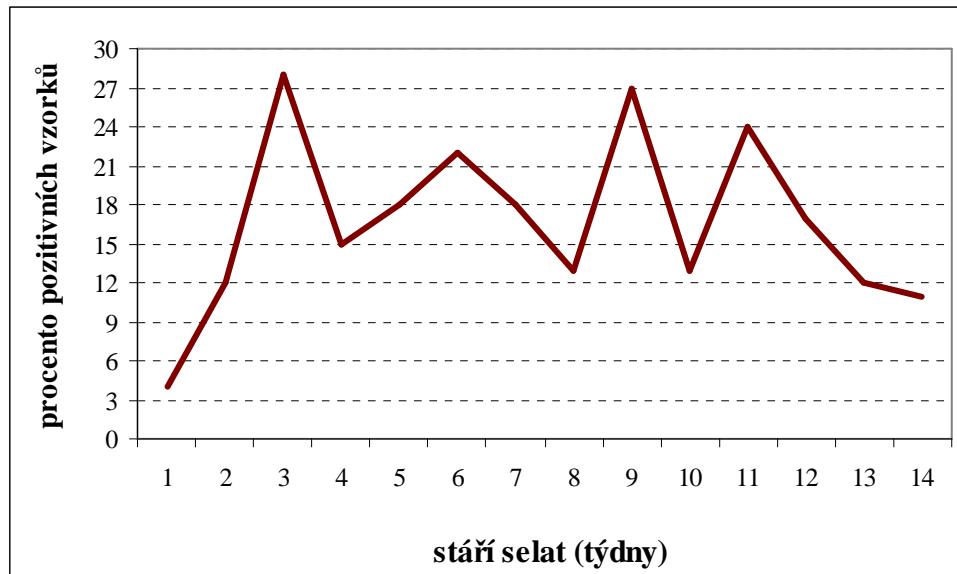
Na farmě v Jersicích bylo odebráno celkem 112 vzorků trusu (44 vzorků od selat, 57 vzorků z kategorie odstav, všechna selata ve stáří 1-8 týdnů a 11 vzorků od prasnic). Po následném mikroskopickém vyšetření bylo 82 vzorků určeno jako pozitivních (73 %). Nejvíce byla infekce zaznamenána u selat ve 3 týdnech stáří (graf 2). Nejmladšímu z pozitivních selat bylo 8 dní věku. Průjmem trpěla 4 pozitivní selata.

5.2.2.3. Malý Pěčín

Na této farmě bylo odebráno celkem 122 vzorků trusu. Z tohoto počtu bylo 104 vzorků po mikroskopickém vyšetření označeno jako pozitivní (85 %). Jak je již výše

napsáno, jedná se o kategorii a také farmu s nejvyšším výskytem ze všech uvedených. Průměrem trpělo celkem 6 pozitivních selat.

Graf 2: Výskyt mikrosporidií



5.2.3. Genotypizace

Vzhledem ke značné finanční nákladnosti je tato práce soustředěna pouze na genotypizaci druhu *Enterocytozoon bieneusi*.

Na základě sekvencí internal transcribed spacer (ITS) byla prokázána přítomnost 3 různých genotypů v náhodně vybraných vzorcích trusu. Ve většině případů se jednalo o genotyp F, který byl zjištěn u všech věkových kategorií. Po dvou případech byl nalezen genotyp D, a to u kategorie předvýkrmu a genotyp Peru 9 u kategorie sajících selat (tabulka 11).

6. DISKUSE

6.1. KRYPTOSPORIDIE

Kryptosporidiové infekce se u prasat vyskytují v různě vysokých prevalencích. V této práci bylo mikroskopickou analýzou potvrzeno 20 % pozitivních z celkového počtu 411 vzorků. Podobné výsledky uvádí pouze Suaréz-Luengas a kol. 2007, a to 22,5 % pozitivních vzorků (ze 142 vzorků). Naopak Chen a Huang 2007 popsali 12% prevalenci (ze 1488 vzorků). Zintl a kol. 2007 uvádějí 5-12% prevalenci (z 342 vzorků).

Co se týče klinických příznaků, je střevní kryptosporidióza obecně spojována s klinickými projevy, zejména s průjmovým onemocněním (O'Donoghue 1995). Na rozdíl od kryptosporidiózy jiných hospodářských zvířat (telata, jehňata) (Rommel a kol. 2000) probíhá onemocnění u prasat ve většině případů spíše jako asymptomatické (Xiao a kol. 1994, Quílez a kol. 1996, Wieler a kol. 2001, Ryan a kol. 2003, Guselle a kol. 2003, Vítovec a kol. 2006, Chen a Huang 2007). V souladu s těmito výsledky jsme v naší práci neprokázali vztah mezi kryptosporidiovými infekcemi a průjmovým onemocněním. Navíc nebyla podrobnou analýzou dat zjištěna souvislost mezi průjmovým onemocněním a infekcí způsobenou druhem *C. suis* nebo *Cryptosporidium* pig genotype II kryptosporidií, které dle našich výsledků mají věkovou specifitu (viz níže).

Nejen u prasat, ale i u ostatních hospodářských zvířat je velmi často diskutován sezónní výskyt kryptosporidiových infekcí. Obecně lze konstatovat, že názory na tuto problematiku se výrazně liší. Na základě našich zjištění, stejně jako Hamnes a kol. (2006), nemůžeme sezónnost výskytu potvrdit. Naopak Yu a Seo (2004), Chen a Huang (2007) a Maddox-Hyttel a kol. (2006) uvádějí výrazně vyšší výskyt v zimním období než v letním a Wolfson a kol. (1985) a Chai a kol. (2001) popsali nejvyšší výskyt v letním období. Dle našeho názoru jsou tyto údaje do jisté míry neporovnatelné, protože s geografickou polohou států se výrazně liší klimatické podmínky, což do jisté míry může ovlivňovat tento ukazatel.

Navíc způsob chovu a použité technologie se v jednotlivých případech značně liší a může ovlivnit dynamiku výskytu v jednotlivých ročních obdobích. Maddox-Hyttel a kol. (2006) potvrdili rozdíly ve výskytu infekcí mezi dvěma technologiemi ustájení, kdy v chovech s roštovou podlahou byl zaznamenán výskyt nižší než v případě chovu s pevnou podlahou. Ke stejným výsledkům došli také Xiao a kol. 1994. V našem

sledování jsme vliv technologie nemohli vyhodnotit, jelikož ve všech námi vyšetřovaných stájích byla použita shodná technologie.

Obecně lze říci, že kryptosporidiové infekce u prasat se nejčastěji vyskytují v období před a po odstavu, méně pak u sajících selat (Quílez a kol. 1996, Morgan a kol. 1999, Guselle a kol. 2003, Vítovec a kol. 2006, Chen a Huang 2007, Suárez-Luengas a kol. 2007). Nejmladším infikovaným zvířetem, u kterého jsme v trusu našli oocysty kryptosporidií, bylo sedmi-denní sele. Tento nález se shoduje s údaji, které uvádí Xiao a kol. (1994) a Vítovec a kol. (2006). Chen a Huang 2007 zaznamenali první příznaky infekce již u selete starého 3 dny.

Nejvyšší výskyt kryptosporidiových infekcí jsme zaznamenali v období okolo 5. týdne věku, tedy v období odstavu, což odpovídá údajům Ryan a kol. (2003), kteří popsali nejvyšší výskyt kryptosporidiových infekcí ve věku mezi 5.-8. týdnem věku a Maddox-Hyttel a kol. (2006) mezi 6.-12. týdnem věku. Naopak Zintl a kol. (2007) a Langkjaer a kol. (2007) uvádějí vyšší výskyt infekcí u sajících selat než u kategorie selat odstavených. Jedním z možných vysvětlení vyššího výskytu infekce u odstavených selat by mohl být stres spojený s odstavením od matky, kdy se selata stávají více náchylná. Dalším možným vysvětlením může být ztráta pasivní imunity, kterou si sele vytvoří přijímáním mleziva a která jej chrání do 21. dne věku, kdy se začíná tvořit vlastní imunita. Toto nahrává právě kryptosporidiím, které se jako oportunní parazité uplatňují při jakémkoli oslabení organismu.

Do roku 1998 byl za jediného původce kryptosporidiózy u prasat považován druh *Cryptosporidium parvum* s infektivitou pro všechny věkové kategorie prasat. S popisem nových, hostitelsky specifických druhů kryptosporidií se pohled na prasečí kryptosporidiózu mění (Morgan a kol. 1998, Ryan a kol. 2003, 2004). Druh *C. suis* se vyskytuje převážně u sajících selat, na rozdíl od *Cryptosporidium pig* genotype II, který postihuje spíše starší kategorie prasat (Langkjaer a kol. 2007, Suarez-Luengas a kol. 2007, Zintl a kol. 2007). Sporadicky mohou tyto druhy postihovat také prasata ve výkrmu nebo prasnice. V našem případě byl nejvyšší výskyt *C. suis* zaznamenán u sajících a odstavených selat, nejvíce ve věku 5 týdnů. Výskyt *Cryptosporidium pig* genotype II byl nejvyšší u selat v předvýkrmu ve věku 9-14 týdnů. Velmi zajímavý je fakt, že se nám podařilo identifikovat *C. suis* i u selete 10 týdnů starého a naopak *Cryptosporidium pig* genotype II u selete ve věku 7 týdnů, tedy u kategorií hostitelsky nespécifických pro tento druh/genotyp kryptosporidií.

I když byla infektivita *C. parvum* pro prasata potvrzena experimentálně (Moon a Bemrick 1981, Tzipori a kol. 1982, Vítovec a Koudela 1992), případy přirozených nálezů tímto druhem byly publikovány jen ojediněle (Quílez a kol. 1996, Morgan a kol. 1999, Izumiama a kol. 2001, Zintl a kol. 2007). V našem sledování jsme se se žádným případem infekce způsobené druhem *C. parvum* nesešli.

V souladu s již dříve publikovanými daty byly v trusu dvou selat nalezeny oocysty žaludeční kryptosporidie *Cryptosporidium muris* (Xiao a kol. 2006, Zintl a kol. 2007). Tento druh kryptosporidie je hostitelsky specifický pro hlodavce (Iseki a kol. 1989, Taylor a kol. 1999, Kváč a kol. 2008) a některé přežvýkavce (Kváč a kol. 2008). Vzhledem k ojedinělosti nálezů nelze v těchto případech jednoznačně určit, zda se jednalo o přirozenou infekci nebo pouze pasáž oocyst zažívacím traktem prasat vzniklé pozřením uhynulých hlodavců nebo jejich trusu. Navíc Xiao a kol. (2006) izolovali DNA přímo z kejdy, která mohla být kontaminována trusem hlodavců infikovaných tímto druhem kryptosporidie. Z těchto důvodů nelze těmto nálezům přiřadit větší význam, až do doby, kdy bude vnímavost prasat jednoznačně potvrzena ať histologickými metodami nebo experimentálními přenosy.

6.2. MIKROSPORIDIE

O prevalenci a výskytu mikrosporidiových infekcí v chovech prasat je do současné doby známo velmi málo. Mikrosporidiové infekce zůstávají často nepovšimnuty, protože klinické příznaky nejsou tak výrazné a odhalení těchto infekcí vyžaduje speciální vyšetřovací metody, které nejsou součástí běžného parazitologického vyšetření.

V České republice doposud neexistují žádná data o výskytu těchto infekcí v chovech prasat. Jedním z cílů této práce proto bylo určit přítomnost mikrosporidiových infekcí u prasat, zvláště pak druhu *E. bienersi*.

Celková prevalence u námi vyšetřovaných prasat byla 75 % z celkového počtu 342 vzorků trusu. Ve všech věkových kategoriích byl poměr podobný a významně vyšší než všechna data uvedená dříve.

Ve Švýcarsku byla popsána 35% prevalence *E. bienersi* (ze 109 vzorků) na prasečích farmách s převahou výskytu u kategorie odstav (Breitenmoser a kol. 1999). U většiny izolátů se jednalo o genotyp F. Obdobné výsledky prezentovali Buckholt a kol. (2002), kteří popsali 32% pozitivitu vzorků trusu (z 202 vzorků) v 18-měsíčním studiu u prasat na jatkách v USA. Podobnou hodnotu prevalence, jaká je uváděna v této práci, uvádějí Rinder a kol. (2000), kteří v rámci malé skupiny 6 prasat, která trpěla silným průjmem a zaostáváním v růstu určili celkem 4 (67 %) z těchto prasat jako pozitivní. Vypovídací hodnota tohoto údaje je však velmi nízká. Na rozdíl od výše uvedených autorů se v našem případě jednalo o komplexní vyšetření jednoho chovu.

Stejně jako výsledky předchozích studií i naše výsledky potvrdily, že *E. bienersi* genotyp F je nejčastěji se vyskytující mikrosporidii v chovech prasat. Tento genotyp nepředstavuje pro lidi žádné nebezpečí na rozdíl od dalších námi nalezených genotypů D a Peru 9. Oba tyto genotypy byly z důvodu své nevyhraněné hostitelské specifity v minulosti popsány jako původci lidské mikrosporidie (Liguory a kol. 1998, Espern a kol. 2007).

Na základě námi zjištěných faktů lze konstatovat, že selata mohou získat infekci od svých matek pravděpodobně již ve velmi nízkém věku, ačkoliv specifické způsoby přenosu nejsou doposud známy. Vzhledem k dlouhodobé chronické formě onemocnění, která u prasat probíhá, se do prostředí dostává velké množství spor, které představují zdroj infekce pro vnímavá prasata, resp. selata. Jedním z možných způsobů nakažení

může být přenos fekálně orální cestou, např. sáním z kontaminovaných struků nebo přijímáním fekálního materiálu, tak i prostřednictvím přímého kontaktu s trusem matky.

Jakým způsobem se však nakazí selata od matek, které pozitivní nejsou, je zatím nejasné. V tomto případě bude zdrojem infekce pro selata nejspíše stájové prostředí.

7. ZÁVĚR

Tato kapitola představuje celkové shrnutí výskytu kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí ve vybraných chovech prasat:

- Celková prevalence kryptosporidiových infekcí činila 20 %.
 - Nejvyšší výskyt kryptosporidií byl zaznamenán v kategorii odstav (27 %).
 - Nebyl neprokázán vztah mezi kryptosporidiovými infekcemi a průjmovým onemocněním, navíc ani souvislost mezi průjmovým onemocněním a infekcí druhem *C. suis* a genotypu *Cryptosporidium* pig genotype II.
 - Prasata se infikují ve velmi krátké době po narození.
 - Intenzita infekce je ve většině případů slabá.
 - Na základě molekulárních analýz byl popsán výskyt druhu *Cryptosporidium suis* s výskytem převážně u selat do odstavu a genotypu *Cryptosporidium* pig genotype II s věkovou specifitou na zvířata po odstavu
 - Byly popsány přirozené „infekce“ druhem *Cryptosporidium muris*.
 - Ve všech případech se jednalo o monoinfekce.
-
- Celková prevalence mikrosporidiových infekcí byla 75 %.
 - Nejvyšší výskyt byl zaznamenán v kategorii předvýkrmu (87 %).
 - Byla prokázána vyšší citlivost molekulárních metod oproti klasické mikroskopii o cca 10%-20%.
 - Nejmladším seletem, u kterého se mikroskopicky potvrdily spory mikrosporidií, bylo 1 den staré.
 - Mikrosporidióza způsobená *E. bienersi* probíhá ve většině případů jako inaparentní onemocnění se střední intenzitou infekce. Byla prokázána přítomnost 3 různých genotypů v náhodně vybraných vzorcích trusu. Ve většině případů se jednalo o zvířecí genotyp F, další dva byly lidské genotypy D a Peru 9.

8. SUMMARY

The cryptosporidia and microsporidia are worldwide spread opportunistic parasites. With regard to their wide host spectra and zoonotic potential there is a significant risk for immunocompromised humans, especially AIDS patients.

Natural *Cryptosporidium* infections in pigs are widespread but generally apathogenic. A total of 411 faecal samples, 39 of sows, 127 of pre-weaned, 122 of post-weaned piglets and 123 of pre-growers from three farms were screened for *Cryptosporidium* spp. infection using the aniline-carbol-methyl violet staining method and positive molecular characterized (direct sequencing of partial SSU rRNA partial genes and PCR-RFLP at the SSU rRNA). Overall, infections were detected in 84 out of 411 animals (20 %), with highest infection rates among post-weaners (27 %). All positive samples were genotyped based on SSU rRNA sequence analysis. *C. suis*, *Cryptosporidium* pig genotype II, and *C. muris* were detected.

The microsporidial infections are very frequent in breeds of pigs. Pigs have been frequently reported to be infected with *E. bienewisi*. Spores were detected in 258 samples of 342 (75 %). The high prevalence was determined in pre-growers (86 %). Genotyping based on the ITS regions of the rRNA gene identified that most pigs were infected with the species-specific genotype F, while two animals had the zoonotic genotype D and two had genotype Peru 9.

9. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

Anderson B. C. 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.*, 24:235-238.

Atwill E. R., Sweitzer R. A., Pereira M. G., Gardner I. A., Van Vuren D., Boyce W. M. 1997. Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:3946-3949.

Becnel J. J., Andreadis T. G. 1999. Microsporidia of insects. In: The microsporidia and microsporidiosis. Wittner M., Weiss L. (Eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D. C., pp. 447-501.

Bergeland M. E. 1977. Necrotic enteritis in nursing piglets. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, 20:151-158.

Betancourt W. Q., Rose J. B. 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.*, 126:219-234.

Blanshard C., Ellis D. S., Tovey D. G., Dowell S., Gazzard B. G. 1992. Treatment of intestinal microsporidiosis with albendazole in patients with AIDS. *AIDS* 6:311-313.

Bornay-Llinares F. J., da Silva A. J., Moura H., Schwarts D. A., Visvesvara G. S., Pieniazek N. J., Cruz-Lopez A., Hernandez-Jaurequi P., Guerrero J., Enriquez F. J. 1998. Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *J. Infect. Dis.*, 178:820-826.

Breitenmoser A. C., Mathis A., Burgi E., Weber R., Deplazes P. 1999. High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. *Parasitology*, 118:447-453.

Bryan T. D., Schwartz D. A. 1999. Epidemiology of microsporidiosis. In: The microsporidia and microsporidiosis. Wittner M., Weiss L. (Eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D. S., pp. 502-516.

Buckholt M. A., Lee J. H., Tzipori S. 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at slaughterhouse in Massachusetts. Appl. Environ. Microbiol., 68:2595-2599.

Cali A., Kotler D. P., Orenstein J. M. 1993. *Septata intestinalis* n. g., n. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhoea and dissemination in AIDS patients. J. Eukaryot. Microbiol., 40:101-112.

Cali A., Takvorian P. M. 1999. Development morphology and life cycles of microsporidia. In: The microsporidia and microsporidiosis. Wittner M., Weiss L. (Eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D. C., pp. 85-128.

Cama V. A., Ross J. M., Crawford S., Kakai V., Chavez-Valdez R., Vargas D., Vivar A., Tichna E., Navincopa M., Williamson J., Ortega Y., Gilman R. H., Bern C., Xiao L. 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. J. Infect. Dis., 196:684-691.

Canning E. U., Hollister W. S. 1987. Microsporidia of mammals-widespread pathogens or opportunistic curiosities? Parasitol. Today, 3:267-273.

Canning E. U., Lom J. 1986: The microsporidia of vertebrates. Academic Press, Inc., NY, USA.

Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc., 73:203-266.

Coates S. J. W. 1991. Cryptosporidiosis in weanling piglets with enteritis. Can. Vet. Journal, 32:181.

Cotte L., Rabodonirina M., Chapuis F., Bailly F., Bissuel F., Raynal C., Gelas P., Persat F., Piens M. A., Trepo C. 1999. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, 180:2003-2008.

Current W. L. 1988. The biology of *Cryptosporidium*. *Am. Soc. Microbiol. News*, 54:605-611.

Current W. L., Blagburn B. L. 1990. *Cryptosporidium*: infections in man and domesticated animals. In: *Coccidiosis of man and domestic animals*. Long P. L. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 155-185.

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.

Del Aguila C., Izquierdo F., Haro M., Bernardo R., Rueda C., Andras I., Alonso F., Ponce F., Fenoy S., Henriques N. 2004. Zoonotic potential of microsporidiosis in Spain. In: *Emergent pathogens in the 21st century: firsts united work shop on microsporidia from invertebrate and vertebrate hosts*, České Budějovice, 12-15 July 2004, pp. 200.

Del Aguila C., Izquierdo F., Navajas R., Pieniazek N. J., Miro G., Alonso A. I., Da Silva A. J., Fenoy S. 1999. *Enterocytozoon bieneusi* in animals: rabbits and dogs as new hosts. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46:8S-9S.

Dengjel B., Zahler M., Hermanns W., Heinritzi K., Spillmann T., Thomschke A., Loscher T., Gothe R., Rinder H. 2001. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *J. Clin. Microbiol.* 39:4495-4499.

Deplazes P., Mathis A., Baumgartner R., Tanner I., Weber R. 1996a. Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clin. Infect. Dis.*, 22:557-559.

Deplazes P., Mathis A., Muller C., Weber R. 1996b. Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. J. Eukaryot. Microbiol., 43:S93-S93.

Deplazes P., Mathis A., Weber R. 2000. Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. Contrib. Microbiol., 6:236-260.

Desportes I., Le Charpentier Y., Galian A., Bernard F., Cochand-Prioleet B., Lavergne A., Ravisse P., Modigliany R. 1985. Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n. g., n. sp. in the enterocytes of a human patient with AIDS. J. Protozool., 32:250-254.

Didier E. S., Vossbrinck C. R., Baker M. D., Rogers L. B., Bertucci D. C., Shadduck J. A. 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology, 111:411-421.

Didier E. S., Rogers L. B., Orenstein J. M., Baker M. D., Vossbrinck C. R., van Gool T., Hartskeerl R., Soave R., Beaudet L. M. 1996. Characterization of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. J. Eukaryot. Microbiol., 43:34-43.

Didier E. S., Snowden K. A., Shadduck J. A. 1998. The biology of microsporidian species infecting mammals. Adv. Parasitol., 40:279-316.

Didier E. S., Stovall M. E., Green L. C., Brindley P. J., Sestak K., Didier P. J. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Vet. Parasitol., 126:145-166.

Didier E. S., Weiss L. M. 2006. Microsporidiosis: current status. Curr. Opin. Infect. Dis., 19:485-492.

Dillingham R. A., Lima A. A., Guerrant R. L. 2002. Cryptosporidiosis: Epidemiology and impact. Microb. Infect., 4:1059-1066.

Dowd S. E., Gerba C. P., Pepper I. L. 1998. Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:3332-3335.

Drosten C., Laabs J., Kuhn E. M., Chottelius J. 2005. Interspecies transmission of *Enterocytozoon bieneusi* supported by observations in laboratory animals and phylogeny. *Med. Microbiol. Immunol.*, 194:207-209.

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., Heegard P. M. H., Vigre H., Thamsborg S. M., Lind P. 2003. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the „porcine genotype“. *Parasitology*, 126:407-416.

Esporn A., Morio F., Miegerville M., Illa H., Abdoulaye M., Meyssonier V., Adehossi E., Lejeune A., Cam P. D., Besse B., Gay-Andrieu F. 2007. Molecular study of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. *J. Clin. Microb.*, 45:2999-3002.

Fayer R., Speer C. A., Dubey J. P. 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R. (Ed.). CRC Press., pp. 2-33.

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

Fayer R. 2003. *Cryptosporidium*: From molecules to disease. In: Thompson R. C. A., Armson A., Ryan U. M. (Eds). *Cryptosporidium*: From molecules to disease. Elsevier, pp. 11-18.

Fayer R. 2007. General biology. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R., Xiao L. (Eds.). Publishing CRC Press, pp. 1-35.

Fleta J., Sánchez-Acedo C., Clavel A., Quílez J. 1995. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs. *Vet. Parasitol.*, 59:201-205.

Foster J. C., Glass M. D., Courtney P. D., Ward L. A. 2003. Effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Food Microbiol.*, 20:351-357.

Fournier S., Liguory O., Santillana-Hayat M., Guillot E., Sarfati C., Dumonoutier N., Molina J. M. 2000. Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 29:95-100.

Franzen C. 2005. How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol.*, 52:36-40.

Fretz R., Svoboda P., Ryan U. M., Thompson R. C., Tanners M., Baumgartner A. 2003. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. isolated from human stool samples in Switzerland. *Epidemiol. Infect.*, 131:663-667.

Glass M. D., Courtney P. D., LeJenne J. T., Ward L. A. 2004. Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* cell-free supernatants on cryptosporidium viability in vitro. *Food Microbiol.*, 21:4232-429.

Glaeser C., Grimm F., Mathis A., Weber R., Nadal D., Deplazes P. 2004. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from diarrheic children in Switzerland. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 23:359-361.

Goodstein R. F., Colombo C. S., Illfelder M. A., Skaggs R. E. 1989. Bronchial and gastrointestinal cryptosporidiosis in AIDS. *J. Am. Ostiopath. Assoc.*, 89:195-197.

Green L. C., Didier P. J., Bowers L. C., Didier E. S. 2004. Natural and experimental infection of immunocompromised rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* genotype D. *Microb. Infect.*, 996-1002.

- Guyot K., Follet-Dumoulin A., Lelievre E., Sarmati C., Rabodonirina M., Nevez G., Cailliez J. C., Caus D., Dei-Cas E. 2001.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.*, 39:3472-3480.
- Guselle N. J., Appelbee A. J., Olson M. E. 2003.** Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet. Parasitol.*, 113:7-18.
- Hajdušek O., Ditrich O., Šlapeta J. 2004.** Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Vet. Parasitol.*, 122:183-192.
- Hannes I. S., Gjerde B., Robertson L. 2006.** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet. Parasitol.*, 140:204-216.
- Hannes I. S., Gjerde B. K., Forberg T., Robertson L. J. 2007.** Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Vet. Parasitol.*, 144:222-233.
- Haro M., Izquiero F., Henriques-Gil N., Alonso A. F., Fenoy S., Del Aguila C. 2005.** First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:3153-3157.
- Hartskeerl R. A., van Gool T., Schuitema A. R., Didier E. S., Terpstra W. J. 1995.** Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology*, 110:227-285.
- Hausmann K., Hülsmann N. 2003.** Systém prvoků. V: Protozoologie. Hausmann K., Hülsmann N. (Eds.). Academia nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha, pp. 58-161.

- Heine J., Pohlenz J. F. L., Moon H. W., Woode G. N. 1984.** Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. J. Infect. Dis., 150:768-775.
- Hijjawi N. S., Meloni B. P., Ryan U. M., Olson M. E., Thompson R. C. A. 2002.** Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the classification of *Cryptosporidium*. Int. J. Parasitol., 32:1719-1726.
- Hinnant K., Swartz A., Rotterdam H., Rudsk C. 1989.** Cytomegaloviral and cryptosporidial cholecystitis in two patients with AIDS. Am. J. Surg. Pathol., 13:57-60.
- Homan W., van Gorkom T., Kan Y. Y., Hepener J. 1999.** Characterization of *Cryptosporidium parvum* in human and animal feces by single-tube nested polymerase chain reaction and restriction analysis. Parasitol. Res., 85:707-712.
- Hůrková L., Modrý D. 2003.** *Cryptosporidium muris*-původce žaludeční kryptosporidiózy hlodavců. Veterinářství, 53:230-232.
- Chai J. Y., Kim N. Y., Guk S. M. 2001.** High prevalence and seasonality of cryptosporidiosis in a small rural village occupied predominantly by aged people in the Republic of Korea. Am J. Trop. Med. Hyg., 65:518-522.
- Chalifoux L. V., MacKey J., Carville A., Shvetz D., Lin K. C., Lackner A., Mansfield K. G. 1998.** Ultrastructural morphology of *Enterocytozoon bieneusi* in biliary epithelium of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). Vet. Pathol., 35:292-296.
- Chen F., Huang K. 2007.** Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* in pigs in eastern China. Z. Pub. Health, 54:393-400.
- Iseki M., Maeakawa T., Moriya K., Uni S., Takada S. 1989.** Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. Parasitol. Res., 75:218-222.

Izumiyama S., Furukawa I., Kuroki T., Yamai S., Sugiyama H., Yagita K., Endo T. 2001. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 54:23-26.

Jiang J., Alderisio K. A., Xiao L. 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. Appl. Environ. Microbiol., 71:4446-4454.

Kahn D. G., Garfinkle J. M., Kionoff D. C., Pembroke L. J., Morrow D. J. 1987. Cryptosporidial and cytomegaloviral hepatitis and cholecystitis. Arch. Pathol. Lab. Med., 111:879-881.

Katsumata T., Hosea D., Rahun I. G., Uga S., Yanagi T., Kohno S. 2000. Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. Am. J. Trop. Med. Hyg., 62:70.

Katzwinkel-Wladarsch S., Lieb M., Helse W., Loscher T., Rinder H. 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. Trop. Med. Int. Health, 1:373-378.

Keeling P. J., Luker M. A., Palmer J. D. 2000. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. Mol. Biol. Evol., 17:23-31.

Keeling P. J. 2003. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies from a zygomycete origin of microsporidia. Fung. Gen. Biol., 38:298-309.

Kennedy G. A., Kreitner G. L., Straffuss A. C. 1977. Cryptosporidiosis in three pigs. J. Am. Vet. Med. Assoc., 170:348-350.

Keohane E. M., Weiss L. M. 1999. The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In: The microsporidia and microsporidiosis. Wittner M., Weiss L. (Eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D. C., pp. 196-224.

- Kotler D. P., Orenstein J. M. 1994.** Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. *Am. J. Gastroenterol.*, 89:1998-2002.
- Kolter D. P., Orenstein J. M. 1998.** Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In: *Advances in Parasitology*. Baker J. R., Muller R., Rollinson D. (Eds.). Academic Press, San Diego, CA, pp. 321-349.
- Kondova I., Mansfield K., Buckholt M. A., Stein B., Widmer G., Carville A., Lackner A., Tzipori S. 1998.** Transmission and serial propagation of *Enterocytozoon bieneusi* from humans and rhesus macaques in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.*, 66:5515-5519.
- Koudela B., Vítovec J., Dat D. T., Lan P. D. 1986.** Preliminary communication on cryptosporidiosis of pigs in Vietnam. *Folia Parasitol.*, 33:301-304.
- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Hofmannová L., Modrý D., Vítovec J., Xiao L. 2008.** Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Vet. Parasitol.*, 153: 363-367.
- Langkjaer R. B., Vigre H., Enemark H. L., Maddox-Hyttel C. 2007.** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology*, 134:339-350.
- Larsson J. I. R. 1999.** Identification of microsporidia. *Acta Protozool.*, 38:161-197.
- Leoni F., Amar C., Nichols G., Pedraza-Díaz S., McLauchlin J. 2006.** Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.*, 55:703-707.
- Levaditi C., Nicolau S., Shoen R. 1923.** L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *C. R. Soc. Biol. Paris.*, 89:984-986.

Liguory O., David F., Sarfati C., Derouin F., Molina J. M. 1998. Determination of types of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from patients with intestinal microsporidiosis. J. Clin. Microbiol., 36:1882-1885.

Lores B., del Aguila C., Arias C. 2002a. *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. Mem. Instit. Oswaldo Cruz, 97:941-945.

Lores B., L'opez-Miragaya I., Arias C., Fenoy S., Torres J., Del'Aguila C. 2002b. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virusnegative patients from Vigo, Spain. Clin. Infect. Dis., 34:918-921.

Lowery C. J., Millar B. C., Moore J. E., Xu J., Xiao L., Rooney P. J., Crothers L., Dooley J. S. 2001. Molecular genotyping of human cryptosporidiosis in Northern Ireland: epidemiological aspects and review. Ir. J. Med. Sci., 170:246-250.

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* infections transmitted through the public water supply. n. Eng. J. Med., 331:161-167.

Maddox-Hyttel C. H., Langskjaer R. B., Enemark H. L., Vigre H., 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs. Occurrence and management associated risk factors. Vet. Parasitol., 141:48-59.

Mansfield K. G., Carville A., Herbert D., Chalifoux L., Shvertz D., Lin K. C., Tzipori S., Lackner A. A. 1998. Localization of persistent *Enterocytozoon bieneusi* infection in normal rhesus macaques (*Macaca mulatta*) to the tree. J. Clin. Microbiol., 36:2336-2338.

Mallon M., MacLeod A., Wastling J., Smith H., Reilly B., Tait A. 2003. Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. J. Mol. Evol., 56:407-417.

- Mathis A., Breitenmoser A. C., Deplazes P. 1999.** Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat. *Parasitology*, 6:189-193.
- Mathis, A., Weber R., Deplazes P. 2005.** Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18:423-445.
- Matsubayashi H., Koike T., Mikata I., Takei H., Hagiwara S. 1959.** A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Arch. Pathol.*, 67:181-187.
- Meisel J. L., Perera D. R., Meligro C., Rubin C. E. 1976.** Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in a immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70:1156-1160.
- 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.
- Mohn S. F., Landsverk T., Nordstoga K. 1981.** Encephalitozoonosis in the blue fox-morphological identification of the parasite. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 89:117-122.
- Mohn S. F., Nordstoga K., Dishington I. W. 1982.** Experimental encephalitozoonosis in the blue fox. Clinical, serological and pathological examination of vixens after oral and intrauterine inoculation. *Acta Vet. Scand.*, 23:490-502.
- Moon H. W., Bemrick W. J. 1981.** Fecal transmission of calf cryptosporidia between calves and pigs. *Vet. Pathol.*, 18:248-255.
- Morfitt D. C., Pohlenz J. F. L. 1989.** Porcine colonic lymphoglandular complex: distribution, structure and epithelium. *Am. J. Anat.*, 184:41-45.
- Morgan U. M., Buddle J. R., Armson A., Elliot A., Thompson R. C. A. 1999.** Molecular and biological characterization of *Cryptosporidium* in pigs. *Aust. Vet. J.*, 77:44-47.

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

Morgan U. M., 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.

Nägeli K. W. 1857. Ueber die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. Bot. Z., 15:760-761.

Nime F. A., Burek J. D., Page D. L., Holscher M. A., Yardley J. H. 1976. Acute enterocolitis in human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. Gastroenterology, 70:592-598.

Nordstoga K. 1972. Nosematosis in the blue fox. North. Vet. Med., 24:21-24.

Núñez A., McNeilly F., Perea A., Sánchez-Cordón P. J., Huerta B., Allan G., Carrasco L. 2003. Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2. J. Vet. Med. B., 50:255-258.

O'Donoghue P. J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. J. Parasitol., 25:139-195.

Olson M. E., Thorlakson C. L., Deselliers L., Morck D. W., McAllister T. A. 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. Vet. Parasitol., 68:375-381.

Orenstein J. M., Chiang J., Steinberg W., Smith P. D., Rotterdam H., Kotler D. P. 1990. Intestinal microsporidiosis as a cause of diarrhea in human immunodeficiency virus-infected patients: a report of 20 cases. Hum. Pathol., 21:475-481.

- Pancier R. J., Thomassen R. W., Garner F. M. 1971.** Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.*, 8:479-484.
- Pavlásek I. 1981.** First record of *Cryptosporidium* sp. in calves in Czechoslovakia. *Folia Parasitol.*, 28:187-199.
- Pavlásek I. 1997.** Výskyt *Cryptosporidium parvum* u odstavených selat. *Náš chov*, 46:23-24.
- Pickerd N., Tuthill D. 2004.** Resolution of cryptosporidiosis with probiotic treatment. *Postgrad. Med. J.*, 80:112-113.
- Pospischil A., Stigmair-Herb M. T., von Hegel G., Wiesner H. 1987.** Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Vet. Rec.*, 17:379-380.
- Pourrut X., Sarfati C., Liguory O., Moyou-Somo R., Derouin F. 2002.** Search for *Enterocytozoon bieneusi* infection in wild monkeys in Cameroon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 96:56-57.
- Prigneau O., Achbarou A., Bouladoux N., Mazier D., Desportes-Livade I. 2000.** Identification of proteins in *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidian pathogen of immunocytochemical study. *J. Eukar. Microbiol.*, 47: 48-56.
- Quílez J., Sánchez-Acedo C., Clave A., del Cacho E., López-Bernad F. 1996.** Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.*, 56:345-348.
- Reetz J., Rinder H., Thomschke A., Manke H., Schwebs M., Bruderek A. 2002.** First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *Inter. J. Parasitol.*, 32:785-787.
- Rinder H., Thomschke A., Dengjel B., Gothe R., Loschner T., Zahler M. 2000.** Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. *J. Parasitol.*, 86:185-188.

Rommel M., Eckert J., Kutzer E., Körting W., Schnieder T. (Eds.) 2000. Veterinärmedizinische Parasitologie. 5. Auflage, Parey Buchverlag, Berlin, 914 pp.

Ryan U. M., Monis P., Enemark H. L., Sulaiman L., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R. C., Xiao L. 2004. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). J. Parasitol., 90:769-773.

Ryan U. M., Read C., Hawhins P., Warnecke M., Swanson P., Griffith M., Deere D., Cunningham M., Cox, P. 2005. Genotypes of *Cryptosporidium* from Sydney water catchment areas. J. Appl. Microbiol., 98:1221-1229.

Ryan U. M., Samarasinghe B., Read C., Buddle J. R., Robertson I. D., Thompson R. C. A. 2003. Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. Appl. Environ. Microbiol., 69:3970-3974.

Sak B., Kváč M., Hanzlíková D., Cama V. 2008. First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. Vet. Parasitol., 153:220-224.

Salminen M. K., Tynkkynen S., Rautelin H., Poussa T., Saxelin M., Ristola M., Valtonen V., Jarvinen A. 2004. The efficacy and safety of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG on prolonged, noninfectious diarrhea in HIV patients on antiretroviral Therapy: A randomized, placebo-controlled, crossover study. HIV Clin. Trials, 5:183-191.

Santín M., Trout J. M., Fayer R. 2004. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in postweaned dairy calves in the eastern United States. Parasitol. Res., 93:287-289.

Santín M., Trout J. M., Fayer R. 2005. *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in dairy cattle in the eastern United States. Parasitol. Res., 97:535-538.

Sanford S. E. 1983. Porcine neonatal coccidiosis: clinical, pathological, epidemiological and diagnostic features. Calif. Vet., 37:26-30.

Sanford S. E. 1987. Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1981-1985). J. Am. Vet. Med. Assoc., 190:695-698.

Schwartz D. A., Anderson D. C., Klumpp S. A., McClure H. M. 1998. Ultrastructure of atypical (teratoid) sporogonial stages of *Enterocytozoon bienersi* (Microsporidia) in naturally infected rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Arch. Pathol. Lab. Med., 122:423-429.

Shadduck J. A. 1969. *Nosema cuniculi*: *in vitro* isolation. Science, 166:516-517.

Shadduck J. A., Bendele R., Robinson G. R. 1978. Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. Vet. Pathol., 15:449-460.

Shaw R. W., Kent M. L. 1999. Fish *Microsporidia*. In: The microsporidia and microsporidiosis. Wittner M., Weiss L. (Eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D. C., pp. 418-446.

Sprague V., Becuel J. J., Hazard E. I. 1992. Taxonomy of phylum Microspora. Crit. Rev. Microbiol., 18:285-395.

Stewart C. G., von Dellen A. F., Botha W. S. 1979. Canine encephalitozoonosis in kennels and the isolation of *Encephalitozoon* in tissue culture. J. S. Afr. Vet. Assoc., 50:165-168.

Suárez-Luengas L., Clavel A., Quílez J., Goñi-Cepero M. P., Torres E., Sánchez-Acedo C., del Cacho E. 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain), Vet. Parasitol., 148:231-235.

Sulaiman I. M., Fayer R., Lal A. A., Trout J. M., Schaefer F. W., Xiao L. H. 2003. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor hostadapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bienersi*. Appl. Environ. Microbiol., 69:4495-4501.

Sulaiman I. M., Fayer R., Yang C. F., Santin M., Matos O., Xiao L. H. 2004. Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. *Parasitol. Res.*, 92:328-334.

Taylor M. A., Marshall R. N., Green J. A., Catchpole J. 1999. The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. *Vet. Parasitol.*, 86:41-48.

Thomarat F., Vivares C. P., Gouy M. 2004. Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J. Mol. Evol.*, 59:780-791.

Thompson R. C. A., Olson M. E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M. S., Hijjawi N. S. 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.*, 59:77-158.

Tyzzler E. E. 1907. A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 5:12-13.

Tyzzler E. E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.*, 26:394-412.

Tzipori S., Smith M., T. Makin, Halpin C. 1982. Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from calf faeces. *Vet. Parasitol.*, 11:121-126.

Valenčáková A., Balent P., Huska M., Novotný F., Luptaková L. 2006. First report on *Encephalitozoon intestinalis* infection of swine in Europe. *Acta. Vet. Hung.*, 54:407-11.

Van Delle A. F., Botha W. S., Boomker J., Warnes W. E. J. 1978. Light and electron microscopical studies on canine encephalitozoonosis: cerebral vasculitis. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 45:165-186.

Van Dellen A. F., Stewart C. G., Botha W. S. 1989. Studies of encephalitozoonosis in vervet monkeys (*Cercopithecus pygerythrus*) orally inoculated with spores of

Encephalitozoon cuniculi isolated from dogs (*Canis familiaris*). Onderstepoort J. Vet. Res., 56:1-22.

Vávra J., Larsson J. I. R. 1999. Structure of the microsporidia. In: The microsporidia and microsporidiosis. Wittner M., Weiss L. (Eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D. C., pp. 7-84.

Vítovec J., Koudela B. 1987. Natural cryptosporidiosis in a piglet suffering from pseudomembranous typhlitis. Folia Parasitol., 34:378.

Vítovec J., Koudela B., Kudweis M. 1990. Endoparaziti významných hospodářských zvířat a jejich patogenita. Parazité ve velkochovech a možnosti prevence. Závěrečná zpráva, České Budějovice.

Vítovec J., Koudela B. 1992. Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. Vet. Parasitol., 43:25-36.

Vítovec J., Hamadejová K., Landová L., Kváč M., Květoňová D., Sak B. 2006. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. J. Vet. Med.B., 53:239-243.

Weber R., Bryan R. T., Schwartz D. A., Owen R. L. 1994. Human microsporidial infections. Clin. Microbiol. Rev., 7:426-461.

Weber R., Deplazes P., Schwartz D. 2000. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. Contrib. Microbiol., 6:166-192.

Widmer G., Feng X., Tanriverdi S. 2004. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. Methods Mol. Biol., 268:177-187.

Wieler L. H., Ilieff A., Herbst W., Bauer C., Wieler E., Bauerfeind R., Failing K., Klos H., Wengert D., Baljer G., Zahner H. 2001. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. J. Vet. Med. B., 48:151-159.

Wittner M. 1999. Historic perspectives on the microsporidia: expanding horizons. In: The microsporidia and microsporidiosis. Wittner M., Weiss L. (Eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D. C., pp. 1-6.

Wolfson J. S., Richter J. M., Waldron M. A. 1985. Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. N. Engl. J. Med., 312:1278-1282.

Wright J. H., Craighead E. M. 1922. Infectious motor paralysis in young rabbits. J. Exp. Microbiol., Washington D. C., 1-6.

Xiao L., Herd R. P., Bowman G. L. 1994. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. Vet. Parasitol., 52:331-336.

Xiao L., Bern C., Arrowood M., Sulaiman I., Zhou L., Kawai V., Vivar A., Lal A.A., Gilman R.H. 2002. Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. J. Infect. Dis., 185:1846-1848.

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

Xiao L., Moore J. E., Ukoh U., Gatei W., Lowery C. J., Murphy T. M., Dooley J. S. G., Millar B. C., Rooney P. J., Rao J. R. 2006. Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. Appl. Environ. Microbiol., 72:4461-4463.

Yu J. R., Seo M. 2004. Infection status of pigs with *Cryptosporidium parvum*. The Korean J. Parasitol., 42:45-47.

Zajíček D. 1988. Ochranou zdraví zvířat ke zdravé potravíně. Veterinářství, 38:388-390.

Zajíček D. 1989. Průzkum výskytu kokcidiózy selat. Veterinářství, 39:120-121.

Zeman D. H., Baskin G. B. 1985. Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). Vet. Pathol., 22:24-31.

Zintl A., Neville D., Maguire D., Fanning S., Mulcahy G., Smith H. V., De Waal T. 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. Parasitology, 134:1575-1582.

10. PŘÍLOHY

Článek:

First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig
farm in the Czech Republic

Bohumil Sak, Martin Kváč, **Dagmar Hanzlíková**, Vitaliano Cama

First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic

Bohumil Sak^{a,*}, Martin Kváč^{a,b}, Dagmar Hanzlíková^b, Vitaliano Cama^{c,d}

^a Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

^b Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

^c Johns Hopkins University, Bloomberg School of Public Health, 615 North Wolfe Street, Room W5515, Baltimore, MD 21205, USA

^d San Marcos University, School of Veterinary Medicine, Av. Circunvalacion Cdra 28, s/n San Borja, Lima, Peru

Received 28 November 2007; received in revised form 23 January 2008; accepted 26 January 2008

Abstract

Enterocytozoon bieneusi infects humans and animals and can cause life-threatening diarrhea in immunocompromised people. The routes of transmission and its zoonotic potential are not fully understood. Pigs have been frequently reported to have *E. bieneusi*; therefore, we surveyed farm-raised pigs in the Czech Republic to determine its presence and genetic diversity. Spores were detected by microscopy in the faeces of 65 out of 79 examined animals (82%). A species-specific polymerase chain reaction (PCR) identified *E. bieneusi* in 94% of samples. Genotyping based on the ITS regions of the SSU rRNA gene identified that most pigs were infected with the species-specific genotype F, while two animals had the zoonotic genotype D and two had genotype Peru 9. This is the first report of *E. bieneusi* in swine in the Czech Republic, and demonstrated that most infections were with pig-specific genotypes. Nonetheless, swine may still play a role in the transmission of *E. bieneusi* to humans.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Enterocytozoon bieneusi*; Pigs; Microsporidia; Genotypes; Zoonosis

1. Introduction

Of the 14 species of microsporidia currently known to infect humans, *Enterocytozoon bieneusi* (Desportes et al., 1985) is the most common and important cause of human microsporidiosis associated with diarrhea and systemic disease (Didier, 2005). The only published case of microsporidiosis caused by *E. bieneusi* in AIDS patient in the Czech Republic was recorded in 1994 (Ditrich et al., 1994).

Microsporidia spores could be released into the environment via stool, urine, or respiratory secretions. They are the infectious stage and can survive in different environmental matrices such as water, soil, and food products (Sinski, 2003). The spores of *E. bieneusi* have been identified in surface waters in the USA and France (Dowd et al., 1998; Cotte et al., 1999; Fournier et al., 2000), and the possible sources of contamination were humans or animals. Recently, *E. bieneusi* was also detected in several wild, domestic and livestock animals including swine, cattle, goats, birds, rabbits, dogs, cats and macaques (Deplazes et al., 1996; Kondova et al., 1998; Breitenmoser et al., 1999; del Aguila et al., 1999; Mathis et al., 1999; Rinder et al., 2000; Dengiel et al., 2001; Buckholt et al., 2002; Lores et al., 2002; Reetz et al., 2002; Fayer et al., 2003; Santín et al., 2004, Haro

* Corresponding author. Tel.: +420 387 775 419; fax: +420 385 310 388.

E-mail address: casio@paru.cas.cz (B. Sak).

et al., 2005, Lobo et al., 2006). Sequence analysis of the ITS region of the rRNA gene showed a close relationship between *E. bieneusi* isolates from humans and pigs, suggestive of an absence of transmission barriers between these microsporidia isolates (Rinder et al., 2000).

The fact that *E. bieneusi* was identified in different animals and water sources have raised public health concerns about its potential as a zoonotic and water-borne pathogen (Didier et al., 2004; Cama et al., 2007). Although vertebrate hosts have been identified for this microsporidium species infecting humans, the reservoirs and the modes of transmission of *E. bieneusi* are still unknown. Additionally, there is insufficient data to understand the dynamics of microsporidia infections in captive and farm animals in Central Europe, including the Czech Republic.

We report the first survey on the occurrence and prevalence of *E. bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic and detect its genotypes as a potential source of human infection.

2. Materials and methods

2.1. Collection of stool samples

We conducted a coprological survey for microsporidia in a randomly selected farm in the region of Vysočina, Czech Republic during the autumn of 2006. The selected farm had three different units: two breeding complexes and a growing complex. Each breeding complex was divided into two sections: one with individual pens for farrowing sows and their litters where piglets (pre-weaners) stay until weaned at 4 weeks of age. The second section was adjacent and composed of large communal pens for weaned piglets (starters), where they were kept until reaching 8 weeks of age. Thereafter, piglets were transferred to the growing complex (pre-growers), where they were kept until about 12 weeks of age.

Faeces were collected from animals of different age categories: pre-weaners, starters, pre-growers and sows. We randomly sampled 10% of sows, 10% of pre-growers and three piglets (pre-weaners or starters) per litter of each sow in this study. The samples were collected from the floor immediately after defecation into individually labeled sterile tubes and stored at 4 °C until processed in the laboratory.

2.2. Detection of microsporidium spores in faeces

Microsporidia were microscopically detected in faeces using calcofluor white staining (Vávra et al.,

1993). Briefly, thin smears were made from individual stool samples and fixed in absolute methanol and spores were visualized with 0.1% calcofluor M2R stain (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) in phosphate-buffered saline (PBS). Evans blue solution at 0.5% was used to facilitate differentiation. The slides were examined using UV-light with a filter wavelength of 490 nm and 1000× magnification.

2.3. Molecular characterization of microsporidia species and genotypes

2.3.1. DNA extraction

Two to three hundred milligrams of faecal samples from each sample were homogenized by bead disruption using a Mini-BeadBeater (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) for 120 s at a speed 5000 rpm. Total DNA was extracted using the QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions and was kept frozen at –20 °C until PCR amplification.

2.3.2. Molecular identification and characterization of *E. bieneusi*

A nested PCR protocol that differentiates *E. bieneusi* from other microsporidia commonly found in humans was used to amplify a 508 bp fragment of the small subunit rRNA gene comprised of 122 bp of the 3'-end of the SSU rRNA gene, 243 bp of the ITS and 143 bp of the 5'-region of the LSU rRNA gene (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996). Briefly, primers sets MSP-1 and MSP-2B, and MSP-3 and MSP-4B were used for the primary and secondary PCR amplifications, respectively. PCR amplification consisted of 35 cycles, of 94 °C for 45 s, 52 °C for 45 s, and 72 °C for 60 s preceded by a denaturation step of 94 °C for 3 min and followed by a final extension at 72 °C for 7 min. The amplicons were electrophoresed in 2% agarose gels and visualized with 0.2 µg/ml ethidium bromide.

All amplified products were sequenced in both directions using BigDye Terminator chemistries (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the secondary primers MSP-3 and MSP-4B and sequenced on the ABI PRISM 3031 (Applied Biosystems) genetic analyzer. The resulting sequences were assembled and aligned using the programs ChromasPro Version 1.32 (Technelysium Pty. Ltd., Qld, Australia) and Clustal X (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) and compared with reference sequences from GenBank.

2.4. Statistics

For statistical evaluation of results, Statistica[®], Release 5.1 Software (Statsoft, Tulsa, OK, USA, 1997) was used. The Chi-square statistic test for evaluation of significant differences were utilized.

3. Results

A total of 79 faecal samples were collected from 31 pre-weaners, 16 starters, 17 pre-growers and 15 sows. At the time of collection, most animals appeared to be in good health condition, and in two cases (pre-weaner and pre-grower) diarrhea was inferred from the liquid consistency of the stools. No association between the occurrence of diarrhea and *E. bieneusi* infections in pigs was found ($\chi^2 = 0.1386$; df, 1; $P > 0.05$).

Microsporidia infection was detected in samples from the three sections of the farm and in all age categories (Table 1). Stool samples from 65 (82%) pigs were microscopically positive (range 80–88%).

The PCR analysis of all stool samples detected *E. bieneusi* in 74 (94%) of the animals, with very high percentages among all age categories: all 31 pre-weaners, 15 out of 16 starters, 16 out of 17 pre-growers and 12 out of 15 sows (Table 1). Sequence analyses of the PCR-amplified product showed that the majority of *E. bieneusi* detected in samples were 100% homological with genotype F (GenBank accession number AF135833), while four samples belonged to different genotypes: two were 100% homological with genotype D (samples 50 and 52) and two with genotype Peru 9 (samples 16 and 80) (GenBank accession numbers AF101200 and AY371284, respectively), which were previously reported in humans.

4. Discussion

In this work the specific diagnosis of *E. bieneusi* on a closed pig farm in the Czech Republic was described.

We chose swine because they have been previously reported to harbour human pathogenic genotypes of *E. bieneusi*.

Surprisingly, we identified that 94% of the tested pigs had *E. bieneusi*, and that this proportion was similar among all age categories, and significantly higher than any previously reported. In 1999, Breitenmoser reported *E. bieneusi* in 35% of 109 pigs, and with much higher occurrence among weaned piglets (Breitenmoser et al., 1999). Similar to our results, most of those isolates belonged to genotype F. In an 18-month survey at a slaughter house in Massachusetts, 32% of 202 finished pigs had *E. bieneusi*: 18% of them had microsporidia in their stool samples and the rest in samples of bile (Buckholt et al., 2002). A small study of six pigs suffering from severe diarrhea and stunting identified that four of the six animals had microsporidiosis (67%) (Rinder et al., 2000).

Although all studies do indicate that microsporidia, and specifically *E. bieneusi* can infect swine, it is not yet clear why there is a broad difference in prevalence among the different studies. It can be suggested that the observed differences were the result of different farming practices from different parts of the world, although all reported surveys including this one, used samples from pigs that were raised under intense swine production practices. These practices include having a swine exclusive farm, age segregation and age-specific feeding and enclosed facilities. Besides husbandry practices, other factors that may affect the presence of microsporidia in farmed animals can be the health condition of the herd, age of the animals studied, location and weather conditions at the farm.

Our results also suggest that it is very likely that piglets may acquire the infection from their mothers at a very early age, although the specific routes are unknown. The faecal oral route has been proposed for acquiring *E. bieneusi* infections, and transmission could have occurred through direct contact with stools from the

Table 1
Frequency of *E. bieneusi* in different age categories of pigs on farms using light microscopy and genotyping

	Age category	Examination (positive/examined)		Genotype F/D/Peru 9
		Microscopy	PCR	
Breeding complex 1	Pre-weaners	19/21	21/21	21/0/0
	Starters	10/13	13/13	13/0/0
	Sows	7/11	9/11	9/0/0
Breeding complex 2	Pre-weaners	9/10	10/10	8/0/2
	Starters	2/3	2/3	2/0/0
	Sows	3/4	3/4	3/0/0
Growing complex	Pre-growers	15/17	16/17	14/2/0

sow, nursing from contaminated teats, or ingestion of faecal material. Nevertheless, additional studies are needed to ascertain the mechanics of this transmission.

Our study is the first to conduct a methodical survey that discriminates pigs by age categories within intensive farming conditions, while also collecting samples from the sow and its litter. In this case, the close proximity of the sow with her litter might have resulted in an overestimation of *E. bienewisi* positive piglets, which could have occurred as the result of contamination with spores from the sow rather than actual infection of the piglet. Nonetheless, the high percentage of microsporidia positive animals persisted in piglets that were weaned and physically separated from their mothers, reinforcing our findings among pre-weaners.

Our findings also confirm that *E. bienewisi* genotype F is the most frequently detected microsporidia in pigs strengthening the concept of host specificity for this genotype. Nonetheless, the detection of some genotypes previously identified in humans suggests that pigs may play a role, although minor, in the zoonotic transmission of *E. bienewisi*.

Although pigs become infected at an early age and excrete spores lifelong, microsporidia may remain unrecognized because it is only rarely associated with severe gastrointestinal symptoms and its detection by microscopy requires specialized stains that are not part of the routine copro-parasitological diagnosis. Further epidemiological studies are needed to fully ascertain its distribution in different geographical settings, weather conditions and husbandry practices, its economic impact for the swine industry, and the zoonotic potential of microsporidiosis in pigs in the Czech Republic.

Acknowledgements

We would like to thank the farm management and employees to enable us to obtain samples.

This work was supported by the research project of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 6007665806), by the grant of the Grant Agency of the Czech Republic (project no. 523/07/P117) and research project of the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic (Z60220518).

References

Breitenmoser, A.C., Mathis, A., Burgi, E., Weber, R., Deplazes, P., 1999. High prevalence of *Enterocytozoon bienewisi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. *Parasitology* 118, 447–453.

- Buckholt, M.A., Lee, J.H., Tzipori, S., 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bienewisi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2595–2599.
- Cama, V.A., Pearson, J., Cabrera, L., Pacheco, L., Gilman, R., Meyer, S., Ortega, Y., Xiao, L., 2007. Transmission of *Enterocytozoon bienewisi* between a child and guinea pigs. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2708–2710.
- Cotte, L., Rabodonirina, M., Chapuis, F., Bailly, F., Bissuel, F., Raynal, C., Gelas, P., Persat, F., Piens, M.A., Trepo, C., 1999. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 180, 2003–2008.
- del Aguila, C., Izquierdo, F., Navajas, R., Pieniazek, N.J., Miro, G., Alonso, A.I., Da Silva, A.J., Fenoy, S., 1999. *Enterocytozoon bienewisi* in animals: rabbits and dogs as new hosts. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 8S–9S.
- Dengjel, B., Zahler, M., Hermanns, W., Heinritzi, K., Spillmann, T., Thomschke, A., Loscher, T., Gothe, R., Rinder, H., 2001. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bienewisi*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4495–4499.
- Deplazes, P., Mathis, A., Muller, C., Weber, R., 1996. Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bienewisi* in faecal samples of pigs. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 93S.
- Desportes, I., Le Charpentier, Y., Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P., Modigliani, R., 1985. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bienewisi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool.* 32, 250–254.
- Didier, E.S., 2005. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop.* 94, 61–76.
- Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K., Didier, P.J., 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet. Parasitol.* 126, 145–166.
- Ditrich, O., Lom, J., Dyková, I., Vávra, J., 1994. First case of *Enterocytozoon bienewisi* infection in the Czech Republic: comments on the ultrastructure and teratoid sporogenesis of the parasite. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41, 35S–36S.
- Dowd, S.E., Gerba, C.P., Pepper, I.L., 1998. Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bienewisi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma comeae* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3332–3335.
- Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., 2003. First detection of microsporidia in dairy calves in North America. *Parasitol. Res.* 90, 383–386.
- Fournier, S., Liguory, O., Santillana-Hayat, M., Guillot, E., Sarfati, C., Dumoutier, N., Molina, J., Derouin, F., 2000. Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 95–100.
- Haro, M., Izquierdo, F., Henriques-Gil, N., Andrés, I., Alonso, F., Fenoy, S., del Aguila, C., 2005. First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3153–3157.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Loescher, T., Rinder, H., 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health.* 1, 373–378.
- Kondova, I., Mansfield, K., Buckholt, M.A., Stein, B., Widmer, G., Carville, A., Lackner, A., Tzipori, S., 1998. Transmission and serial propagation of *Enterocytozoon bienewisi* from humans and Rhesus macaques in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 66, 5515–5519.

- Lobo, M.L., Xiao, L., Cama, V., Magalhães, N., Antunes, F., Matos, O., 2006. Identification of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in various birds. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7380–7382.
- Lores, B., del Aguila, C., Arias, C., 2002. *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) in faecal samples from domestic animals from Galicia. *Spain Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 941–945.
- Mathis, A., Breitenmoser, A.C., Deplazes, P., 1999. Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat. *Parasite* 6, 189–193.
- Reetz, J., Rinder, H., Thomschke, A., Manke, H., Schwebs, M., Bruderek, A., 2002. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *Int. J. Parasitol.* 32, 785–787.
- Rinder, H., Thomschke, A., Dengjel, B., Gothe, R., Loscher, T., Zahler, M., 2000. Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. *J. Parasitol.* 86, 185–188.
- Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2004. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in post-weaned dairy calves in the eastern United States. *Parasitol. Res.* 93, 287–289.
- Sinski, E., 2003. Environmental contamination with protozoan parasite infective stages: biology and risk assessment. *Acta Microbiol. Pol.* 52, 97–107.
- Vávra, J., Dahbiová, R., Hollister, W.S., Canning, E.U., 1993. Staining of microsporidian spores by optical brighteners with remarks on the use of brighteners for the diagnosis of AIDS associated human microsporidiosis. *Folia Parasitol.* 40, 267–272.