

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělství

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

Bakalářská práce

Kryptosporidiové infekce lišek

Fox cryptosporidiosis

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

Autor bakalářské práce: Radek Pokorný

České Budějovice, duben 2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Radek POKORNÝ**
Osobní číslo: **Z11322**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělství**
Název tématu: **Kryptosporidiové infekce lišek**
Zadávající katedra: **Katedra zootecnických věd**

Zásady pro vypracování:

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření jednobuněční paraziti infikující všechny třídy obratlovců. V porovnání s výzkumem kryptosporidiových infekcí člověka a hospodářských zvířat jsou naše znalosti o biologii a diverzitě kryptosporidií volně žijících zvířat velmi omezené. Tento stav platí i pro většinu zástupců řádu Carnivora včetně lišek.

Cílem práce je popsat výskyt a prevalenci kryptosporidií u volně žijících lišek pomocí standardních koprologických a molekulárních metod. Pozitivní nálezy kryptosporidií určit na základě sekvencí genu kódující malou ribosomální podjednotku do druhu, respektive genotypu. V případě potřeby využít další geny pro bližší genotypizaci. Datové soubory zpracovat příslušnými statistickými metodami. Porovnat získaná data s již publikovanými.

Rozsah grafických prací: 5 tabulek, 5 grafů
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

- Current W.L., Garcia L.S. (1991): Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 325-358.
Sturdee A.P., Chalmers R.M., Bull S.A. (1999): Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Veterinary Parasitology*, 80: 273-280.
Ravaszová P., Halánová M., Goldová M., Valenčáková A., Malčeková B., Hurníková Z., Halan M. (2012): Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in red foxes and brown bear in the Slovak Republic. *Parasitology Research*, 110: 469-471.
Zhou L., Fayer R., Trout J.M., Ryan U.M., Schaefer F.W. 3rd, Xiao L. (2004): Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 7574-7577.

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
Katedra zootechnických věd

Datum zadání bakalářské práce: 30. března 2015

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2015


prof. Ing. Miroslav Šech, CSc., Dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní učebnice
BUDĚJOVICKÁ 15
370 01 BUDĚJOVICKY

L.S.


doc. Ing. Miroslav Martásek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 30. března 2015

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

V Českých Budějovicích dne 23. 4. 2015

.....

Poděkování:

Především bych chtěl poděkovat doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., vedoucímu bakalářské práce, za trpělivost, věnovaný čas a odborné rady při vedení mé bakalářské práce. Dále děkuji RNDr. Daně Květoňové za ochotnou pomoc při laboratorních pracech. Také chci poděkovat doc. Ing. Vladimíru Hanzalovi, CSc. za zajištění polských vzorků, a všem ostatním, kteří mi byli ochotni poskytnout ulovené lišky k odebrání vzorků.

Abstrakt

Lišky představují rezervoár zoonotických infekcí, z tohoto důvodu je zapotřebí mít přehled o aktuální nálezové situaci. V České republice a Polsku bylo od roku 2013 do roku 2014 odebráno 111 vzorků trusu legálně ulovených lišek obecných (*Vulpes vulpes*) a vyšetřeny mikroskopicky a za použití molekulárních metod na přítomnost kryptosporidií. Dva z vyšetřovaných vzorků byly pozitivní na přítomnost specifické DNA *Cryptosporidium andersoni*. Celková prevalence byla nízká (1,8 %), stejně jako intenzita infekce. Z celkového počtu 111 vyšetřenců vzorků bylo 18 od zvířat trpících průjmem. Žádný z těchto vzorků však nebyl pozitivní na přítomnost kryptosporidií.

Klíčová slova: kryptosporidie; lišky; psovitě šelmy; *Cryptosporidium andersoni*

Summary

Foxes represent a reservoir of zoonotic diseases and it is necessary perform a control of disease situation. Total 111 fecal samples originated from wild foxes were collected in Czech Republic and Poland in two consecutive years 2013 - 2014. All fecal samples were screened for presence of *Cryptosporidium* spp. using both microscopy and molecular methods. Altogether two samples were molecularly positive and phylogenetic analyses reveal presence *C. andersoni* in both of them. Low prevalence (1.8%) and low infection intensity was observed in this study. Eighteen cases of diarrhea were detected, but no animal was positive for cryptosporidium infection.

Key words: cryptosporidia; foxes; carnivores; *Cryptosporidium andersoni*

Obsah:

1.	Úvod	9
2.	Cíle	10
3.	Literární přehled	11
3.1	Historie.....	11
3.2	Kryptosporidie a kryptosporidióza	12
3.2.1	Kryptosporidie	12
3.2.2	Kryptosporidióza	12
3.2.3	Patogeneze a klinické příznaky	12
3.2.4	Vývojový cyklus kryptosporidií	13
3.2.5	Kryptosporidióza lidí.....	14
3.3	Kryptosporidie a kryptosporidióza psových šelem	16
3.3.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	16
3.3.2	<i>Cryptosporidium muris</i>	17
3.3.3	<i>Cryptosporidium canis</i>	18
3.3.4	<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	18
3.3.5	Prevalence a výskyt kryptosporidií u lišek.....	19
4.	Materiál a metodiky.....	21
4.1	Odběr vzorků a lokality	21
4.2	Barvení kryptosporidií anilin - karbol - methyl violetí.....	27
4.3	Mikroskopické vyšetření.....	27
4.4	Kvantifikace intenzity infekce	27
4.5	Izolace DNA	28
4.6	PCR.....	29
4.7	Gelová elektroforéza.....	31
4.8	Sekvence	32
4.8.1	Příprava vzorků pro sekvenaci	32
4.8.2	Sekvence	32
4.9	Fylogenetická analýza.....	33
5.	Výsledky.....	34
5.1	Výskyt a prevalence kryptosporidií u lišek.....	34
5.2	Zjištěná intenzita infekce	35
5.3	Klinické příznaky.....	35
6.	Diskuse	36
7.	Závěr.....	38
8.	Použitá literatura.....	39

1. Úvod

Kryptosporidie jsou jedním z nejrozšířenějších parazitů schopných infikovat domácí, hospodářská i divoká zvířata. V posledních letech bylo popsáno mnoho nových druhů. Některé druhy jsou specifické jen pro jednoho hostitele a některé jsou schopny parazitovat u širokého spektra hostitelů. Infekční stádia, oocysty, jsou velmi odolná nepříznivým podmínkám prostředí a přežívají velmi dlouhou dobu při zachování infekivity. Ve vhodných podmínkách, např. v povrchové vodě nebo ve vlhké půdě, mohou zůstat infekční i déle než šest měsíců. Kryptosporidie mohou kontaminovat pitnou vodu a potraviny, čímž mohou představovat riziko pro lidi, ale i ostatní obratlovce. Zvýšený vědecký i laický zájem o kryptosporidie je spojován s masivní epidemií z pitné vody v roce 1993, kdy kryptosporidiové infekce postihly 400 000 lidí v Milwaukee (Fayer et Xiao 2008; Ryan et al. 2005; Xiao et al. 2004; Fayer et al. 1998; Guerrant 1997).

I když lišky nepředstavují významné riziko jako zdroj infekce pro lidi, je důležité brát v úvahu možnost přenosu kryptosporidiózy na člověka od lišek v příměstských oblastech. Z hlediska základní biologie i epidemiologie je důležité sledovat výskyt a prevalenci kryptosporidiových infekcí u volně žijících zvířat, která mohou mít přímý, nebo nepřímý kontakt s lidmi (Fayer et al. 2001).

2. Cíle

- Sepsat literární přehled o kryptosporidiích a kryptosporidióze volně žijících lišek
- Získání vzorků trusu ulovených lišek z různých honiteb
- Parazitologickými a molekulárními metodami detekovat kryptosporidie
- Vyhodnotit výskyt a diverzitu kryptosporidií u divokých lišek

3. Literární přehled

3.1 Historie

Zástupce rodu *Cryptosporidium* byl poprvé popsán v roce 1907 Ernestem Edwardem Tyzzerem, který identifikoval parazita v zažívacím ústrojí myši a popsal ho jako „baňkovitý útvar“, buď ve formě globulární, nebo elipsoidní. I když v této době ještě nebyl popsán celý vývojový cyklus, Tyzzer si všiml, že každá oocysta obsahuje čtyři sporozoity, které jsou asi deset mikrometrů dlouhé, štíhlé, vřetenovitého tvaru, bez prokazatelné vnitřní struktury. Parazit byl pojmenován *Cryptosporidium muris* a klasifikován do čeledi *Asporocystidae* (Tyzzer 1907).

U lidí nebyla popsána žádná kryptosporidiová infekce do roku 1976, kdy Nime s kolektivem popsali kryptosporidiózu u tříleté dívky. Její příznaky byly popsány jako „zvracení všeho co přijala a měla akutní vodnatý průjem“ (Nime et al. 1976).

V roce 1982 byly ve zprávách WHO zveřejněny první nálezy kryptosporidií u pacientů nakažených virem HIV. V témže roce byl také zdokumentován přenos kryptosporidií z experimentálně nakaženého telete na studenta veterinární medicíny a kryptosporidiová infekce byla zařazena mezi zoonózy (Anderson 1982).

První případ kryptosporidiózy u psovitých šelem pochází z Chile (Araya et al. 1987). O dva roky později byl zdokumentován výskyt *Cryptosporidium* sp. ve Francii a v Japonsku (Chermette et Blondel 1989; Uga et al. 1989). Následné zmínky o kryptosporidiových infekcích psů pochází z Kalifornie, Austrálie, Brazílie, České Republiky, Rumunska, Německa, Kanady, Neapole a Norska (Bauer et Cirak 2004; Dubná et al. 2007; El-Ahraf et al. 1991; Hamnes et al. 2007; Huber et al. 2005; Johnston et Gasser 1993; Mundin et al. 2007; Pereira 2011; Rinaldi et al. 2008; Shukla et al. 2006).

U lišek byl první záchyt *Cryptosporidium* sp. popsán až v roce 1999 ve Velké Británii (Sturdee et al. 1999). V USA roku 2004 byly u lišek rozpoznány tři různé genotypy *Cryptosporidium canis* dog genotyp, *Cryptosporidium* muskrat genotyp I a *Cryptosporidium canis* fox genotyp (Zhou et al. 2004).

V současné době toho o kryptosporidiích a kryptosporidióze lišek mnoho nevíme.

3.2 Kryptosporidie a kryptosporidióza

3.2.1 Kryptosporidie

Kryptosporidie jsou eukaryotická, jednobuněčná protista parazitující na epiteliálních buňkách gastrointestinálního traktu. Byla popsána také plicní forma, kdy kryptosporidie parazitují na epiteliálních buňkách respiračního traktu. Kryptosporidie jsou zařazeny do kmene Apicomplexa, třídy Sporozoasidae, řádu Eucoccidiorida, podřádu Eimiorina, čeledi Cryptosporidiidae, rodu *Cryptosporidium* (Egyed et al. 2003).

Paraziti patřící do rodu *Cryptosporidium* jsou obvyklou příčinou střevních onemocnění u lidí a mnoha jiných obratlovců (Ryan et al. 2004).

3.2.2 Kryptosporidióza

Po vniknutí do těla hostitele mohou kryptosporidie vyvolat onemocnění nazývané kryptosporidióza (Cació et al. 2002). Kryptosporidióza u jedinců s nenarušenou imunitou obvykle odezní i bez léčby. Pokud se jedinec se sníženou imunitou nakazí kryptosporidii, může být průběh choroby velmi závažný a životu nebezpečný (Brooks et al. 2004; Chen et al. 2002; Ryan et al. 2004).

3.2.3 Patogeneze a klinické příznaky

Parazit se šíří fekáliemi a do těla hostitele se dostává orálně, často prostřednictvím kontaminované vody a potravin. Kontaminovaná voda je nejčastějším zdrojem infekcí po celém světě (CDC 2009). I malé množství, jako je 10 až 100 oocyst, může vyvolat infekci (Chenet et al. 2002).

O vzniku infekce rozhoduje celá řada faktorů souhrnně označovaných jako determinanty virulence. Rozhodující je stav imunitního systému hostitele, jeho věk a také konkrétní druh nebo genotyp parazita. Inkubační doba trvá 3 - 21 dní, průměrně 10 - 12 dní (Current et Garcia 1991; Farthing 2000; Fayer et Unger 1986; MacKenzie et al. 1994; Mathieu et al. 2004; Pospichil et al. 1987).

Mezi příznaky patří vodnatý průjem přetrvávající i déle než dva měsíce s výraznou dehydratací organismu. Hubnutí může pacienta přivést do stavu anorexie. Dalšími příznaky bývá zvýšená teplota, zvracení a kolikové bolesti (Current et Garcia 1991; Farthing 2000; Fayer et Unger 1986; MacKenzie et al. 1994; Mathieu et al. 2004; Pospichil et al. 1987).

Infekce se rozšíří po celé délce trávicího ústrojí. Infikovány mohou být i dýchací cesty, což se projevuje výtokem z nosu a dýchacími potížemi. Žaludeční kryptosporidióza probíhá zpravidla bez klinických příznaků. Ojedinele byl popsán pokles produkce mléka u dojnic nebo anorexie s hubnutím až následným úhynem (Current et Garcia 1991; Farthing 2000; Fayer et Unger 1986; MacKenzie et al. 1994; Mathieu et al. 2004; Pospichil et al. 1987). Mezi nespecifické příznaky může patřit bolest svalů, bolest hlavy, malátnost a celková slabost (Ramirez et al. 2004). Symptomy mají podobné znaky jak u dospělých, tak i u dětí. Kryptosporidióza prodělaná v dětství může mít dopad na růst a vývoj dítěte (Mølbak et al. 1997). Rizikovou skupinu představují zaměstnanci v pečovatelských centrech, farmáři, zdravotníci a děti (Fayer et al. 2000). Značné riziko nákazy je pro turisty, kteří cestují do rozvojových zemí (Ramirez et al. 2004).

Zdraví jedinci jsou schopni úplného zotavení, délka trvání příznaků kryptosporidiózy je 3 - 28 dní (Jíra 2009; Ramirez et al. 2004). Správná zoohygienu, správné hygienické ošetření vody a vhodná úprava vody (vaření nebo filtrování) a ošetřování potravin (mytí a vaření) může pomoci zabránit v šíření tohoto onemocnění (CDC 2009).

3.2.4 Vývojový cyklus kryptosporidií

Životní cyklus kryptosporidií se skládá ze dvou fází - asexuální a sexuální. Po požití oocyst dochází k excystaci v tenkém střevě. Při excystaci dochází k uvolnění čtyř sporozoitů, ty se přichycují na epiteliální buňky tenkého střeva. Po adhezi ze sporozoitu vzniká trofozoit, uvnitř kterého probíhá nepohlavní množení (Ryan et al. 2004). Z trofozoitu se vyvine meront I. typu (Chen et al. 2002), obsahující šest až osm merozoitů (Ryan et al. 2004). Tento proces zničí hostitelskou buňku a do okolí se uvolní merozoiti I. typu. Některé z merozoitů se mohou opět účastnit nepohlavního cyklu a vzniká opět meront I. typu. Ostatní merozoiti nasedají na epitelové buňky a vyvíjí se v meronty II. typu (Chen et al. 2002), obsahující čtyři merozoity II. typu (Ryan et al. 2004). Tito merozoiti se uvolňují a připojují k epitelovým buňkám. Poté se z nich stanou buď makrogamonty, nebo mikrogamonty s 16 pohyblivými mikrogametami (Chen et al. 2002). Jedná se o samčí (mikrogamonty) a samičí (makrogamonty) pohlavní formy (Ryan et al. 2004). Mikrogamety jsou obdobou spermií a uvolňují se z mikrogamontu. Proniknutím

mikrogamet do makrogamet vzniklých z makrogamontů vznikají zygoty a z nich oocysty dvou typů (Chen et al. 2002). Přibližně 20 % oocyst má tenké stěny, ty mohou opětovně infikovat hostitele bez nutnosti přijmout oocystu orální cestou. Tenkostěnné oocysty excystují v zažívacím traktu, dochází k uvolnění sporozoitů a celý proces se opakuje (Ryan et al. 2004). Silnostěnné oocysty jsou vylučovány do vnějšího prostředí společně s trusem hostitele (Chen et al. 2002). Ihned po vyloučení jsou oocysty zralé a schopné infikovat hostitele (Ryan et al. 2004). Ve vnějším prostředí mohou přežívat po několik měsíců (Smith 2009). Infikovaní jedinci vylučují nejvíce oocyst během prvního týdne od nakažení. Oocysty mohou být vylučovány i týdny po odeznění klinických příznaků (Ryan et al. 2004).

Imunitní systém snižuje tvorbu merozoitů I. typu, rovněž i počet tenkostěnných oocyst, které jsou příčinou autoinfekce (Ryan et al. 2004).

3.2.5 Kryptosporidióza lidí

Dříve převládala domněnka, že kryptosporidiózu lidí způsobuje pouze *Cryptosporidium parvum*, ale molekulární studie prokázaly, že člověka může infikovat více druhů. Nejčastějšími původci onemocnění lidí jsou *Cryptosporidium parvum* a *Cryptosporidium hominis*. Dalšími možnými původci jsou *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium canis* a další (Kváč et al. 2009).

V České republice byla poprvé diagnostikována kryptosporidiová infekce u člověka v roce 1985 (Janda et al. 1985). Dosud nejvýznamnější epidemie kryptosporidiózy proběhla v roce 1993 v USA v Milwaukee. Infikováno tehdy bylo více než 400 tisíc osob a více než 4 tisíce z nich muselo být hospitalizováno. Kryptosporidióza byla pravděpodobnou příčinou smrti 54 - 100 lidí (MacKenzie et al. 1994). Průměrná míra prevalence infekce *Cryptosporidium* spp. je v Evropě a Severní Americe 1 - 3 %, v Asii asi 5 % a v Africe přibližně 10 % (Marschall et al. 1997).

K přenosu dochází fekálně-orální cestou, tedy přímo při styku s nemocným jedincem, nebo nepřímo pozřením kontaminované vody nebo potravy (Mackenzie et al. 1994). Pro lidi je nejrizikovější voda kontaminovaná lidskými fekáliemi, kontaminace trusem zvířat je až na druhém místě (Ditrich et al. 2005). Oocysty dobře přežívají i v mořské vodě. Rizikové je tedy i koupání v mořské vodě a požívání nedostatečně tepelně upravených mořských živočichů, zejména plžů, kterým se

oocysty zachycují na žábrách (Fayer et al. 1999). Méně významnými zdroji infekce může být nepasterizované mléko a mléčné výrobky, nedostatečně tepelně upravené masné výrobky, neomyté ovoce, syrová zelenina, ovocné mošty (Dillingham et al. 2002). Oocysty jsou velmi odolné ve vnějším prostředí, kromě vody také dobře přežívají v půdě, obzvláště v jílovitých vlhkých půdách. Se zvyšujícím se zastoupením písku a snižující se koncentrací vody v půdě dochází k rychlejší inaktivaci oocyst (Jenkins et al. 2002). Oocysty jsou také odolné vůči běžně užívaným dezinfekčním prostředkům, včetně chlóru a monochloraminu, užívaných k dezinfekci pitné vody (King et Monis 2007).

V USA byla experimentálně stanovena minimální infekční dávka pro rozvoj onemocnění u člověka na 132 oocyst. Kryptosporidie infikují imunokompetentní jedince, zejména děti, imunokompromitované jedince (například pacienty po transplantaci kostní dřeně nebo orgánů) i imunodeficitní pacienty s HIV (Fayer et Ungar 1986). Infekce může mít u imunodeficitních jedinců fatální následky a může do značné míry oslabit imunokompetentní jedince (Pereira et al. 2011).

Zatím není známa účinná terapie, i když výsledky některých pokusů skýtají naději k jejímu nalezení. Zatím se provádí především léčba podpurná, která vždy zahrnuje dietu a rehydrataci jedince perorálním nebo infuzním podáváním roztoku elektrolytů. Léčba trvá zpravidla 3 - 28 dní, kdy rychlejší uzdravení nastává u imunokompetentních jedinců, imunodeficitní jedinci se léčí déle (Jíra 2009).

V letech 2000 - 2009 bylo v České republice zjištěno a nahlášeno 23 pacientů s kryptosporidiózou. Nejčastěji jsou infikovány děti do dvou let věku, které ještě nemají plně vyvinutý imunitní systém a současně nemají dostatečně vžitě hygienické návyky. Většina pacientů také pochází z vesnice, kde se snadněji setká s infikovanými zvířaty, kontaminovanou vodou nebo stravou (Brůžková 2010).

3.3 Kryptosporidie a kryptosporidióza psovitéch šelem

Psovité šelmy se mohou nakazit několika druhy kryptosporidií - *Cryptosporidium parvum*, *C. muris*, *C. canis*, *C. meleagridis* a *Cryptosporidium* muscrat genotype I.

3.3.1 *Cryptosporidium parvum*

Druh *C. parvum* byl popsán v roce 1912 E. E. Tyzzerem. Odlišil ho od druhu *C. muris* na základě menších oocyst a rozdílné lokalizace v hostiteli (Tyzzer 1912). *Cryptosporidium parvum* je nejčastěji lokalizováno na vrcholku klků tenkého střeva, ale může být i v celém intestinálním traktu (Cacció et al. 2002).

Experimentální přenos z myši na myš měl vždy za následek infekci tenkého střeva, ne žaludku. Byly objasněny fáze životního cyklu a byla provedena měření. Byly pořízeny fotografie a výkresy ze světelného mikroskopu. Tyzzer poznamenal, že některé fáze nebyly striktně extracelulární, ale nepovažoval je za intracytoplazmatické, byly v kontaktu s vnitřním prostředím buněk nebo cytoplazmatickým povrchem buněk. Zralé oocysty nepřesáhly 4,5 μm v největším průměru (Tyzzer 1912).

Upton a Current v roce 1985 změřili velikost oocyst na 4,5 - 5 μm s indexem tvaru 1,16 (Upton et Current 1985; Current et Reese 1986). O dva roky později Tilley a kolektiv publikovali, že oocysty měří 4,6 - 5,2 μm s indexem tvaru 1,15 (Tilley et al. 1990)

Upton a Current provedli hloubkovou studii morfologie oocyst, životního cyklu a studie přenosu mezi myšmi a skotem, v této studii potvrdili jméno *C. parvum* pro hovězí genotyp (Current et Reese 1986).

O *C. parvum* je známo, že infikuje přežvýkavce, psy, lidi a další obratlovce (Xiao et al. 2004).

Jako klinické příznaky u psů byly pozorovány časté průjmy (Giangaspero et al. 2006; Mosallanejad et al. 2010).

Prevalence a výskyt u psovitéch šelem:

Ve vzorku, který byl získán od psa z České republiky, bylo metodou PCR s použitím genu SSU rDNA prokázáno *C. parvum* (Hajdušek et al. 2004). V italské provincii Teramo, v regionu Abruzzo v centrální Itálii z 240 vzorků bylo 7 odpovídajících *C. parvum* (Giangaspero et al. 2006). V Číně ve městě Che-fej (Hefei) byly nalezeny oocysty kryptosporidií ve vzorcích trusu od 24 psů z 232

vyšetřených, prevalence infekce byla tedy 10,34% (Yu et al. 2009). V jihozápadním Íránu byla provedena studie ve městě Ahvaz a jeho okolí. Byly odebrány vzorky od 93 psů, z čehož 4 vzorky byly pozitivní, prevalence u těchto psů byla 4,3 % (Mosallanejad et al. 2010). V Egyptě byla zjištěna prevalence 10 %. Z 20 vzorků bylo pomocí molekulárních metod prokázáno, že 2 vzorky se shodují s *C. parvum* (El-Madawy et al. 2010). V čínské provincii Čching-chaj (Qinghai) byla zjištěna prevalence 30,18 %. Pozitivních vzorků bylo 150 ze 497 (Ma et al. 2010).

3.3.2 *Cryptosporidium muris*

V roce 1907 byl tento druh popsán E. E. Tyzzerem. Popsal ho jako parazitického prvoka, který se často vyskytoval v žaludcích laboratorních myši v severní Americe, ale nevyskytoval se u divoce žijících myši (Tyzzer 1907). O tři roky později byla žaludeční kryptosporidiová infekce myši prokázána i v Anglii. Byl k dispozici podrobnější popis každé fáze životního cyklu s měřením, výkresy a fotografiemi, a bylo zjištěno, že všechny vývojové fáze jsou lokalizované v žaludku (Tyzzer 1910). Sporozoitů uvolnění z oocyst v žaludečních žlázách byly popsány jako autoinfekční (Current et Reese 1986).

Experimentální přenos s použitím laboratorních potkanů prokázal, že velký typ kryptosporidiových oocyst z divokých potkanů chycených ve městě Osaka může parazitovat pouze v žaludeční žláze. Z této studie vyplývá, že oocysty měřící 6,3-8,4 μm mohou být zdrojem přenosu na neinfikované krysy. Oocysty z této studie byly použity v ostatních studiích pro přímý přenos na myši, morčata, králíky, psy a kočky. Všechny tyto živočišné druhy se povedlo infikovat. K vývoji došlo v žaludku a ne ve střevě (Iseki 1986; Isekiet al. 1989).

U psovitých šelem nebyly popsány žádné klinické příznaky kryptosporidie způsobené *C. muris* (Lupo et al. 2008). I když byl v jednom případě popsán průjem a chronické zvracení u psa, u tohoto psa byla při pitvě prokázána přítomnost *Helicobacter* sp. společně s *C. muris* (Ellis et al. 2010).

Prevalence a výskyt u psovitých šelem:

V severní Pensylvánii byl jeden vzorek z 22 ulovených kojetů (*Canis latrans*) 99,7% shodný s *Cryptosporidium muris* (4,5% prevalence) (Trout et al. 2006). U populace psů v Texasu byla sledována skupina psů v chovatelské stanici s 56 kotci, z těchto kotců bylo odebráno 70 vzorků. Ve 40 kotcích z 56 testovaných (71 %) byl nalezen antigen *Cryptosporidium*. Náhodně bylo vybráno šest pozitivních vzorků, u

kterých byla provedena genotypizace. Těchto šest vzorků bylo určeno jako *C. muris* (Lupo et al. 2008). V další studii bylo pomocí PCR s následnou sekvenací detekováno *C. muris* u rok a půl starého psa (Ellis et al. 2010).

3.3.3 *Cryptosporidium canis*

Tato kryptosporidie byla popsána v roce 2001. Oocysty *C. canis* byly detekovány ve výkalech psů na celém světě. Oocysty z výkalů přirozeně infikovaných psů měří od 4,71 do 4,95 μm a mají index tvaru 1,05 (Fayer et al. 2001). Na základě jeho schopnosti infikovat lidi a skot, jeho neschopnosti nakazit myši a na základě znatelné genetické odlišnosti od jiných druhů rodu, byl parazit pojmenován *Cryptosporidium canis*. Druh byl nalezen u psů, kojotů, lišek a také u lidí (Fayer et al. 2001; Morgan et al. 2000; Pedraza-Diaz et al. 2001; Xiao et al. 1999, 2004).

Klinické příznaky u psovitých šelem jsou celková slabost a průjem (Fayer et al. 2001; Miller et al. 2003).

Prevalence u psovitých šelem:

V roce 2002 proběhl výzkum výskytu *Cryptosporidium* u psů v Japonsku v prefektuře Osaca. Prevalence byla stanovena na 9,3 % (n=140) (Abe et al. 2002).

V Georgii (USA) byla provedena pitva osm týdnů staré fenky Yorkshirského teriéra. Histologické vyšetření prokázalo závažnou gastrointestinální kryptosporidiózu. Pomocí PCR byla zjištěna 99,8% shoda s *C. canis* (Miller et al. 2003). V Itálii byl jeden z 240 odebraných vzorků pozitivní na *C. canis* (Giangaspero et al. 2006). V severovýchodní Pensylvánii byly odebrány vzorky trusu kojotů (*Canis latrans*). Byla prokázána prevalence 23 % (n=22) (Trout et al. 2006). V Číně bylo testováno 309 vzorků psího trusu. Bylo detekováno osm pozitivních zvířat, zjištěná prevalence byla 2,59 % (Dong et al. 2007). V Brazílii se prevalence *C. canis* u psů pohybuje v rozmezí od 2,3 - 26,2 % (Balassiano et al. 2009; Mundin et al. 2007).

3.3.4 *Cryptosporidium meleagridis*

Cryptosporidium meleagridis bylo prvně popsáno v roce 1955 u krůt ve Skotsku, kdy bylo pozorováno na suchých nátěrech barvených na základě MacNeala, modifikovanou metodou podle Romanowského. Nemoc s průjmem a mírnou mírou úmrtnosti u 10 - 14 dní starých krůt byla spojena s parazitem, který prodělává svůj životní cyklus na epitelu tenkého střeva (Slavin 1955).

Následná molekulární analýza vzorku od krocana izolovaného v Severní Karolině a u papouška izolovaného v Austrálii na SSU rRNA, HSP70, COWP a aktinových

lokusů prokázala genetickou jedinečnost *C. meleagridis* (Lindsay et Blagburn 1990; Morgan et al. 2000; Sulaiman et al. 2002; Sulaiman et al. 2000; Xiao et al. 1999, 2000).

Oválné oocysty měřící 4,5 - 4,0 μm jsou téměř nerozeznatelné od oocyst *C. parvum* (Slavin 1955). Lindsay s kolektivem (1989) provedli měření životaschopných oocyst z výkalů krocana a naměřili 4,5 - 6,0 μm na 4,2 - 5,3 μm . Morgan s kolektivem (2000) znovu provedli měření životaschopných oocyst, zjistili velikost 4,5 \times 5,1 μm .

Cryptosporidium meleagridis bylo popsáno většinou u ptačích hostitelů, jako jsou kuřata, papoušci a krůty (Morgan et al. 2000; Slavin 1955), ale bylo prokázáno i ve vzorku od psa v České republice (Hajdušek et al. 2004).

3.3.5 Prevalence a výskyt kryptosporidií u lišek

Current (1989) detekoval *Cryptosporidium* sp. u lišky šedé v USA.

Ve Warwickshire v Anglii byla stanovena prevalence výskytu *Cryptosporidium* sp. na 8,7 %, když bylo vyšetřeno 23 lišek, z čehož dva vzorky byly pozitivní. Otázkou je, zda oocysty jsou pouze pozůstatky od hlodavců, které prošly zaživacím traktem lišek, nebo se lišky nakazily a následně vylučovaly kryptosporidiové oocysty (Sturdee et al. 1999).

Zhou a kolektiv (2004) popsali infekci u lišek žijících v zátocě Chesapeake v USA, kde bylo odebráno celkem 76 vzorků, z toho bylo šest pozitivních s výslednou prevalencí 7,9 %.

V 19 krajích Irska bylo odebráno 124 vzorků trusu lišek. Vzorky byly testovány pomocí mikroskopu s použitím modifikované barvicí metody Ziehl-Neelsen. Ve dvou vzorcích byly detekovány oocysty *Cryptosporidium* sp., byla zjištěna prevalence 1,6 % (Nagano et al. 2007).

Hannes a kolektiv (2007) odebrali fekální vzorky od 269 norských divokých lišek (*Vulpes vulpes*) během lovecké sezóny (říjen - duben) od roku 2002 do roku 2004. Vzorky byly vyšetřeny na přítomnost kryptosporidiových oocyst. Oocysty byly detekovány v šesti vzorcích, byla tedy zjištěna prevalence 2,2 %.

Od září 2010 do února 2011 byly odebrány vzorky od lišek ulovených ve východním a centrálním Slovensku. Vzorky byly testovány metodou sandwich ELISA na zjištění přítomnosti protilátek proti antigenům *Cryptosporidium* spp.

Celkem bylo testováno 62 lišek, z čehož 24 bylo pozitivních. Zjištěná prevalence *Cryptosporidium* sp. byla 38,7 % (Ravaszová et al. 2011).

Ve sledovaných studiích byla průměrná prevalence výskytu kryptosporidiózy u lišek 13,1 %, kdy nejnižší byla zjištěná v Norsku (2,2 %) a nejvyšší na Slovensku (38,7 %).

V Bosně a Hercegovině bylo odebráno 123 vzorků od lišek ulovených od ledna 2011 do března 2012. U čtyř s těchto lišek bylo detekováno *Cryptosporidium* spp., zjištěná prevalence byla 3,2 % (Hodžić et al. 2014)

4. Materiál a metodiky

4.1 Odběr vzorků a lokality

Vzorky byly odebírány u lišek ulovených na území České republiky a Polska. Vzorky trusu od lišek ulovených v České republiky jsem odebíral osobně postupem zajišťujícím odebrání dostatečného množství vzorku trusu a zároveň zachování celistvosti kůže pro případnou možnost stažení k následnému zužitkování v kožešnickém průmyslu:

- Ohledání okolí konečníku za účelem zjištění výskytu průjmu u zvířete.
- Uchopení řitního otvoru (obrázek č. 1).
- Obřezání řitního otvoru několika řezy (obrázek č. 2).
- Uvolnění konečníku od pánve (obrázek č. 3).
- Vytažení tlustého střeva (obrázek č. 4).
- Vytlačení obsahu tlustého střeva stisknutím střeva mezi palec a ukazováček s následným tahem ke konečníku. Vytlačení bylo opakováno pro získání většího množství trusu (obrázek č. 5).
- Trus byl umístěn do vzorkovnice a označen číslem vzorku.
- Vzorek byl po odebrání skladován v rozmezí teplot 2-7 °C.

Obrázky č. 1-5 byly pořízeny dne 4. 3. 2015 při odběru vzorku č. 37 v ČR.

Vzorky z České republiky pocházely z devíti lokalit jižních a západních Čech, přehled všech lokalit je uveden v tabulce č. 1.

Tabulka 1: Lokality odebraných vzorků

Počet vzorků	Lokalita
8	Mazelov
7	Hanov
6	Vahlovice
5	Točnick u Klatov
3	Bečov nad Teplou
3	Hluboká nad Vltavou
2	České Budějovice
2	Pšov
1	Lednice
74	Racot (Polsko)

Těchto devět lokalit je vyznačeno oranžovými kroužky znázorňující plochu 20 km² na mapě s měřítkem 1 : 750 000 (obrázek č. 6).

Kroužky na mapě zároveň znázorňují maximální velikost liščího teritoria, které je 15-20 km² (Košnář 2010).

Dalších 74 vzorků bylo odebráno na dvou výřadech po společných lovech v polském okrese Koscián. V tomto okrese je osm honiteb, šest z nich je využíváno mysliveckými sdruženími, jedna je školní honitba a jedna honitba náleží k Výzkumnému ústavu polského mysliveckého svazu. Dva hony, po kterých bylo umožněno odebrat vzorky trusu, byly pořádány ve školní honitbě v Racotě. Racot leží v centru Velkopolska, tato lokalita je vyznačena na obrázku č. 7. První série 41 vzorků bylo odebráno 1. 2. 2014. a druhá série vzorků 33 byla odebrána 21. 3. 2015.



Obrázek 1: odběr vzorků - uchopení řitního otvoru



Obrázek 2: odběr vzorků - obřezání řitního otvoru několika řezy



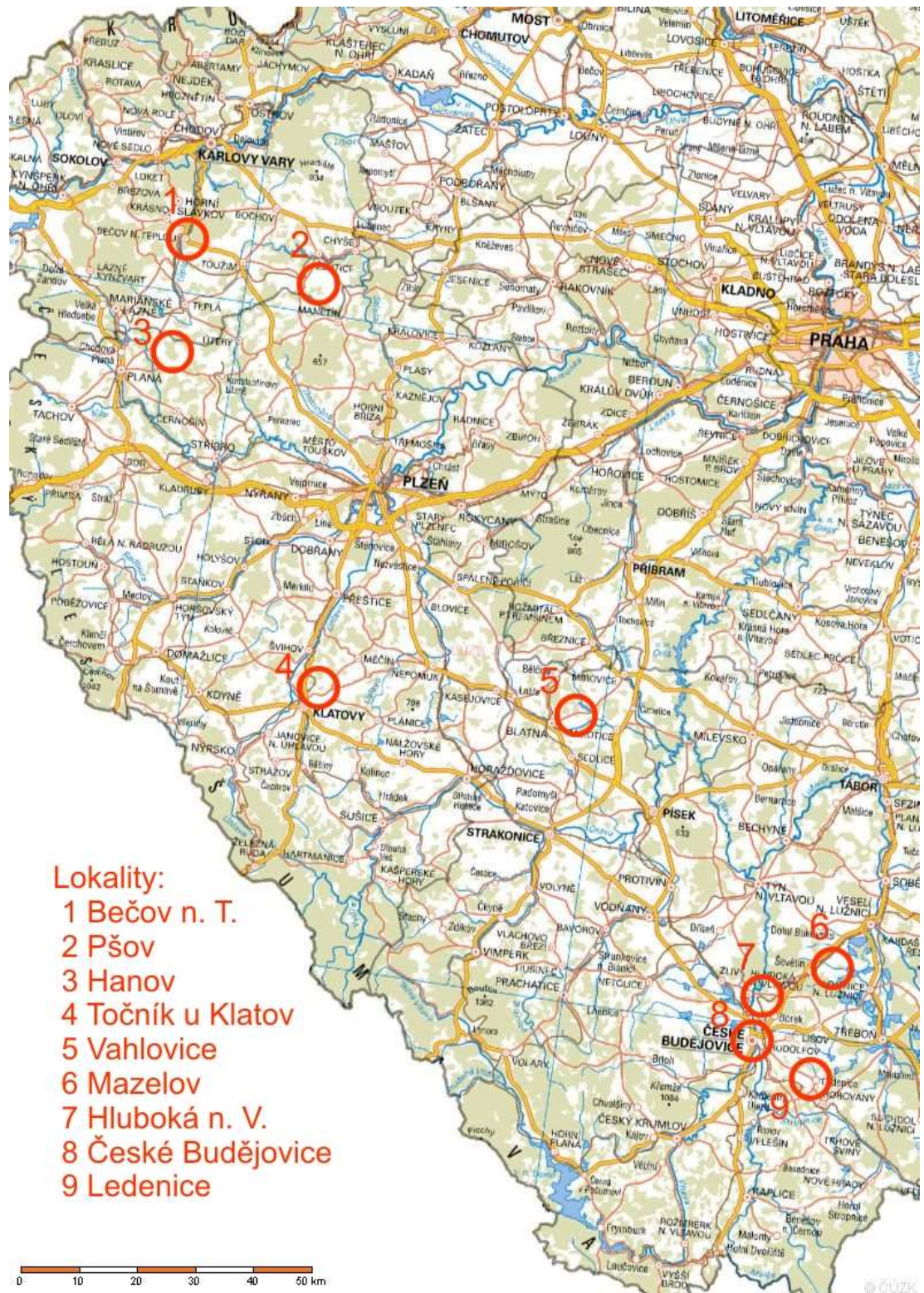
Obrázek 3: odběr vzorků - uvolnění konečnicku od pánve



Obrázek 4: odběr vzorků - vytažení tlustého střeva



Obrázek 5: odběr vzorků - vytlačení obsahu tlustého střeva



Obrázek 6: Znázornění lokalit odběru vzorků v České republice (ČÚZK)



Obrázek 7: Lokalita Racot v Polsku označená na mapě

4.2 Barvení kryptosporidií anilin - karbol - methyl violetí

- Vzorek trusu rozetřít do tenké průhledné vrstvy na podložní sklíčko.
- Fixovat methanolem v plameni.
- Následně nátěr ponořit na 30 minut do roztoku methylvioleti.

Složení barvicího roztoku:

Methylviolet'	0,6 g
Anilin	1 ml
Fenol	1 g
Alkohol	30 ml
Deionizovaná voda	70 ml

- Po třiceti minutách sklíčko opláchnout vodou.
- Diferencovat 2% kyselinou sírovou. Opět opláchnout vodou.
- Dobarvit 1 % roztokem tartrazinu v 1 % roztoku kyseliny octové.
- Po okapání a zaschnutí preparáty prohlížet při tisíci-násobném zvětšení za použití imerzního oleje (Miláček a Vítovec 1985).

4.3 Mikroskopické vyšetření

Pozorování oocyst v nátěru trusu bez použití barvicích metod by bylo velmi obtížné, pomocí různých barvicích metod lze oocysty v nátěru trusu zvýraznit a odlišit je tak od pozadí. Principem barvení je odlišná schopnost oocyst a ostatních komponentů vázat různé typy barviv. Z tohoto důvodu byly preparáty obarveny výše popsanou metodou podle metody Miláčka - Vítovce.

Na připravené preparáty byla kápnuta kapka imerzního oleje, poté byly preparáty pozorovány při tisíci-násobném zvětšení na světelném mikroskopu.

4.4 Kvantifikace intenzity infekce

Při nízké intenzitě jsou počítány všechny oocysty nalezené na preparátu, při vysoké intenzitě se počítá počet oocyst ve 30 náhodných zorných polích. Pomocí údajů, jako jsou hmotnost trusu, počet zorných polí a napočítaný počet oocyst na sklíčku, může být odhadnuta intenzita infekce a vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu (OPG).

4.5 Izolace DNA

Použitý materiál

200 mg vzorku liščího trusu, PSP Spin Stool DNA Kit (Invitak)

Proteináze K lyofylizát rozpuštěn v 1,5 ml deionizované vody.

Po rozpuštění skladovaný při - 20 °C.

ElutionBuffer: v 1,5 ml mikrozkušavce a předem inkubovaný při 70 °C.

Postup

- Materiál dát do Safe - Lock - Tube, přidat skleněné zirkonové kuličky a 0,8 - 1,2 ml LysisBuffer P, vortexovat 1 minutu a rozbít Fast Prepem 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
- Inkubovat 10 minut při 95 °C v termobloku, během inkubování protřepat.
- 1 minutu centrifugovat při 11 000 g.
- Přenést veškerý supernatant do InviAdsorb-Tube a 15 sekund vortexovat,
- Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, poté centrifugovat při 14 000 g.
- Supernatant přepipetovat do čistých mikrozkušavek (1,5 ml), s následnou centrifugací při 14 000 g.
- Do čistých mikrozkušavek (1,5 ml) napipetovat 25 µl Proteinase K a přidat 400 µl supernatantu a poté vortexovat.
- Inkubovat 10 minut při 70 °C, během inkubace protřepat.
- Připipetovat 200 µl BindingBuffer A, s následným vortexem.
- Přepipetovat veškerý objem do spin Filter - Tube.
- Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě.
- Centrifugací 1 minutu při 11000 g.
- Vylít odpad z mikrozkušavek (1,5 ml).
- Napipetovat 500 µl Wash I.
- Centrifugací 1 minutu při 11 000 g.
- Vylít odpad z mikrozkušavek, napipetovat 700 µl Wash II.
- Centrifugovat 1 minutu při 11 000 g.
- Vylít odpad z mikrozkušavek a opět centrifugace 4 minuty při 14 000 g.
- Kolonu namat na čistou mikrozkušavku, napipetovat 200 µl předehřátého ElutionBuffer D na kolonu.

- Inkubovat 3 minuty při lab. teplotě, centrifugace 1 minutu při 11 000 g.
- Vyizolovaný vzorek označit a vložit do mrazáku.

4.6 PCR

Byl použit nested PCR protokol amplifikující část genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) (Jiang et al. 2005). Jednotlivé reakční směsi polymerázové reakce měly objem 20 µl.

Pro primární i sekundární PCR byl použit stejný amplifikační program:

- počáteční denaturace 180 s při 94 °C
- 35 cyklů zahrnujících denaturaci 45 s při 94 °C
- nasedací teploty primerů 55 °C 45 s
- extenze 60 s při 72 °C
- finální extenze 600 s při 72 °C
- Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 2 µl primárního PCR produktu. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek obsahující DNA *Cryptosporidium hominis*.
- Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 2 µl primárního produktu DNA.

Byl použit set specifických primerů pro amplifikaci SSU, sekvenace primerů jsou uvedeny níže.

Pro primární reakci:

F1

TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG

R1

CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA

Pro sekundární reakci:

F2

GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG

R2

AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A

Pracovní postup byl podobný u primární i u sekundární reakce. Nejprve byl vytvořen mastermix napipetováním všech komponentů mimo DNA podle tabulky č. 2 a důkladným promícháním. Poté byl mastermix rozpipetován po 18 µl do PCR

mikrozkumavek s následným přidáním 2 μ l vzorku DNA u primární reakce, do sekundární reakce bylo přidáno 2 μ l produktu získaného z primární reakce. Materiál byl umístěn do termocykleru s výše uvedeným amplifikačním programem.

Tabulka 2: Složená reakce pro PCR

PRIMÁRNÍ REAKCE		SEKUNDÁRNÍ REAKCE	
Druh chemikálie	Množství pro jednu mikrozkumavku	Druh chemikálie	Množství pro jednu mikrozkumavku
H ₂ O	12,30 μ l	H ₂ O	13,10 μ l
MgCl ₂ (25mM)	1,20 μ l	MgCl ₂ (25mM)	1,20 μ l
10Xbuffer	2,00 μ l	10Xbuffer	2,00 μ l
dNTP (10mM)	0,40 μ l	dNTP (10mM)	0,40 μ l
forward (10 μ M)	0,40 μ l	forward (10 μ M)	0,40 μ l
reverse (10 μ M)	0,40 μ l	reverse (10 μ M)	0,40 μ l
BSA (10 mg/ml)	0,80 μ l	BSA (10 mg/ml)	-
taqpolymeráza (1U/1 μ l)	0,50 μ l	taq polymeráza (1U/1 μ l)	0,50 μ l
DNA	2,00 μ l	Produkt primární reakce	2,00 μ l
Σ	20,00 μl	Σ	20,00 μl

4.7 Gelová elektroforéza

PCR produkty ze sekundární PCR reakce byly separovány pomocí elektroforézy na 1 % agarózovém gelu s přidavkem ethidium - bromidu.

Chemikálie

- TAE pufr (242 g tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA
- pH 8,00
- Agaróza (ServaElectrophoresis, Germany).
- Ethidium - bromid (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, USA).
- 10 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc., Canada).

Postup

- TAE pufr smíchat s agarózou (120 ml TAE pufru + 1,2 g agarózy).
- Rozpustit v mikrovlnné troubě a poté zchladit pod tekoucí vodou na teplotu přibližně 50 °C.
- Přidat ethidium - bromid a promíchat.
- Gel nalít do formy, vložit hřebeny a nechat cca 20 minut tuhnout.
- Po ztuhnutí opatrně vyjmout hřebeny a vložit do vany s TAE puftrem na elektroforézu.
- Do první jamky napipetovat ladder, do ostatních jamek napipetovat 20 µl produktu sekundární PCR.
- Spustit elektroforézu o napětí 85 V po dobu potřebnou k separaci fragmentů DNA.

4.8 Sekvenace

4.8.1 Příprava vzorků pro sekvenaci

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

Pracovní postup:

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

4.8.2 Sekvenace

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány za použití sekundárních primerů a pomocí ABI BigDyeTerminator v 3.1. Sekvenační reakce byla provedena komerční firmou.

4.9 Fylogenetická analýza

Získané nukleotidové sekvence byly manuálně analyzovány pomocí programu Chromas Pro (www.technilysium.com.au/chromas.html) a srovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank pomocí softwaru MAFFT version 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>).

Pro fylogenetické analýzy byl použit program MEGA 6. Byly posouzeny fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií pomocí metody Neighbor - Joining. Bootstrapová analýza byla použita pro vyhodnocení statistické podpory získaných topologií.

5.2 Zjištěná intenzita infekce

Přesnou intenzitu infekce nebylo možné zjistit, protože mikroskopickým vyšetřením nebyly detekovány žádné oocysty, ale z této skutečnosti lze usoudit, že se jedná o infekci s velmi nízkou intenzitou.

5.3 Klinické příznaky

Z klinických příznaků u ulovených zvířat lze s jistotou prokázat pouze výskyt průjmu, který byl zaznamenán u 18 odebraných zvířat, ale nebyl spojen s přítomností *C. andersoni* ve vzorcích.

6. Diskuse

O výskytu kryptosporidií u lišek již bylo vypracováno několik studií z různých oblastí s prevalencí výskytu od 2,2 % do 38,7 % (Current 1989; Hamnes et al. 2007; Hodžić et al. 2014; Nagano et al. 2007; Ravaszová et al. 2011; Sturdee et al. 1999; Zhou et al. 2004). U většiny studií nebylo dále specifikováno o jaký druh, popřípadě genotyp, se jedná (Current 1989; Hamnes et al. 2007; Hodžić et al. 2014; Nagano et al. 2007; Ravaszová et al. 2011; Sturdee et al. 1999).

Tato práce prokázala pouze jeden, pro psovitě šelmy nesespecifický druh *Cryptosporidium andersoni*. V zátoce Chesapeake byly u lišek prokázány 3 různé genotypy v šesti vzorcích, z těchto šesti vzorků byl jeden určen jako *C. canis* dog genotyp, jeden jako *Cryptosporidium muskrat* genotyp a zbylé čtyři vzorky byly určeny jako *C. canis* fox genotyp. Z tohoto zjištění je možné usuzovat, že lišky jsou hostiteli svého vlastního genotypu, přičemž se mohou nakazit kryptosporidii od ostatních psovitéch šelem (Zhou et al. 2004).

Cryptosporidium andersoni izolované u dvou lišek v této práci je pravděpodobně první nález *C. andersoni* u psovitéch šelem.

Lišky se *C. andersoni* mohly nakazit od sudokopytníků, zejména od skotu, u kterého je *C. andersoni* běžným druhem (Lindsay et al. 2000). U *C. andersoni* byla prokázána přirozená infekce v Polsku vyskytující se u skotu, ovcí a zebra evropského (Lindsay et al. 2000; Ryan et al. 2003; Wang et al. 2010). Ve Velkopolsku, ze kterého pocházejí ulovené lišky, je chováno velké množství skotu. Podle údajů polského statistického úřadu je v polském kraji Velkopolsko chováno 890 tisíc kusů skotu (USwP 2014).

Se skotem mohly lišky přijít do nepřímého kontaktu při hnojení kravským trusem, přímým kontaktem na pastvinách nebo pozřením uhynulého kusu. Lišky v mase nepřijímají dostatečné množství vitamínů, chybějící vitamíny mohou získávat požitím obsahu zažívacího traktu a s tímto obsahem mohou pozřít i kryptosporidiové oocysty (Birger et Darrell 1978).

Dalším zdrojem oocyst *C. andersoni* v Polsku by mohli být zubři. Celkem v Polsku žije 1 107 zubrů, z toho 948 ve volné přírodě (Olech 2010). *Cryptosporidium andersoni* by mohli být nakaženi kromě již zmíněných sudokopytníků také hlodavci, kteří tvoří hlavní složkou potravy lišek (Koudela et al.

1998; Kváč et al. 2007; Lv et al. 2009; Matsubayashi et al. 2004). Výskyt *C. andersoni* u těchto skupin volně žijících živočichů v Polsku je třeba prověřit dalším výzkumem.

Vzhledem k tomu, že *C. andersoni* bylo identifikováno především u přežvýkavců s možností přenosu na hlodavce (Lindsay et al. 2000; Matsubayashi et al. 2004, 2005; Ryan et al. 2003; Satoh et al. 2003), nelze s jistotou určit, zda tyto lišky skutečně měly kryptosporidiózu, nebo zachycené oocysty pouze procházely zaživacím traktem.

Zjištěná intenzita infekce byla velmi nízká, což může poukazovat na již zmíněné procházející oocysty nebo odeznívající infekci, popřípadě její chronickou formu.

V této práci byl také pozorován výskyt průjmu u 18 odebíraných lišek. Ani u jednoho z pozitivních vzorků nebyl průjem přítomen. *Cryptosporidium andersoni* u infikovaných zvířat nezpůsobuje průjem, jako klinický příznak je prokázáno pouze snížení užitkovosti u skotu (Esteban a Anderson 1995; Lindsay et al. 2000).

7. Závěr

- Bylo získáno 111 vzorků liščího trusu z České republiky a Polska, které byly vyšetřeny mikroskopicky i za použití metod molekulární biologie.
- Přestože mikroskopicky nebyl zjištěn žádný pozitivní vzorek, pomocí molekulárních metod bylo u dvou vzorků detekováno *Cryptosporidium andersoni*, které není specifické pro lišky. Zdrojem nákazy mohli být volně žijící nebo na pastvinách chovaní sudokopytníci nebo hlodavci.
- Byl zaznamenáván výskyt průjmu u 18 lišek, nicméně u lišek pozitivních na kryptosporidie se průjem nevyskytoval.

8. Použitá literatura

1. ABE N., SAWANO Y., YAMADA K., KIMATA I., ISEKY M.
Cryptosporidium infection in dogs in Osaka. *Vet. Parasitol.* 2002, č. 108, s. 185-193.
2. ANDERSON B. C., DONDELINGER T., WILKINS E. E. Cryptosporidiosis in a veterinary student. *Journal of American Vet. Med. Assoc.* 1982, č. 4, s. 408-409.
3. ARAYA J., GONZALEZ J., SAGUA H., OLIVARES W., RIMASSA C., VIDELA M. Cryptosporidiosis en el Norte Chile. Prevalence en animl's domesticos sinantropicos y silvestres. *Bol. Chil. Parasitol.* 1987, č. 42, s. 7-11.
4. BALASSIANO B. C., CAMPOS M. R., MENEZES R. R. A. C., PEREIRA M. J. Factors associated with gastrointestinal parasite infection in dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Prev. Vet. Med.* 2009, č. 91, s. 234-240.
5. BAUER C., CIRAK V. Y., Comparison of conventional coproscopical methods and commercial coproantigen ELISA kits for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dogs and cats. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 2004, č. 117, s. 410-413.
6. BIRGER J., SEQUERA D. M. The Diet of the Red Foxes. *Dan. Rev. of game biol.* 1978, č. 8, s. 2-15.
7. BROOKS G. F., BUTEL J. S., MORSE S. A. Jawetz, Melnick, & Adelberg's *Medical Microbiology*. New York: McGraw-Hill. 2004, s. 684-685.
8. BRŮŽKOVÁ R. Průkaz kryptosporidiových nákaz u dětí s průjmy v nemocnici v Písku a. s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce Věra Kůrková. Brno, 2010.
9. CACCIÓ S. M., DE GIACOMO M., POZIO E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int. J. Parasitol.* 2002, č. 32, s. 1023-1030.

10. CAUSAPÉ A. C., QUÍLEZ J., SÁNCHEZ-ACEDO C., CACHO E.
Prevalence of intestinal parasites, including *Cryptosporidium parvum*, in dogs in Zaragoza city, Spain. *Vet. Parasitol.* 1996, č. 67, s. 161-167.
11. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.: 'Crypto' - *Cryptosporidiosis*. [online]. 2013 [cit. 2014-02-13]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/crypto/>
12. CURRENT W. L. *Cryptosporidium* spp. In: Genta RM, Walzer PD (Eds.) *Parasitic infections in the compromised host*. Marcel Dekker, New York. 1989. s. 281-341
13. CURRENT W. L., GRACIA L. S. *Cryptosporidiosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991, č. 4, s. 325-358.
14. CURRENT W. L., REESE N. C. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J. Protozool.* 1986, č. 33, s. 98-108.
15. DILLINGHAM R. A., LIMA A. A., GUERRANT R. L. *Cryptosporidiosis: epidemiology and impact*. *Microbes Infect.* 2002, č. 10, s. 1059-1066.
16. DITRICH O., KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D. Kryptosporidióza: rizika pro imunikompetentní i imunodeficitní jedince. In: TOLAROVÁ, V. *Oportunní a opomíjené protozoární střevní infekce*. Praha: ČLS JEP. 2005, s. 21 - 26.
17. DONG H., ZHANG L., NING CH., WANG Y., YANG H., SHI K., GAO G. *Epidemiological investigation on cryptosporidiosis in dogs in Zhengzhou and experimental infection with oocysts derived from the dogs*. *Vet. Sci. Chin.* [online]. 2007 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZGSY200710007.htm
18. DUBLEY P., SPEER C. A., FAYER R. *Cryptosporidiosis in man and animals*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl. s. 460-472 .
19. DUBNÁ S., LANGROVÁ I., NAPRAVNIK J., JANKOVSKÁ I., VADLEJCH J. The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 2007, č. 145, s. 120-128.

20. EGYED Z., SRÉTER T., SZÉLL Z., VARGA I. Characterization of *Cryptosporidium* spp. recent developments and future needs. Vet. Parasitol. 2003, č. 111, s. 103-114.
21. ELIS A. E., BROWN C. A., MILLER D. L. Diagnostic exercise: Chronic Vomiting in a Dog. Vet. Pathol. 2010, roč. 45, č. 5.
22. EL-MADAWY R. S. Studies in protozoa of rodent and canine. Ph.D thesis. Benha University, Egypt. 2006
23. EL-MADAWY R. S., KHALIFA N. O., KHATER H. F. Detection of *cryptosporidial* infection among egyptian stray dogs by using *Cryptosporidium parvum* outer wall protein gene. Bul. J. Vet. Med. 2010, č. 13, s. 104-110.
24. EL-AHRAF A., TACAL J. V., SOBIH H., AMIN M., LAWRENCE W., Prevalence of *cryptosporidiosis* in dogs and human beings in san bernardino county, California. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1991, č. 198, s. 631-634.
25. ESTEBAN E., ANDERSON B. C. *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. J. Dairy Sci. 1995, č. 78, s. 1068-1072.
26. FARTHING M. Clinical aspects of human cryptosporidiosis. Contrib. Microbiol. 2000, č. 6, s. 50-74.
27. FAYER R., LEWIS E. J., TROUT J. M., GRACZYK T. K., JENKINS M. C., HIGGINS J., XIAO L., LAL A. A. *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. Emerg. Inf. Dis. 1999, č. 5, s. 706-710.
28. FAYER R., MORGAN U., UPTON S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. J. Parasitol. 2000, č. 30, s. 1305-1322.
29. FAYER R., TROUT J. M., JENKINS M. C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. J. Parasitol. 1998, č. 84, s. 1165-1169.
30. FAYER R., TROUT J. M., XIAO L., MORGAN U. M., LAL A. A., DUBEY J. P. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. J. Parasitol. 2001, č. 87, s. 1415-1422.

31. FAYER R., UNGAR B. L. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. Microb. Rev. 1986, č. 4, s. 458-483.
32. FAYER R., XIAO L. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press. 2008.
33. GIANGASPERO A., IORIO R., PAOLETTI B., TRAVERSA D., CAPELLI G. Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in Central Italy. Parasitol. Res. 2006, č. 99, s. 297-299.
34. GUERRANT R. L. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. Emerg Inf. Dis. 1997, č. 3, s. 51-7.
35. GUYOT K., FOLLET-DUMOULIN A., LELIÉVRE E., SARFATI C., RABODONIRINA M., NEVEZ G., CAILLIEZ J. C., CAMUS D., DEI-CAS E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. J. Clin. Microbiol. 2001, č. 39, s. 3472-3480.
36. HAJDUŠEK O., DITRICH O., ŠLAPETA J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. Vet. Parasitol. 2004, č. 122, s. 183-192.
37. HAMNES I. S., GJERDE B. K., ROBERTSON L. J. A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. Acta Vet. Scand. 2007, č. 49, s. 22-32.
38. HODŽIĆ A., ALIĆ A., OMERAGIĆ J. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Bosnia and Herzegovina. Mac. Vet. Rev. 2014, č. 2, s. 189-192.
39. HUBER F., BOMFIM T. C., GOMES R. S. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. Vet. Parasitol. 2005, č. 130, s. 69-72.
40. CHERMETTE R., BLONDEL S. Cryptosporidiosis des carnivore domestiques, resutants preliminaires en France. Bull. Soc. Fr. Parasitol. 1989, č. 7, s. 31-36.

41. CHEN W., HARP H. J., HARMSSEN G. A. *Cryptosporidium parvum* Infection in Gene-Targeted B Cell-Deficient Mice. *J. of Paras.* 2003, č. 2, s. 391-393.
42. CHEN X., JANET S. K., PAYA C. V., LARUSSO F. N. Current Concepts: Cryptosporidiosis. *The New Eng. J. of Med.* 2002, s. 1723-1731.
43. ISEKI M. Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Parasitol.* 1986, č. 35, s. 521-526.
44. ISEKI M., MAEKAWA T., MORIYA K., UNI S., TAKADA S. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 1989, č. 75, s. 218-222.
45. JANDA J., MACHALA J., LEBL J. Střevní kryptosporidióza u 14 - ti letého děvčete s malabsorpčním syndromem a nejasným získaným defektem imunity. *Českosloven. ped.* 1985, č. 3, s. 149-151.
46. JENKINS M. B., BOWMAN D. D., FOGARTY E. A., GHIORSE W. C. *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in three soil types at various temperatures and water potentials. *Soil Biol & Biochem.* 2002, č. 34, s. 1101-1109.
47. JÍRA J. Lékařská protozoologie: protozoální nemoci. 1. vyd. Praha: Galén, 2009, s. 567.
48. JOHNSTON J., GASSER R. B. Copro-parasitological survey of dogs in southern Victoria. *Aust. Vet. Pract.* 1993, č. 23, s. 127-131.
49. KENNETH J. R., GEORGE R. C. *Sherris Medical Microbiology*. New York: McGraw-Hill. 2004, s. 727-730.
50. KOUDELA, B., MODRÝ, D., VÍTOVEC, J.: Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. *Vet. Parasitol.* 1998, č. 76, s. 181-188.
51. KING B. J., MONIS P. T. Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitol.* 2007, č. 134, s. 309-323.
52. KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B., DITRICH O. *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, č. 6, s. 982-983.

53. KVÁČ M., ONDRÁČKOVÁ Z., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B., VÍTOVEC J. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 2007, č. 143, s. 229-233.
54. KOŠNÁŘ A. Liška obecná - skrytě žijící lovec. *Naše příroda.* 2010, č. 6, s. 1-6
55. LINDSAY D. S., BLAGBURN B. L., SUNDERMANN C. A. Morphometric comparison of the oocysts of *Cryptosporidium meleagridis* and *Cryptosporidium baileyi* from birds. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 1989, č. 56, s. 91-92.
56. LINDSAY D. S., UPTON S. J., OWENS D. S., MORGAN U. M., MEAD J. R., BLAGBURN B. L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apikomlexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukar. Microbiol.* 2000, č. 47, s. 91-95.
57. LOID S., SMITH J. Pattern of *Cryptosporidium parvum* oocyst excretion by experimentally infected dogs. *Int. J Parasitol.* 1997, č. 7, s. 799-801.
58. LUPO P. J., LANGER-CURRY R. C., ROBINSON M., OKHUYSEN P. C., CHAPPELL C. L. *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *Am. J. Med. Hyg.* 2008, č. 78, s. 917-921.
59. LV C., ZHANG L., WANG R., JIAN F., ZHANG S., NING C., WANG H., FENG C., WANG X., REN X., QI M., XIAO L. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, č. 75, s. 7692-7699.
60. MA L., WANG G., LU Y., CAI Q., YE CH., LI X., NIU X. Elisa detection of canine cryptosporidiosis in qinghai province. *Chin. Jour. of Anim. Inf. Dis.* [online]. 2010 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZSJB201004014.htm
61. MACKENZIE W. R., HOXIE N. J., PROCTOR M. E., GRANDUS M. S., BLAIR K. A., PETERSON D. E., KAZMIERCZAK J. J., ADDISS D. G., FOX K. R., ROSE J. B., DAVIS J. P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 1994, č. 331, s. 161-167.

62. MARSHALL M. M., NAUMOVITZ D., ORTEGA Y., STERLING C. R.
Waterborne protozoan pathogens. Clin Microbiol Rev. 1997, č. 1, s. 67-85.
63. MATHIEU E., LEVY D. A., VEVERKA F., PARRISH M. K., SARISKY J., SHAPIRO N., JOHNSTON S., HANDZEL T., HIGHTOWER A., XIAO L., LEE Y. M., YORK S., ARROWOOD M., LEE R., JONES J. L.
Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000, Am. J. Top. Med. Hyg. 2004, č. 71, s. 582-589.
64. MATSUBAYASHI M., KIMATA I., ABE N., TANI H., SASAI K. The detection of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* oocyst in cattle in Japan. Parasitol. Res. 2004, č. 93, s. 504-506.
65. MILLER D. L., LIGGETT A., RADZI Z. A., BRANCH L. O. Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy. Vet Parasitol. 2003, č. 115, s. 199-204.
66. MOLBAK K., ANDERSEN M., AABY P., HOJLYNG N., JAKOBSEN M., SODEMANN M., DASILVA A. *Cryptosporidium* infection in infancy as a cause of malnutrition: a community study from Guinea-Bissau, west Africa. Am. J. Clin. Nutr. 1997, č. 65, s. 149-152.
67. MORGAN U. M., MONIS T. P., XIAO L., LIMOR J., SULAMIN I., RAIDAL S., O'DONGHUE P., GASSER R., MURRAY A., FAYER R., BLAGBURN L. B., LAL A. A., THOMPSON C. R. Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. Int. J. Parasitol. 2001, č. 31, s. 289-296.
68. MORGAN U. M., XIAO L., LIMOR J., GELIS S., RAIDAL R. S., FAYER R., LAL A., ELLIOT A., THOMPSON R. C. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). Aust. Vet. J. 2000, č. 78, s. 182-183.
69. MORGAN U. M., XIAO L., MONIS P., FALL A., IRWIN P. J., FAYER R., DENHOLM K. M., LIMOR J., LAL A., THOMPSON R. C.
Cryptosporidium spp. in domestic dogs: the "dog" genotype. Appl Environ. Microbiol. 2000, č. 66, s. 2220-2223.
70. MOSALLANEJAD B., HAMINIDEJAD H., AVIZEH R., GHORBANPOOR N., JALALI M. Antigenic detection of *Cryptosporidium parvum* in urban and

- rural dogs in Ahvaz district, southwestern Iran. Iranian J. Vet. Res. 2010, č. 11, s. 273-278.
71. MUNDIM M., ROSA M. A. S., HOTRÊNCIO S. M., FARIA E. S. M., RODRIGUES R. M., CURY M. C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. Vet. Parasitol. 2007, č. 144, s. 356-359.
72. MTAMBO M. M., WRIGHT E., NASH A. S., BLEWETT D. A. Infectivity of a *Cryptosporidium* sp. isolated from a domestic cat (*Felis domestica*) in lambs and mice. Res. Vet. Sci. 1996, č. 60, s. 61-64.
73. MURRAY R. P., ROSENTHAL K. S., PFALLER M. A. Medical Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Elsev. Inc. 2005, č., s. 855-856.
74. NAGANO Y., Finn M. B., LOWERY C. J., MURPHY T., MORIARTY J., POWER E., TOOLAN D., O'LOUGHLIN A., WATABE M., MCCORY K. A., CROTHERS E., DOOLEY J. S. G., RAO J. R., ROONEY P. J., MILLAR B. C., MATSUDA M., ELBORN J. S., MOORE J. E. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and Bacterial Pathogens in Faecal Material in the Red Fox (*Vulpes vulpes*) Population. Vet. Res. Com. 2007, č. 5, s. 559-564
75. NIME F., BUREK J., PAGE D., HOLSCHER M., YARDLEY J. E. E. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. Gastroenterolog. 1976, č. 4, s. 592-598.
76. OLECH W. Ochrona ex situ žubra w Polsce. Stud. i Materiał. CEPL w Rogow. 2010, č. 25, s. 227-237.
77. ONDRÁČKOVÁ Z. Infektivita *Cryptosporidium andersoni* pro různé druhy hlodavců. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta. 2007.
78. PEREIRA C. R. A., FERREIRA A. P., KOIFMAN R. J., KOIFMAN S., Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em animais domésticos de companhia da população idosa em Teresopolis, Rio de Janeiro, Brazilie. Rev. Geriatric. Gerontol. 2011, č. 14, s.
79. PEDRAZA-DIAZ S., AMAR C., IVERSEN A. M., STANLEY P. J., MCLAUCHLIN J. Unusual *Cryptosporidium* sp. recovered from human

- faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. J. Med. Microbiol. 2001, č. 50, s. 293-296.
80. POSPISCHIL A., STIGLMAIR-HERB M. T., VON HEGEL G., WIESNER H. Abomasal *cryptosporidiosis* in mountain gazelles. Vet. Rec. 1987, č. 16, s. 379-80.
81. RAMIREZ N., WARD L., SREEVATSAN S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microbes. Infect. 2004, č. 6, s. 773-785.
82. RAVASZOVÁ P., HALANOVÁ M., GOLDOVÁ M., VALENCAKOVÁ A., MALCEKOVÁ B., HURNÍKOVÁ Z., HALAN M. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in red foxes and brown bear in the Slovak Republic. Parasitol. Res. 2011, č. 110, s. 469-471.
83. RYAN U. M., MONIS P., ENEMARK H. L., SULAIMAN I. M., SAMARASINGHE B., RAED C., BUDDLE R., ROBERSON I., ZHOU L., THOMPSON R. C., XIAO L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). J. Parasitol. 2004, č. 90, s. 769-773.
84. RYAN U. M., XIAO L., READ C., ZHOU L., LAL A., PAVLASEK I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol. 2003, č. 69, s. 4302-4307.
85. RINALDI L., MAURELLI M. P., MUSELLA V., VENEZIANO V., CARBONE S., DiSARNO A., PAONE M., CRINGOLI G., *Giardia* and *Cryptosporidium* in canine faecal samples contaminating an urban area. Res. Vet. Sci. 2008, č. 84, s. 413-415.
86. SATOH M., HIKOSAKA K., SASAKI T., SUYAMA Y., YANAI T., OHTA M., NAKAI Y. Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. Appl. Environ. Microbiol. 2003, č. 69, s. 691-692.
87. SHUKLA R., GIRALDO P., KRALIZ A., FINNIGAN M., SANCHEZ A. L., *Cryptosporidium* spp. and other zoonotic enteric parasites in sample of domestic dogs and cats in the Niagara region of Ontario. Can. Vet. J. 2006, č. 47, s. 1179-1184.
88. SLAVIN D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). J. Comp. Pathol. 1955, č. 65, s. 262-270.

89. SMITH S., ELLIOT A. J., MALLAGHAN C., MODHA D., HIPESLEY-COX J., LARGE S., REGAN M., SMITH G. E. Value of syndromic surveillance in monitoring a focal waterborne outbreak due to an unusual *Cryptosporidium* genotype in Northamptonshire, United Kingdom, June - July 2008. Eur. Surveill. 2010, č. 15, s. 19-43.
90. STURDEE A. P., CHALMERS R. M., BULL S. A. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. Veter. Parasitology. 1999, č. 80, s. 273-280.
91. SULAIMAN M. I., LAL A. A., XIAO L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. J. Parasitol. 2002, č. 88, s. 388-394.
92. TILLEY M., UPTON S. J., BLAGBURN B. L., ANDERSON B. C. Identification of outer oocyst wall proteins of three *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) species by 125I surface labeling. Infect. Immun. 1990, č. 58, s. 252-253.
93. TROUT J. M., SANTÍN M., FAYER R. Giardia and *Cryptosporidium* sp. and genotypes in coyotes (*Canis latrans*). J. Zoo. Wildl. Med. 2006, č. 37, s. 141-144.
94. TYZZER E. E. A sporozoan found in the peptic flanda of the common mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1907, č. 5, s. 12-13.
95. TYZZER E. E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. & sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. J. Med. Res. 1910, č. 18, 487-509.
96. TYZZER E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenkd. 1912, č. 26, s. 394-414.
97. UGA S., MATSUMORA T., ISHIBASHI K., YODA Y., YATOMI K., KATAOKA N. Cryptosporidiosis in dogs and cats in Hyogo prefecture, Japan. Jpn. J. Parasitol. 1989, č. 38, s. 139-143.
98. UPTON S. J., CURRENT W. L. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. J. Parasitol. 1985, č. 71, s. 625-629.

99. Urząd Statystyczny w Poznaniu [online]. 2014 [cit. 2015-04-18]. Dostępne z: <http://poznan.stat.gov.pl/opracowania-biezace/opracowania-sygnalne/rolnictwo-lesnictwo/poglowie-zwierzat-gospodarskich-w-województwie-wielkopolskim-w-czerwcu-2014,2,12.html>
100. WANG Y., FENG Y., CUI B., JIAN F., NING C., WANG R., ZHANG L., XIAO L. Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. *Parasitol. Res.* 2010, č. 106, s. 341-347.
101. XIAO L., FAYER R., RYAN U., UPTON S. J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public health. *Clinical Microbiology Reviews.* 2004, č. 17, s. 72-97.
102. XIAO L., MORGAN U. M., LIMOR J., ESCALANTE A., ARROWOOD M., SHULAW W., THOMPSON R. C. A., FAYER R. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* [online]. 1999 [cit. 2015-04-18]. Dostępne z: <http://aem.asm.org/content/65/8/3386.short>
103. YU L., LI P., GU Y., XU W., WANG X., QIU X., YIN G. Epidemiological Survey Dog Cryptosporidiosis in Hefei. *Journal of Anhui Science and Technology University.* [online]. 2009 [cit. 2015-04-10]. Dostępne z: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ANJS200901005.htm
104. ZHOU L., FAYER R., TROUT J. M., RYAN U. M., SCHAEFER F. W., XIAO L. Genotypes of *Cryptosporidium* Species Infecting Fur-Bearing Mammals Differ from Those of Species Infecting Humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, č. 70, s. 7574-7577.