

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Agroekologie

Katedra: Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Význam kočkovitých šelem v šíření zoonotických jednobuněčných parazitů

The role of Felidae in the environmental dissemination of human pathogenic unicellular  
parasites

Student: Bc. Ondřej Grym

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

České Budějovice 2014

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ondřej GRYM**  
Osobní číslo: **Z12573**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Agroekologie**  
Název tématu: **Význam kočkovitých šelem v šíření zoonotických jednobuněčných parazitů**  
Zadávací katedra: **Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

**Úvod:** Kočky jako významní hostitelé zoonotických jednobuněčných parazitů.

**Cíle:** Vyhodnotit výskyt a prevalenci parazitů infikujících kočky v závislosti na věku a způsobu chovu.

Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp kryptosporidií a mikrosporidií. Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů.

**Literární přehled:** Zpracovat podrobný literární přehled o problematice jednobuněčných parazitů "volně" žijících a domácích koček a rizicích přenosu sledovaných parazitů na člověka a hospodářská zvířata. Použít odbornou, především zahraniční literaturu.

**Materiál a metodika:** Pomocí standardních parazitologických metod a specifických barvicích metod diagnostikovat exogenní vývojová stádia parazitů v trusu koček. U pozitivních vzorků určit druh a genotyp kryptosporidií a mikrosporidií pomocí PCR, PCR-RFLP a sekvenování.

**Výsledky:** Vyhodnotit získaná data o prevalenci a výskytu. Zhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů.

**Souhrn:** Nejdůležitější poznatky práce.

Rozsah grafických prací: tabulky a grafy  
Rozsah pracovní zprávy: 30 stran  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická  
Seznam odborné literatury:

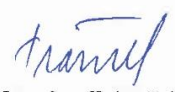
- Berger-Schoch AE, Herrmann DC, Schares G, Müller N, Bernet D, Gottstein B, Frey CF. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. *Vet Parasitol.* 2010
- Juvet F, Lappin MR, Brennan S, Mooney CT. Prevalence of selected infectious agents in cats in Ireland. *J Feline Med Surg.* 2010. 12:476-82
- Mircean V, Titilincu A, Vasile C. Prevalence of endoparasites in household cat (*Felis catus*) populations from Transylvania (Romania) and association with risk factors. *Vet Parasitol.* 2010.171:163-6.
- Suzuki J, Murata R, Kobayashi S, Sadamasu K, Kai A, Takeuchi T. Risk of human infection with *Giardia duodenalis* from cats in Japan and genotyping of the isolates to assess the route of infection in cats. *Parasitology.* 2010. 2:1-8.

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

Datum zadání diplomové práce: 5. března 2013  
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2014

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

  
prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 5. března 2013

Grym O. (2014). Význam kočkovitých šelem v šíření zoonotických jednobuněčných parazitů. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. 73s.

### **Abstrakt**

Vzorky exkrementů jednoho sta koček s různou mírou habituace, žijící v domácnosti a toulavé kočky, byly testovány na přítomnost kryptosporidií a mikrosporidií ke zhodnocení rizika, jaké představuje blízký kontakt člověka s těmito zvířaty. Prevalence kryptosporidií a mikrosporidií byla určena z odebraných vzorků na základě rodově specifické PCR. Všechny PCR pozitivní vzorky byly sekvencovány. Z celkového počtu 100 vyšetřených zvířat bylo u třech nalezeno *Cryptosporidium felis* (3 %). Devět koček (9 %) bylo infikováno *E. bienersi* genotype D. Žádná z 35 v domácnosti žijících koček nebyla infikována studovanými parazity. Nebyl prokázán vliv věku na výskyt kryptosporidií a mikrosporidií. Podle nám známých skutečností jde o první studii, která se zabývá výskytem kryptosporidií a mikrosporidií u koček v České republice.

**Klíčová slova:** mikrosporidie; kryptosporidie; kočka; člověk; epidemiologie

Grym O. (2014). The role of Felidae in the environmental dissemination of human pathogenic unicellular parasites. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. 73p.

### **Abstract**

One hundred cats at different levels of habituation, house kept and free living, from Czech republic were screened for the presence of *Cryptosporidium*, *Encephalitozoon* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* to consider the risk of close human – cat contact on cryptosporidial and microsporidial infections. The prevalence of *Cryptosporidium*, *Encephalitozoon*, and *Enterocytozoon bieneusi* in cats was determined from fecal specimens by genus-specific PCR. All PCR-positive specimens were sequenced to determine the genotype present. Out of 100 cats, three (3 %) were positive for *Cryptosporidium*, namely *C. felis*. Nine cats (9 %) were infected with *E. bieneusi* genotype D. None out of 35 house kept cats was infected with any tested parasites. No effect of age of animals on occurrence both *Cryptosporidium* and microsporidia was proved. To our knowledge, this is the first report on the presence of zoonotic species/genotypes of *Cryptosporidium*, and *E. bieneusi* in cats in the Czech republic.

**Keywords:** microsporidia; cryptosporidia; cat; human; epidemiology

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě 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 20. 4. 2014

Děkuji doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., vedoucímu diplomové práce, za věnovaný čas a odborné rady při tvorbě této studie.

# Obsah

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Úvod.....  | 10 |
| 2     | Cíle práce .....                                       | 11 |
| 3     | Kryptosporidie a kryptosporidióza .....                | 12 |
| 3.1   | Charakteristika parazita .....                         | 13 |
| 3.2   | Historie .....   | 14 |
| 3.3   | Taxonomie .....  | 14 |
| 3.4   | Životní cyklus .....                                   | 15 |
| 3.5   | Kryptosporidie infekční pro člověka .....              | 20 |
| 3.6   | Zoonotické kryptosporidie v kočičích hostitelích ..... | 21 |
| 3.6.1 | <i>Cryptosporidium parvum</i> .....                    | 22 |
| 3.6.2 | <i>Cryptosporidium muris</i> .....                     | 23 |
| 3.6.2 | <i>Cryptosporidium felis</i> .....                     | 24 |
| 4     | Mikrosporidie a mikrosporidióza.....                   | 26 |
| 4.1   | Charakteristika parazita .....                         | 27 |
| 4.2   | Historie .....   | 27 |
| 4.3   | Taxonomie .....  | 28 |
| 4.3   | Životní cyklus .....                                   | 29 |
| 4.3   | Známé mikrosporidie infekční pro člověka.....          | 32 |
| 4.6   | Zoonotické mikrosporidie v kočičích hostitelích .....  | 34 |
| 4.6.1 | <i>Enterocytozoon bieneusi</i> .....                   | 34 |
| 4.6.2 | <i>Encephalitozoon intestinalis</i> .....              | 37 |
| 4.6.3 | <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....                  | 38 |
| 5     | Metodika práce.....                                    | 42 |
| 5.1   | Původ vzorků.....                                      | 42 |
| 5.2   | Zpracování vzorků.....                                 | 42 |



|       |   |    |
|-------|---|----|
| 5.2.1 | Izolace DNA.....                        | 42 |
| 5.2.2 | Polymerázová řetězová reakce (PCR)..... | 44 |
| 5.2.3 | Gelová elektroforéza .....              | 46 |
| 5.2.4 | Příprava vzorků na sekvenci .....       | 46 |
| 5.2.5 | Statistické zpracování výsledků .....   | 47 |
| 5.2.6 | Fylogenetická analýza .....             | 47 |
| 6     | Výsledky .....                          | 48 |
| 7     | Diskuze .....                           | 50 |
| 8     | Závěry .....                            | 53 |
| 9     | Použité zdroje.....                     | 54 |

# 1 Úvod

Kryptosporidióza a mikrosporidióza jsou jako oportunní onemocnění přenosná mezi zvířaty a lidmi (takzvané zoonózy) cílem vědeckých prací již po desítky let. Velkou pozornost nejen ze strany odborné veřejnosti si obě infekce vysloužily v závěru druhé poloviny minulého století, a to v souvislosti s pandemií syndromu získaného selhání imunity.

Diplomová práce mapuje přenos těchto nemocí na člověka nejen z volně žijících koček, ale také z těch, které běžně obývají lidské domácnosti. Tato zvířata totiž mohou být významným rezervoárem parazitů, kteří mimo jiné vyvolávají výše zmíněná onemocnění.

Pro lidské zdraví mohou představovat riziko nejen kočky, které objektivně trpí příznaky kryptosporidiózy a mikrosporidiózy, ale rovněž zvířata, jež nevykazují žádné typické příznaky těchto onemocnění. Klinické symptomy kryptosporidiózy či mikrosporidiózy totiž nejsou podle této studie pozorovány u koček vždy. Přesto bývají v jejich exkrementech nalézány infekční oocysty, resp. spóry.

Nebezpečí kočkami přenášených zoonóz, v tomto případě kryptosporidiózy a mikrosporidiózy, výrazně navyšuje i sociální chování těchto zvířat. Chovatelé často kočkám dovolují těsný tělesný kontakt. Šelmy mají díky vysoké mrštnosti také neustálý přístup ke kuchyňské lince, stolu, či jim je jen nedostatečně bráněno v přístupu k nebaleným potravinám.

Společný život lidí a koček v jedné domácnosti tak může představovat významné riziko přenosu řady zoonóz. To je mnohonásobně zvýšeno v případě, kdy daný chovatel trpí poruchou imunitního systému. Ta nemusí být vždy způsobena například virem HIV, ale může vznikat také následkem medikace po transplantaci orgánu.

## 2 Cíle práce

Cílem diplomové práce je na základě podrobné literární rešerše a zevrubném praktickém výzkumu zhodnotit vliv a význam zoonotických parazitóz na lidské zdraví, jejímiž původci jsou kryptosporidie a mikrosporidie, a dále s využitím moderních molekulárních metod detekovat ve vzorcích trusu kočkovitých šelem kryptosporidie a mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon*.

Úkolem studie je také určit možné riziko přenosu zoonotických onemocnění z volně žijících a v domácnosti chovaných koček na člověka. Na základě takto zjištěných údajů navrhnout možnosti prevence.

### 3 Kryptosporidie a kryptosporidióza

Kryptosporidióza patří mezi celosvětově rozšířená onemocnění charakterizovaná vleklymi průjmy. Chorobu vyvolávají prvoci rodu *Cryptosporidium*. Mezi projevy této choroby patří nejen nechutenství, ale také úbytek na hmotnosti a malátnost (Meinhardt et al. 1996). Pro imunodeficitní osoby může být i příčinou smrtelného onemocnění.

Poprvé byla lidská kryptosporidióza zadokumentována v sedmdesátých letech minulého století (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976). Až o deset let později v souvislosti s pandemií viru lidské imunitní nedostatečnosti, který je původcem onemocnění AIDS, začala být kryptosporidióze přikládána vyšší důležitost. Pacienti s počtem padesáti a méně T-lymfocytů v mililitru krve jsou dnes považováni za osoby, u kterých je riziko propuknutí kryptosporidiózy velmi vysoké (Current et al. 1983; Forgacs et al. 1983; Ma et Soave 1983; Soave et al. 1984; Fayer et Ungar 1986; Crawford et Vermund 1988; O'Donoghue 1995).

Podle zprávy amerického sdružení Water Works z roku 2006 však stále mnoho lékařů nerozpozná projevy této nemoci. Podle téže studie zároveň existuje mnoho osob, které v případě trávicích obtíží nevyhledávají odbornou pomoc. V Evropě a na severoamerickém kontinentu činí prevalence kryptosporidiózy jedno až tři procenta (CDC 2005, 2006), přičemž v rozvojových zemích je několiknásobně vyšší. Infekce se může šířit kontaminovanou vodou (Van den Akker et al. 2011).

V Asii je míra promořenosti populace kryptosporidiózou odhadována podle amerického Centra pro kontrolu a prevenci nemocí na 5 procent, v Africe na dvojnásobek. Totožná zpráva přitom hovoří až o sto procentech nakažených dětí obývajících vybrané regiony (Rossle et Latif 2013).

Toto parazitární onemocnění nemusí být u osob s rozvinutým selháním imunitního systému lokalizováno jen v trávicím traktu. V takových případech mohou být kryptosporidie lokalizovány i v jiných místech v těle nemocného (Hunter et Nichols 2002). Parazit je dlouhé desítky let považován za běžnou příčinu průjmů u imunodeficitních osob (Current et al. 1983; Jokipii et al. 1983; Tzipori et al. 1983)

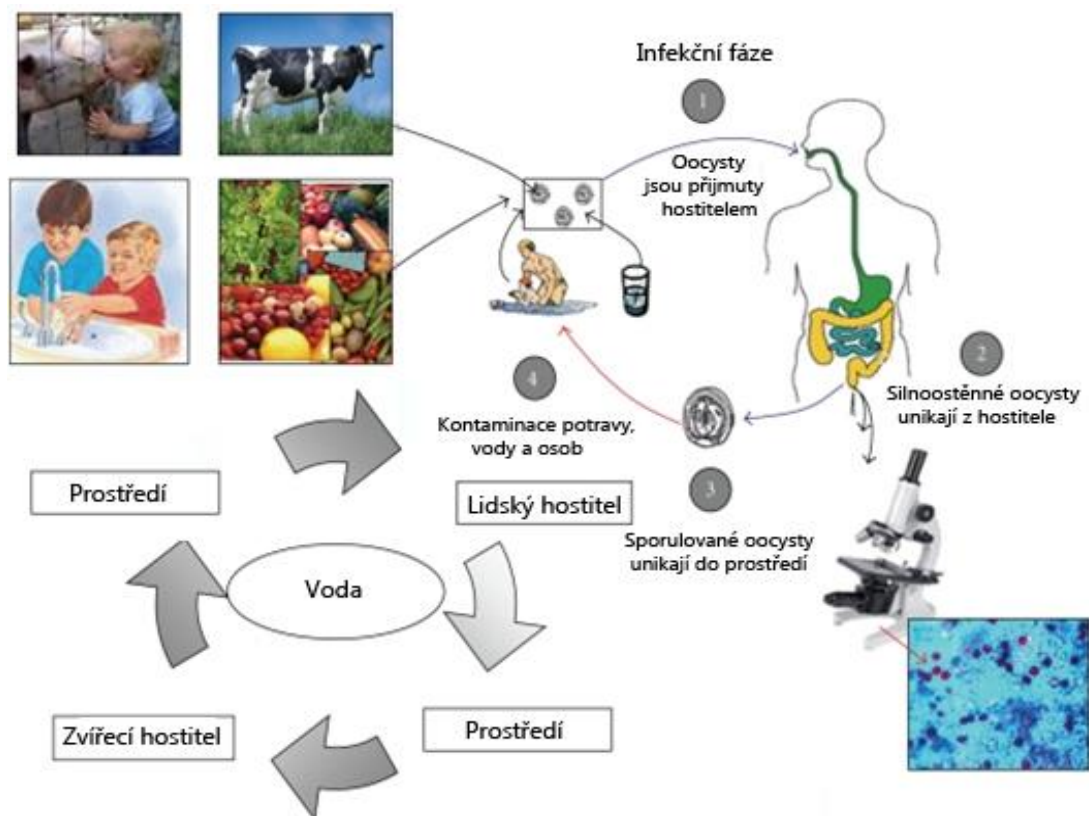
O tom, že je kryptosporidióza opravdu celosvětově rozšířeným onemocněním, svědčí také to, že si podle seroepidemiologických studií vytváří proti kryptosporidiím protilátky až 90 procent celosvětové populace (Dillingham et al. 2002).

### 3.1 Charakteristika parazita

Prvoci rodu *Cryptosporidium* infikují epitelové buňky mikroklků v dýchacím a trávicím traktu obratlovců včetně člověka. Přenos kryptosporidií, které jsou rovněž považovány za nejrozšířenější parazity kontaminující vodní zdroje (Karanis et al. 2007), charakterizují složité nálezové vzorce, jak znázorňuje obrázek č. 1.

Prvok infikuje mnoho živočišných druhů (Jiang et al. 2005; Mathis et al. 2005; Fayer 2007), včetně člověka všech věkových skupin (Guyot et al. 2001; Gatei et al. 2002a,b). Počet známých druhů kryptosporidií dosud není považován za konečný (Fayer 2007).

Obrázek č. 1: Přenos kryptosporidií



(1) Infekční fáze zahájena spolknutím oocyst hostitelem, případně inhalací. Sporozoiti napadají epitelální buňky zažívacího traktu, případně dalších tkání a orgánů, dokončují cyklus produkci oocyst, které opouštějí hostitele, tzv. diagnostická fáze (2). Oocysty jsou vyloučeny do prostředí (3). Kryptosporidie se přenášejí kontaminovanou vodou, potravinami, nebo osobním kontaktem (4). Vyloučena není ani zoonotická nákaza z důvodu expozice infikovaným zvířatům, nebo parazity zamořenému prostředí (4).

Zdroj: Putignani et Menchella (2010); vlastní úprava

## 3.2 Historie

O organismu podobném hromadinkám, který se pomocí organel přichycuje na epitelové buňky trávicího traktu myší, informoval jako první Edward Ernest Tyzzer ve studii z roku 1907. Parazita popsal pod názvem *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). O tři roky později jeho charakteristiku ještě více zpřesnil (Tyzzer 1910), a také navrhl označit celý rod jako *Cryptosporidium* (Tyzzer 1912). V roce 1912 popsal další druh - *Cryptosporidium parvum*, který identifikoval ve střevě laboratorních myší. Později byl totožný organismus identifikován při průjmových chorobách skotu (Panciera et al. 1971).

Na další poznatky ze světa kryptosporidií si musel celý svět počkat až do poloviny padesátých let minulého století. Až v roce 1955 byl totiž identifikován prvok *Cryptosporidium meleagridis*, původce smrtelného onemocnění krůt (Slavin 1955).

O několik let později byly rozpoznány také dva případy kryptosporidiózy u osob se sníženou imunitou, které se pravděpodobně nakazily od chovaných hospodářských zvířat (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976). Kryptosporidiózou trpěla také 52letá osoba se záměrně oslabeným imunitním systémem po transplantaci ledvin (Weisburger et al. 1979).

Tato zoonóza byla v osmdesátých letech popsána v desítkách publikací. Kvůli pandemii AIDS byly zjištěny další případy lidské kryptosporidiózy, která propukala u osob s oslabeným imunitním systémem (Blagburn et Current 1983). Původci onemocnění byli postupně identifikováni také u opic, plazů, prasat či koňů (Fayer et Xiao 2007).

V současnosti je kryptosporidióza nejčastěji diagnostikována u dětí, které žijí v méně rozvinutých krajinách. Ani v případě vyspělých zemí však dosud není vybudován dostatečný zdravotnický dohled, který by spolehlivě informoval o všech případech této zoonózy, jež často nebývá správně diagnostikována (Latif et Rossle 2013).

## 3.3 Taxonomie

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou intracelulární jednobuněční parazitičtí prvoci s DNA v jádře s dvojitou membránou, kteří napadají více než 150 druhů savců včetně člověka (Morgan et al. 1999). Rod *Cryptosporidium* patří spolu s více než 300 dalšími rody do kmene

Apicomplexa se zhruba 4800 známými druhy. Taxonomické zařazení kryptosporidií je uvedeno v tabulce č. 1.

**Tabulka č. 1: Taxonomické zařazení rodu *Cryptosporidium***

| Klasifikace | Jméno                      | Biologický popis  |
|-------------|----------------------------|---|
| Doména      | Eukaryota                  | Buňky obsahují jádro s DNA obklopenou dvojitou membránou, téměř všechny mají mitochondrie   |
| Říše        | Prvoci                     | Převážně jednobuněčné s mitochondriemi, Golgiho aparátem a peroxizomy   |
| Kmen        | Apicomplexa                | Jednobuněční endosymbionti, nebo paraziti se souborem organel k přichycení a pronikání do hostitele   |
| Třída       | Kokcidie                   | Oocysty typicky obsahují infekční sporozoity vyvinuté díky sporogonii. Reprodukce probíhá jak asexuální, tak sexuální formou.   |
| Řád/Podřád  | Eucoccidiorida/Eimeriorina | Merogonie, infikují obratlovce a bezobratlé   |
| Rodina      | Cryptosporidiidae          | Oocysty s obsahem čtyř sporozoitů, které se po pozření uvolňují přes stěnu oocysty, dvě až tři generace merontů, první generace je pravděpodobně schopna recyklovat v těle hostitele, poslední z nich tvoří mikrogametocyty a makrogametocyty. Po oplodnění vzniká ze zygoty oocysta. Sporogonie je endogenní.  |
| Rod         | <i>Cryptosporidium</i>     | Organismem je oocysta se čtyřmi sporozoity  |
| Druh        | <i>C. parvum</i>           | Osídluje zažívací trakt myši, z schizontu po jaderném dělení vzniká 8 merozoitů, časné mikrogametocyty dávají vzniknout 16 mikrogametám 1,5 - 2 mikrometrů dlouhým. Po oplodnění se z makrogamet vytváří tenká membrána cysty, protoplasma se rozděluje a vytvářejí se 4 sporozoity. Dospělá oocysta měří 5 × 4,5 um, dospělý sporozoit je dlouhý 12 - 14 um, vývoj extracelulární, sporozoity v žaludku jsou pravděpodobně autoinfekční. |

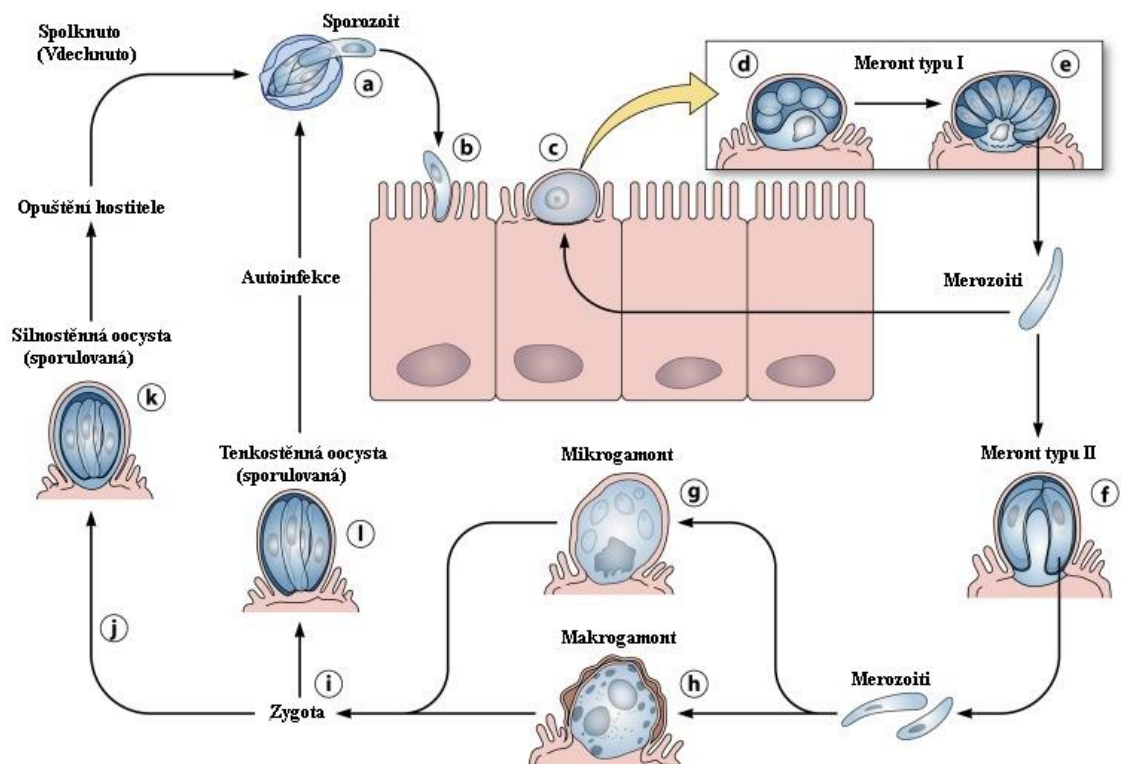
Zdroj: Fayer et al. (2008); Kváč et Ortega (2013)

### 3.4 Životní cyklus

Životní cyklus prvoků rodu *Cryptosporidium* je možné rozdělit do šesti vývojových fází (Current et Garcia 1991): excystaci (uvolnění infekční sporozoitů), merogonii (nepohlavní rozmnožování uvnitř hostitelské buňky), gametogonii (utváření mikro- a

makrogamet), oplodnění (sloučení mikro- a makrogamet), vznik silnostěnných oocyst (zárodky díky tomu přežijí i v nepříznivých podmínkách, které nastávají při jejich přenosu z jednoho hostitele na druhého) a sporogonii (formace infekčních sporozoitů). Vývoj parazita začíná příjmem sporulovaných oocyst, které pozře vhodný hostitel. Oocysty následně procházejí excystací. V jejich stěně se otevírá šev, přes který se do okolí uvolní čtyři infekční sporozoity (Reduker et Speer 1985), jak popisuje obrázek č. 2.

**Obrázek č. 2: Životní cyklus kryptosporidie v enterocytu**



Schematické znázornění životního cyklus organismu *Cryptosporidium parvum*. Po excystaci z oocyst ve střevech (a), napadnou sporozoiti hostitelskou buňku (b) a vytvářejí trofozoity (c) uvnitř parazitoformní vakuoly v oblasti slizničního epitelu. Trofozoiti procházejí merogonií (d, e) a formují merozoity. Poté, co se uvolní z merontů typu I, invazivní merozoity infikují do přilehlé hostitelské buňky, a vytvářejí další meronty typu I nebo vytvářejí meronty typu II (f). Meronty typu II procházejí sexuální fází za vzniku mikrogametů (g) a makrogametů (h). Z většiny zygot (i) vytvořených po oplodnění mikrogamontů mikrogametami (uvolňují se z mikrogamontů) se vyvíjejí odolné silnostěnné oocysty (j), které procházejí sporogonií a vytvářejí sporulované oocysty (k) se čtyřmi sporozoity. Sporulované oocysty se dostávají do prostředí spolu s exkrementy a jsou zdrojem infekce pro další vhodné hostitelské organismy. Přibližně pětinu zygot odděluje od okolního prostředí pouze membrána kryjící čtyři sporozoity. Tyto tenkostěnné oocysty (l) reprezentují autoinfekční životní cyklus kryptosporidií, který udržuje přítomnost parazita v hostiteli bez toho, že by musel přijmout silnostěnné oocysty vyskytující se v prostředí.

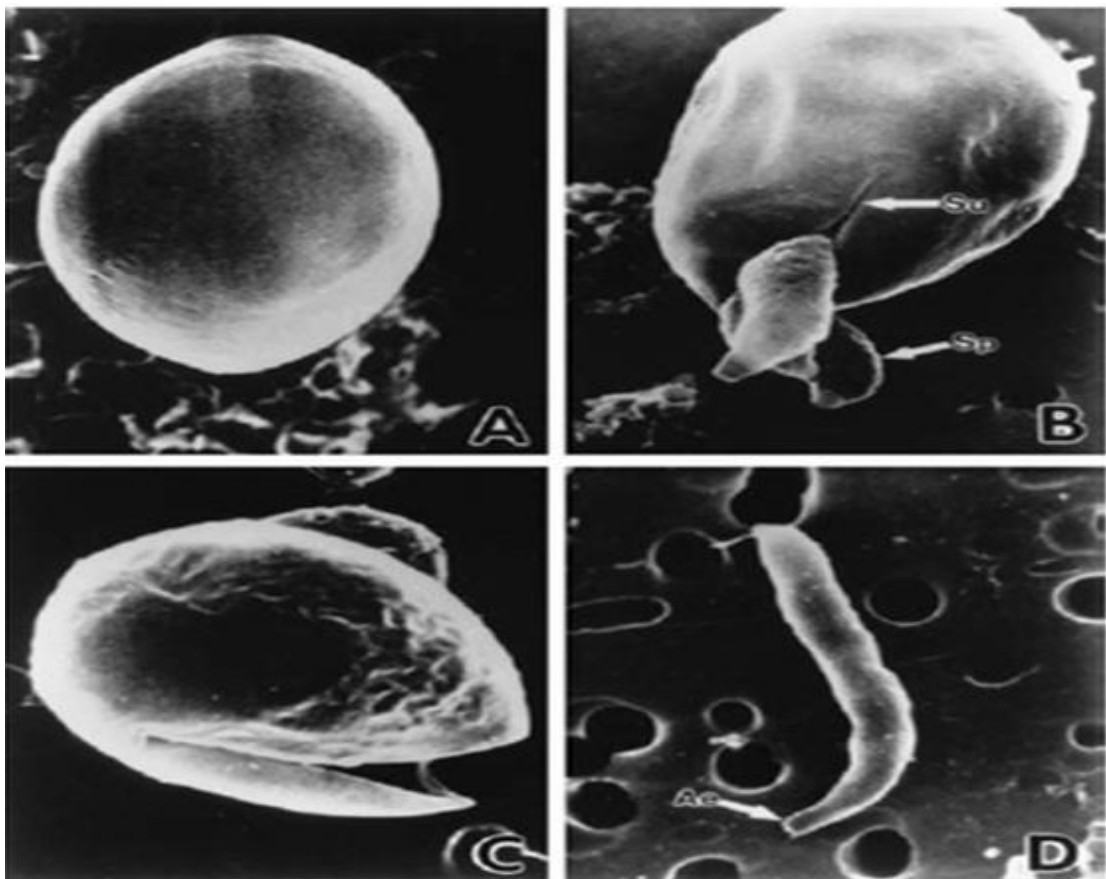
Zdroj: Current et Garcia (1991); vlastní úprava



K excystaci dochází souběhem vhodných okolních podmínek, které jsou součástí trávicích procesů. Například příznivým obsahem oxidu uhličitého, vhodných enzymů, teploty nebo obsahu žluči (Fayer et Leek 1984; Reduker et Speer 1985; Blagburn et al. 1987; Robertson et al. 1993; O'Donoghue 1995).

V experimentálních podmínkách se ukázalo, že oocysty mohou uvolňovat do okolí sporozoity, i když jsou vystaveny teplejšímu vodnému roztoku. To potvrzuje možnost infekce také v místech jako je oční spojivka, dýchací trakt, žlučník, lymfatické uzliny, varlata, vaječníky, děloha a vagína (Fleta et al. 1995). Sporozoiti se po excystaci (viz obrázek č. 3) pohybují po buňkách střevní stěny a infikují je pomocí organel apikálního komplexu (Okhusen et Chappell 2002).

**Obrázek č. 3: Snímek oocysty a excystovaných sporozoitů z elektronového mikroskopu**

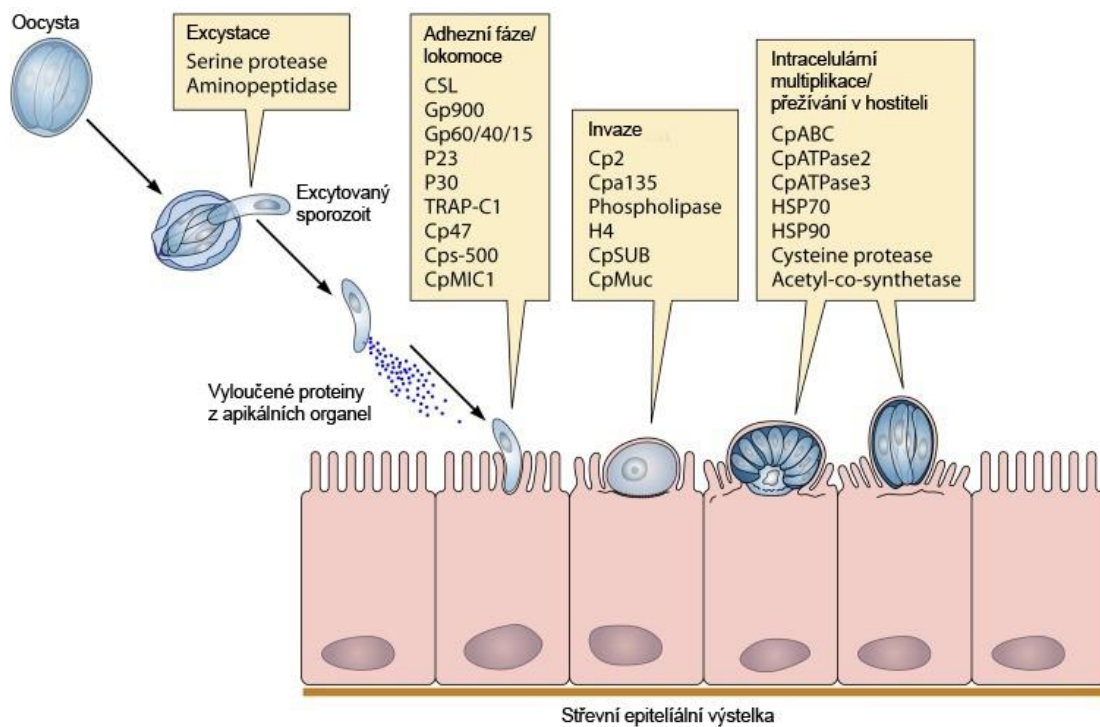


- (A) Neporušená oocysta před excystací (zvětšení 16 000×)
- (B) Trojice sporozoitů opouštějících oocystu (zvětšení 16 000×)
- (C) Prázdňá oocysta (zvětšení 16 000×)
- (D) Uvolněný sporozoit (zvětšení 14 000×)

Zdroj: Reduker et al. (1985)

Parazit se vyznačuje monoxenním životním cyklem, který je dokončen v zaživacím systému jediného hostitele. Během něj se tento prvok v různých fázích vývoje omezuje na apikální části hostitelských buněk. Organismus se přitom stává součástí napadené buňky, lokalizován je ale mimo cytoplasmu (Barta et Thompson 2006), jak objasňuje obrázek č. 4.

**Obrázek č. 4: Mechanismus přichycení *C. parvum* na povrchu střevní buňky**



Podle nejnovějších zjištění mají proteiny, které se účastní interakce s hostitelskou buňkou, podobné vlastnosti v rámci všech zástupců kmene Apicomplexa. V invazivní fázi při uvolnění sporozoitů a merozoitů jsou vypuzovány na povrch *Cryptosporidium parvum*. K hostitelské buňce putují spolu se zoity (Strong et al. 2002; Tzipori et Ward 2002). Přesný popis jejich funkcí ale dosud odhalen nebyl (Okhuysen et Chappell 2002).

Zdroj: Bouzid et al. (2013)

Kryptosporie se zapouzdří v cytoplasmatické membráně, přičemž vytvoří takzvanou parazitoformní vakuolu (Thompson et al. 2005). Zde je prvok chráněn před nepřátelským prostředím zaživacího ústrojí hostitele a zároveň je zásobován potřebnými výživovými zdroji prostřednictvím přichycovací organely. Ta je mimo jiné unikátním ústrojím v rámci kmene Apicomplexa, v němž jsou v současnosti tyto prvoci zařazeni (Tzipori et Ward 2002). Podle některých studií však kryptosporidie neprocházejí jen intracelulární vývojovou fází. Například *C. parvum* nejspíše charakterizuje několik extracelulárních životních etap (Rosales et al. 2005).

Kryptosporidie se množí jak asexuálně (merogonie), tak sexuálně (gametogonie). Proces charakterizuje vznik mikrogamontů a makrogamontů. Po oplodnění makrogamontů mikrogametami se vyvíjí oocysta, která sporuluje a infikuje hostitele. Při tomto ději se vytvářejí dva odlišné typy oocyst - silnostěnné, které jsou vylučovány hostitelem a tenkostěnné, které se uplatňují při autoinfekci.

Každý ze sporozoitů se vyvíjí ve sférický trofozoit, který prochází merogonií a formuje meronty typu I. Obsahují celkem osm merozoitů (O'Donoghue 1995), kteří se uvolňují do okolního prostředí a snaží se přichytit na povrch další epitelální buňky. Zde ještě jednou procházejí merogonií a vytváření meronty typu I a II. Posledně jmenovaný obsahuje čtyři merozoity, které se po přichycení k epitelální buňce nevytvářejí další meronty, ale procházejí gametogonií. Tyto meronty produkují jak samčí mikrogamonty, tak samičí makrogamety (Göbel et Brändler 1982; Smith et Rose 1998).

Každý z mikrogamotů projde jaderným dělením a diferencuje se v maximálně šestnáct mikrogamet. Ty po opuštění parazitoformní vakuoly vyhledají a oplodní jednobuněčný makrogametocyt, který se vyvine v makrogamontu.

Důsledkem fertilizace se stává zygota. Každá obsahuje čtyři sporozoity (Current et Reese 1986). Silnostěnné oocysty jsou uvolněny do střev, a z gastrointestinálního traktu jsou vyloučeny v exkrementech. Infekční jsou okamžitě - v prostředí čekají jen na vhodného hostitele (Smith et Rose 1998).

Oocysty s tenkou stěnou mohou excystovat ještě v těle hostitele. Životní cyklus kryptosporidií tak v této fázi začíná nanovo (Current et Reese 1986; Sińsko et Behnke 2004).

Autoinfekce a obnova merontů typu I jsou vysvětlením chronických infekcí (Jokipee et Jokipii 1986; Dupont et al. 1995; Okhuysen et al. 1999).

### 3.5 Kryptosporidie infekční pro člověka

Prvoci rodu *Cryptosporidium* infikují povrch epiteliální buněk v respiračním či trávicím traktu všech obratlovců, člověka nevyjímaje. Ten je nejčastěji nakažen pro něj specifickým druhem *C. hominis*, dále pak druhem *C. parvum*, který je nalézán ve většině teplokrevných zvířat.

Přestože většina druhů kryptosporidií patří mezi hostitelsky specifické parazity, jsou na základě současných znalostí rozpoznávány dvě desítky různých druhů kryptosporidií, které jsou infekční pro člověka, viz tabulka č. 2.

**Tabulka č. 2: Známé druhy a genotypy rodu *Cryptosporidium* infekční pro člověka**

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <i>C. andersoni</i>               | <i>C. parvum</i>                         |
| <i>C. canis</i>                   | <i>C. scrofarum</i>                      |
| <i>C. cuniculuss</i>              | <i>C. suis</i>                           |
| <i>C. erinacei</i>                | <i>C. tyzzeri</i>                        |
| <i>C. fayeri</i>                  | <i>C. ubiquitum</i>                      |
| <i>C. felis</i>                   | <i>C. viatorum</i>                       |
| <i>C. hominis</i>                 | <i>C. wrairi</i>                         |
| <i>C. hominis</i> monkey genotype | <i>Cryptosporidium</i> horse genotype    |
| <i>C. meleagridis</i>             | <i>Cryptosporidium</i> chipmunk genotype |
| <i>C. muris</i>                   | <i>Cryptosporidium</i> skunk genotype    |

Zdroj: Rose 1997; Smith et Rose 1998; Ryan et al. 2004; Cacciò et al. 2005; Feltus et al. 2006; Smith et al. 2006; Kváč et al. 2008; Xiao et Ryan 2008; Rašková et al. 2013; Ortega et Kváč 2013; Li et al. 2014

Onemocnění vyvolaná tímto parazitem mohou být akutní a hostitele přímo ohrožovat na životě, jiná však mohou odeznít po mírných příznacích či přejít do chronické formy (Putignani et Menchella 2010). Akutní či chronický průběh kryptosporidiózy je charakteristický zejména pro osoby s poruchami imunity.

Osoby s imunokompetentním systémem se s kryptosporidiózou v drtivé většině případů vyrovnávají bez dalších zdravotních následků (Waldron et al. 2009). Různé druhy kryptosporidií charakterizuje odlišné místo vývoje a lokalizace spolu s mírou infekčnosti pro daného hostitele. Lidská kryptosporidióza je nejčastěji dávána do souvislosti s příjmem kontaminované vody a jídla (Van den Akker et al. 2011). Dalším významným zdrojem nákazy bývá přímý kontakt člověka s nemocnými zvířaty nebo s dalšími osobami (Rossle et Latif 2013).

### 3.6 Zoonotické kryptosporidie v kočičích hostitelích

Prvoci rodu *Cryptosporidium* byli u koček vůbec poprvé popsáni v Japonsku (Iseki 1979). Přirozeně infikované kočky vylučovaly sporulované oocysty o velikosti  $5,0 \times 4,5$  mikrometrů. Po následných pozorováních a studiích byl organismus pojmenován jako *Cryptosporidium felis*. Později byly popsány symptomatické a asymptomatické kryptosporidiózy mezi kočkami z celého světa (Bennett et al. 1985; Arai et al. 1990; Mtambo et al. 1991; Lappin et al. 1997; Hill et al. 2000; Círak and Bauer 2004; Santín et al. 2006).

Následné seroprevalentní studie provedené například v České republice, ve Spojených státech amerických či v Německu prokázaly, že až tři čtvrtiny vyšetřovaných koček mají v těle specifické protilátky proti prvokům rodu *Cryptosporidium* (Tzipori et al. 1981; Lappin et al. 1997; McReynolds et al. 1999; Círak and Bauer 2004). Konvenční koproskopické metody pak ukázaly, že oocysty kryptosporií vylučují i objektivně zcela zdravé kočky (Arai et al. 1990; Asahi et al. 1991; Mtambo et al. 1991).

Oocysty byly popsány také ve výkalech koček s perzistentními průjmy (Bennett et al. 1985; Monticello et al. 1987; Goodwin et Barsanti 1990; Lent et al. 1993; Barr et al. 1994).

Ještě lepší možnosti v detekci oocyst kryptosporií nejen u kočičích hostitelů nabízejí molekulární metody na základě polymerázové řetězové reakce (Fayer 2007). Takto byly u koček odhaleny tři druhy kryptosporidií. Jmenovitě se jedná o *C. parvum*, *C. felis* a *C. muris* (Morgan et al. 1998; Sargent et al. 1998; Scorza et al. 2003; Hajdušek et al. 2004; Santín et al. 2006; Pavlásek et Ryan 2007).

### **3.6.1 *Cryptosporidium parvum***

#### **Infekce u člověka**

*Cryptosporidium parvum* patří mezi nejčastěji identifikované druhy kryptosporidií mezi obratlovci. Parazit, který infikuje krajinu tlustého i tenkého střeva (Tzipori et al. 1981), byl vůbec poprvé popsán u myši (Tyzzer 1912).

Oocysty nemívají v průměru více než  $5 \times 4,5 \mu\text{m}$  (Upton et Current 1985). Zoonotický charakter *C. parvum* s velkou pravděpodobností souvisí s jeho fylogenetickou příbuzností s *C. hominis* (Xiao et Ryan 2004). Inkubační perioda u člověka, počítáno od příjmu oocyst po projevení klinických příznaků, se může pohybovat od 2 do 14 dnů. Průměrná doba je 3 až 8 dnů.

Gastrointestinální příznaky většinou přetrvávají od 3 do 21 dnů, někdy dokonce i šest týdnů. Nákaza se projevuje slabostí, letargií, bolestmi břicha a vleklými průjmy, jež trvají po dobu jednoho měsíce (Casemore 1993). Vylučování oocyst probíhá nepravidelně a může probíhat i po následujících 50 dnů po vymizení příznaků nemoci.

#### **Infekce u koček**

Experimentální infekce *C. parvum* byly u osmi koček chovaných v domácím prostředí prokázány v roce 2003 (Scorza et al. 2003). Parazit byl v kočičích výkalech nalezen sice již o několik let dříve, avšak ve studiích Lappina a Hilla byly oocysty *C. parvum* identifikovány pouze na základě konvenční mikroskopie (Lappin et al. 1997; Hill et al. 2000), nikoliv díky molekulární charakteristice.

#### **Další hostitelé**

Onemocnění vyvolaná *C. parvum* byla dosud popsána hlavně mezi přežvýkavci (dobytek, ovce, kozy, jeleni) a lidmi. Parazit může být příčinou infekce také mezi prasaty a v koloniích myši (Morgan et al. 1999). Prvok byl v roce 2004 spolu s *C. hominis* identifikován u bernešky velké. Hostitelem této kryptosporidie bylo více než deset procent vyšetřovaných ptáků (Zhou et al. 2004). Na přítomnost *C. parvum* upozornil v roce 2012 také Gomes et al. (2012). Kryptosporidie byla nalezena u chůvičky japonské (*Lonchura striata domestica*).

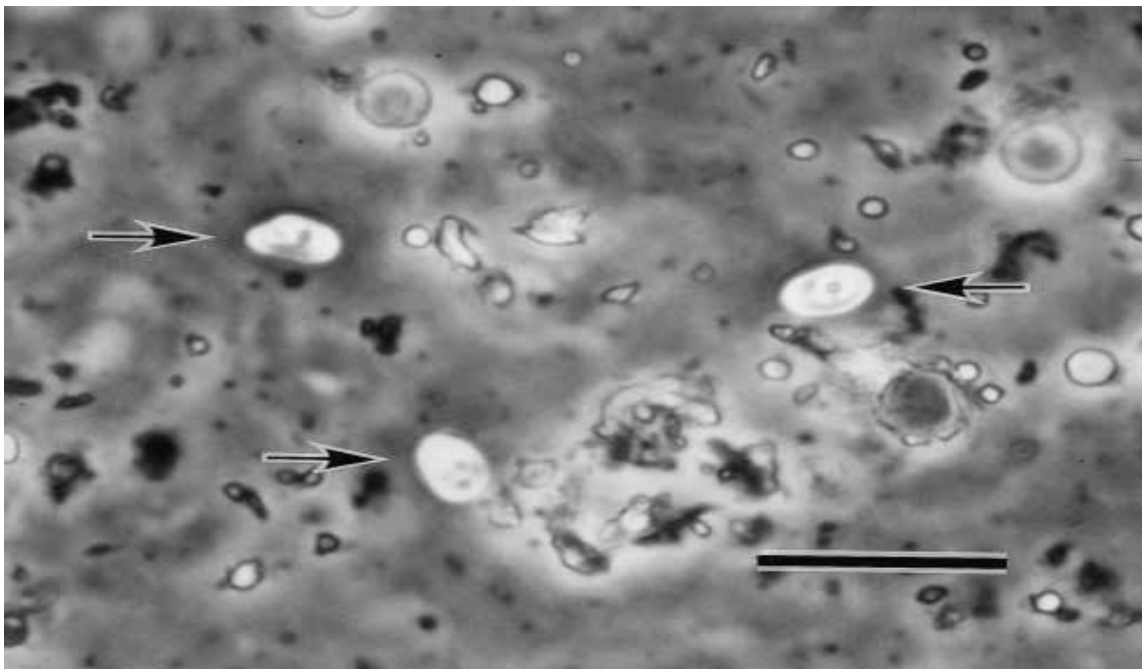
### 3.6.2 *Cryptosporidium muris*

#### Infekce u člověka

*Cryptosporidium muris* není v současnosti považován za běžný lidský patogen. Začátkem 21. století však byla onemocnění tímto prvokem prokázána u HIV pozitivních osob z Indonésie (Katsumata et al. 2000), Thajska (Tiangtip et Jongwutiwes 2002), Francie (Guyot et al. 2001) či Keni (Gatei et al. 2006).

Parazit byl popsán v řadě lidských hostitelů (Tiangtip et Jongwutiwes 2002), hlavně mezi osobami s oslabeným imunitním systémem (Guyot et al. 2001; Palmer et al. 2003; Gatei et al. 2006). V roce 2000 identifikoval přítomnost oocyst *C. muris* Katsumata a kolektiv (2000) v exkrementech zcela zdravé dívky, viz obrázek č. 5.

#### Obrázek č. 5: Fázová kontrastní mikroskopie oocyst *Cryptosporidium muris* ze zdravé dívky z Indonésie



Světle znázorněné oocysty obsahují černá reziduální tělíska.

Zdroj: Tatsuya et al. (2000)

#### Infekce u koček

*Cryptosporidium muris*, který je původcem gastroenteritidy u kočkovitých šelem, se v těchto zvířatech podařilo prokázat v roce 2007 (Pavlásek et Ryan 2007). V rámci této studie

bylo šest ze sedmi odebraných vzorků během jednoho měsíce pozitivních na prvoky rodu *Cryptosporidium*, což svědčí o aktivně probíhající infekci.

Oocysty *C. muris* byly u hostitele stejného druhu objeveny také o několik let dříve. V tomto případě však nebylo zcela jasné, zda šlo o probíhající infekci, či jen o vyloučení oocyst z pozřeného nemocného hlodavce (Santín et al. 2006).

### **Další hostitelé**

Parazitického prvoka *Cryptosporidium muris*, který se pomocí organel přichycuje také na epitelové buňky trávicího traktu myší, popsal jako první Edward Ernest Tyzzer (Tyzzer 1907). *Cryptosporidium muris* je infekční rovněž pro řadu dalších hostitelů včetně křečků, veverek, horských koz, mar stepních, damanů, opic či makaků (Anderson 1991; Chalmers et al. 1997; Xiao et al. 1999; Torres et al. 2000; Guyot et al. 2001; Morgan et al. 2001; Dubey 2002; Gatei et al. 2002; Tiangtip et al. 2002; Palmer et al. 2003). Parazit byl identifikován i u hadů, varanů a užovek (Morgan et al. 1999; Ryan et al. 2003). V roce 2006 byl popsán jako původce onemocnění lelkouna soviho (*Podargus stridoides*) (Ng et al. 2006).

### **3.6.2 *Cryptosporidium felis***

#### **Infekce u člověka**

Oocysty *Cryptosporidium felis* poprvé pozoroval v lidských výkalech Iseki v roce 1979. S použitím elektronového mikroskopu Iseki ve stejné době podrobně popsal endogenní vývojovou fázi tohoto prvoka, který může infikovat i další živočišné druhy (Iseki 1979). Pozdější morfologické analýzy vedly ke zjištění, že se velikost oocyst *C. felis* pohybuje v průměru od 4,0 do 4,6  $\mu\text{m}$  (Sargent et al. 1998).

Parazit je v současnosti zařazen v odborných publikacích za jednoho z původců kryptosporidiózy, která může vzniknout nejen u imunodeficientních, ale také imunokompetentních osob. Kryptosporidióza vyvolaná *C. felis* byla popsána v mnoha zemích (Pedraza-Diaz et al. 2001; Matos et al. 2004; Leoni et al. 2006; Cama et al. 2008).

Možným přenosem *C. felis* z koček na člověka se zabývala studie šesti pacientů z roku 2000 (Morgan et al. 2000). Trojice z těchto osob, které výše zmíněným onemocněním trpěli, chovali doma kočku. Studie volně navazovala na dřívější zprávu původem z Anglie popisující



případ majitele kočky, který zároveň jako jeho zvíře vykazoval zdravotní následky kvůli nemoci vyvolané kryptosporidii (Bennett et al. 1985).

V roce 2002 byl popsán první HIV pozitivní pacient pocházející z Itálie, který byl úspěšně vyléčen z kryptosporiízy vyvolané *C. felis*. Přestože bylo v jeho organismu velmi málo bílých krvinek, léčba paromomycinem byla úspěšná.

### **Infekce u koček**

*Cryptosporidium felis* je dnes považováno za hlavního původce přirozeně se vyskytujících infekcí u koček nejen v České republice, ale také Portugalsku, Spojených státech amerických či v Kolumbii (Alves et al. 2001; Ryan et al. 2003; Hajdušek et al. 2004; Santín et al. 2006; Fayer et al. 2007).

### **Další hostitelé**

Morfometrické analýzy oocyst získaných z kočičích exkrementů odhalily, že se jejich velikost pohybuje v rozmezí od  $4,3 \times 4,7 \mu\text{m}$ , přes  $4,5 \pm 0,22 \mu\text{m}$  a od  $3,8 \times 4,8$  přes  $4,6 \times 4,9 \mu\text{m}$  po  $4,0 \times 4,6 \mu\text{m}$ . Oocysty parazita byly prokázány také ve výkalech krav (Bornay-Linares et al. 1999). Na druhou stranu se ale nepodařilo prokázat přenos *C. felis* na myši, krysy, morčata a psy (Asahi et al. 1991).

## 4 Mikrosporidie a mikrosporidióza

Mikrosporidióza patří mezi celosvětově rozšířená onemocnění, která se vyznačují zejména těžkými průjmy, nechutenstvím či malátností (Slodkiewicz-Kowalska et al. 2006; Adamu et al. 2014). Chorobu vyvolávají jednobuněčné organismy - mikrosporidie. Jejich zoonotický potenciál byl poprvé prokázán ve druhé polovině minulého století (Matsubayashi et al. 1959). U imunodeficitních jedinců může mít mikrosporidióza fatální průběh končící smrtí nakaženého jedince.

Mikroskopičtí paraziti se u osob s rozvinutým selháním imunitního systému nemusejí vyskytovat pouze v trávicím traktu, ale často se rozšiřují i do dalších míst v těle nemocného (Hunter et Nichols 2002). Mikrosporidie infikují bezpočet živočišných druhů (Mathis et al. 2005).

U člověka byly mikrosporidie popsány ve všech věkových skupinách. Vlivem špatných výrobních postupů, například v úpravách pitné vody, se mohou paraziti vyskytovat téměř kdekoliv (Charles et al. 2003; Reynolds et al. 2008).

Přestože zdroje a cesty přenosu mikrosporidií infekčních pro člověka nebyly stále jednoznačně popsány, poznatky získané v uplynulých letech hovoří ve prospěch jejich zoonotického charakteru. (Dengjel et al. 2001; Buckholt et al. 2002). Mikrosporidie, které se u infikovaných osob vyskytují nejčastěji v dýchací a trávicí soustavě a jsou vylučovány prostřednictvím spór v moči a exkrementech, se totiž mohou na další osoby přenášet fekálně-orální, orálně-orální cestou, či inhalací kontaminovaných aerosolů nebo požitím kontaminované vody a potravin (Schwarz et al. 1995; Deplazes et al. 2000; Mota et al. 2000; Weber et al. 2000).

## 4.1 Charakteristika parazita

Mikrosporidie jsou rozmanitou skupinou eukaryotních parazitických organismů. Jejich význam z hlediska zdravotních následků pro člověka postupně rostl, hlavně ve dvou posledních desetiletích. Do současnosti bylo popsáno více než 1300 druhů, které jsou zařazeny ve 160 rodech (Sprague et al. 1992; Weber et al. 1999b; Wittner et Weiss 1999; Franzen et Müller 2001; Lee et al. 2009; Choudhary et al. 2011). Parazit vytváří intracelulární spóry (Sprague 1977; Sprague et al. 1992; Sprague et Becnel 1998), které infikují širokou řadu živočišných druhů od hlístic, přes koryše (Keeling et Fast 2002), po člověka, v některých případech také vybrané zástupce říše protistů (Troemel et al. 2008). Z dnes známých druhů mikrosporidií je patnáct infekčních pro člověka, hlavně pro osoby s poruchami imunity; vyskytují se však také u imunokompetentních osob (Mathis et al. 2005; Didier et Weiss 2008). Zvláště rozšířené jsou mikrosporidie mezi rybami a v hmyzí říši. Většina bezobratlých živočichů nebyla na přítomnost mikrosporidií vyšetřena (Keeling 2009).

## 4.2 Historie

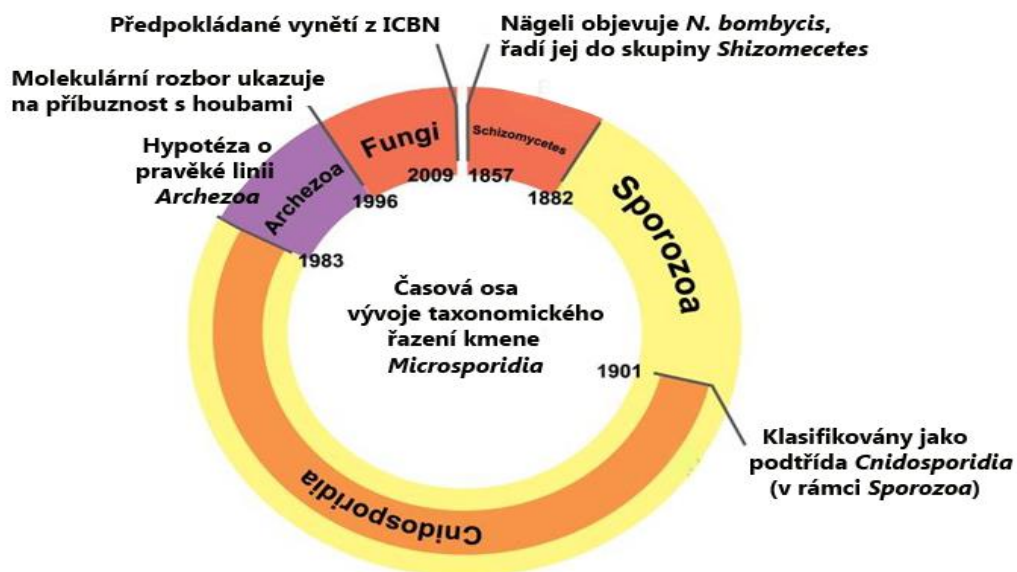
Záhadná úmrtí kolonií bource morušového byla počátkem 19. století připsána na vrub mikrosporidióze (Nägeli 1897). Trvalo dalších zhruba sto let, než byla stejná nemoc vyvolána jiným druhem tohoto parazita odhalena také jako příčina neurologických poruch králíků (Wright et Craighead 1922). V šedesátých letech minulého století již bylo jasné, že se choroba nevyhýbá ani člověku. Infekce byla totiž jako vůbec poprvé zjištěna u devítiletého dítěte (Matsubayashi et al. 1959). V osmdesátých letech se podařilo zaznamenat dvanáct případů lidské mikrosporidiózy (Wittner et Weiss 1999). V polovině 90. let diagnostikoval Desportes a jeho tým průjmové onemocnění vyvolané *Enterocytozoon bienersi* u osob se syndromem získaného selhání imunity (Desportes et al. 1985). Mikrosporidióza vyvolaná různými druhy stejnojmenného parazita byla následně diagnostikována mezi mnoho osobami, přičemž jejími oběťmi nebyli jen lidé s poruchami imunitního systému, či po transplantacích. Infekce byly zjištěny rovněž u imunokompetentních osob (Weber et Bryan 1994; Sax et al. 1995; Wanke et al. 1996; Raynaud et al. 1998; Gumbo et al. 1999; Wittner et Weiss 1999; Metge et al. 2000; Lores et al. 2002; Lewis et al. 2003).

### 4.3 Taxonomie

Nejen díky unikátnímu infekčnímu aparátu, takzvanému polárnímu filamentu (Xu et Weiss 2005), který je vlastním všem zástupcům kmene Microsporidia, je velmi obtížné tyto organismy srovnávat s ostatními eukaryoty. A tudíž je také zařadit do některé z již existujících skupin živočichů. Kromě klasických eukaryotních znaků, například jádra nebo cytoskeletu, rovněž obsahují prvky známé ze světa prokaryotních živočichů (Mathis et al. 1999). Také proto byly nejprve zařazeny do říše Archezoa (Cavalier-Smith 2002). Kvůli domnělé nepřítomnosti mitochondrií byly mikrosporidie popisovány jako prehistorický pozůstatek eukaryotické linie (Vossbrinck et al. 1986). Nové fylogenetické studie a genetický rozbor ale ukázaly na evoluční příbuznost mikrosporidií se zygomycetami (Lee et al. 2010).

Nepřítomnost mitochondrií v mikrosporidiích vyvrátil objev redukovaných mitosomů (Williams et al. 2002). V návaznosti byly v genetickém kódu mikrosporidií popsány syntenické geny (RPL21 a RPS9), které jsou ve stejném pořadí uloženy také v genomu celé říše hub (s několika výjimkami, například *Schizosaccharomyces pombe*). Začlenění mikrosporidií jakožto vysoce specializovaných vnitrobuněčných parazitů do fylogenetického stromu není vyřešeno ani dnes (Corradi et al. 2009). Odborníci zvažují vyloučení mikrosporidií z botanické nomenklatury ICBN. V takovém případě by je zařadili do zoologické nomenklatury ICZN (Redhead et al. 2009), jak dokumentuje obrázek č. 6.

Obrázek č. 6: Taxonomické zařazení mikrosporidií

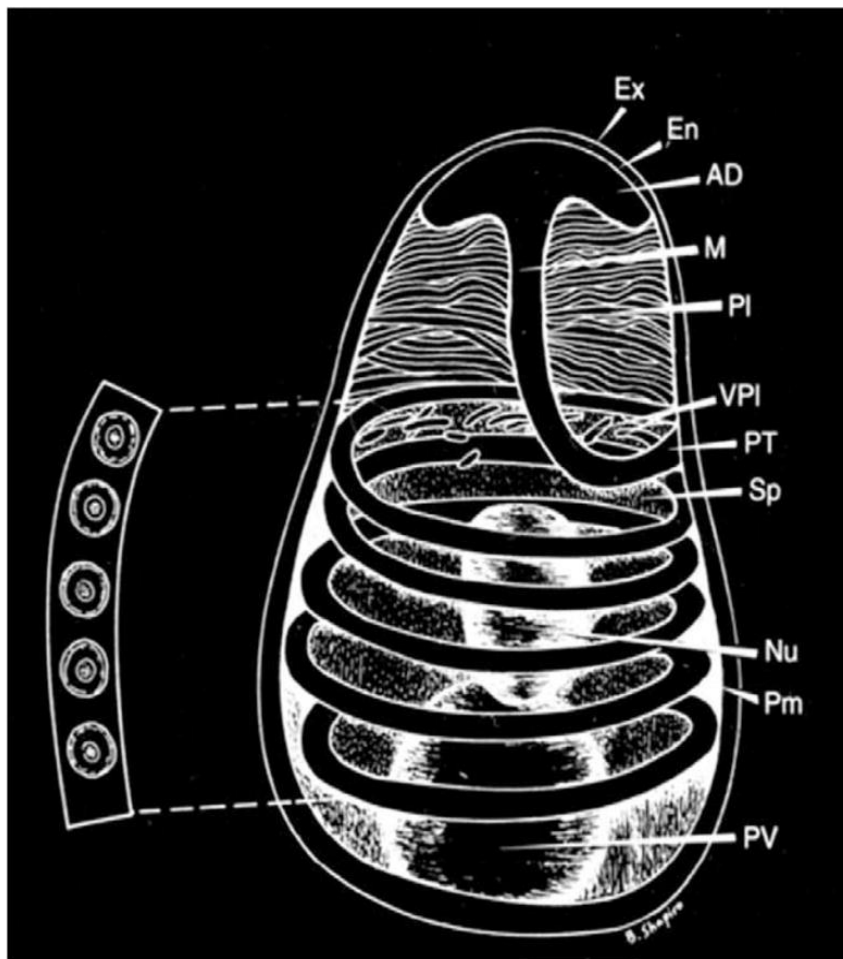


Zdroj: Keeling (2009)

### 4.3 Životní cyklus

Životní cyklus mikrosporidie se vyznačuje růstovou (proliferační) fází, vytvářením spór (sporogonií) a takzvanou infekční fází, ve které může dospělá spóra infikovat vhodného hostitele (Xu et Weiss 2005). Spóra (obrázek č. 7) je chráněna vnějším obalem před nepříznivými účinky okolního prostředí. Zároveň se jedná o jediný dosud popsáný stav, kdy je mikrosporidie schopna přežít mimo hostitelskou buňku (Vávra et Larson 1999). Velikost spór se pohybuje od 1 do 10 mikrometrů.

Obrázek č. 7: Schéma spóry mikrosporidie

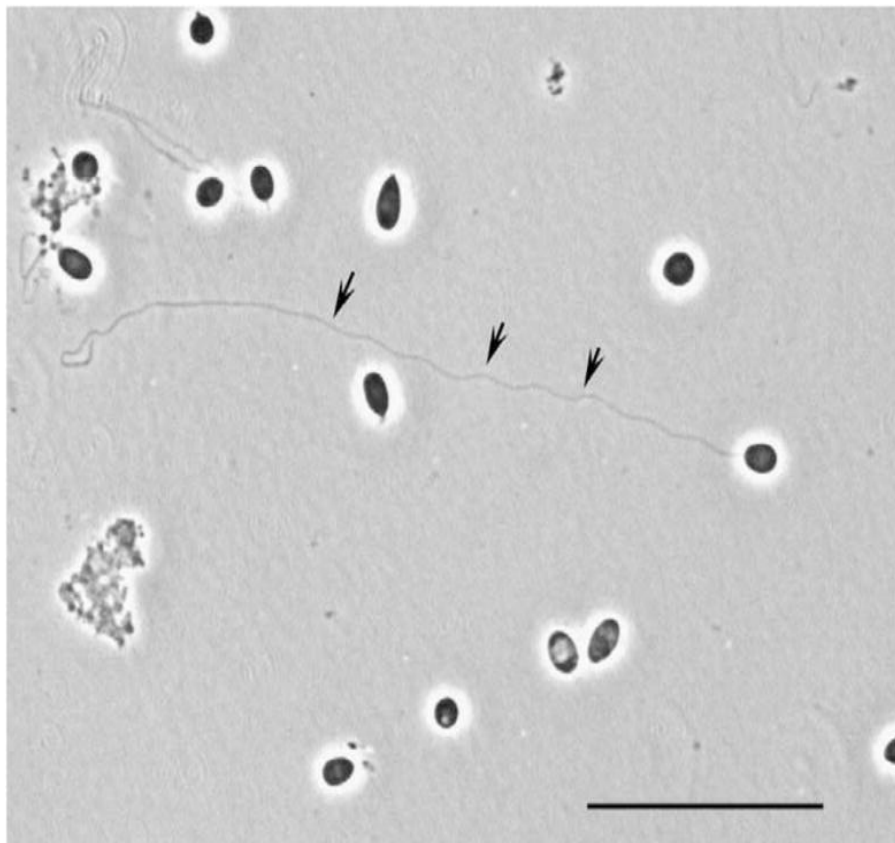


Obal spóry se skládá z elektronodensní exospóry (Ex), z elektronlucentní endospóry (En), zadní vakuoly (PV), ribozomů a vnitřní plazmatické membrány. Sporoplasma (Sp) obsahuje jedno jádro (Nu) (tzv. monokaryon; existují také spóry se sporoplasmou se dvěma jádry - tzv. diplokaryon). Polární trubice je připevněna ke spóře kotevním diskem (AD). Kotevní disk je rozdělen na tzv. přímou část - manubrium (M) a zadní oblast tvořenou cívkami (PT), které obtáčejí sporoplasma. Manubrium obklopuje lamelární (PI) a vesikulární polaroplast (VPI).

Zdroj: Wittner et Weiss (1999)

Parazit je vybaven unikátním specializovaným infekčním orgánem, tzv. polárním filamentem (Xu et Weiss 2005). V dormantních spórách je stočen uvnitř. Při stimulaci - stimulem mohou být pH, teplota, koncentrace soli (Hashimoto et al. 1976; Undeen et Avery 1984; Undeen et Epsky 1990), se filament rozvine (viz obrázek č. 8), vymrští a proniká membránou hostitelské buňky. Proces probíhá velmi rychle. Šipky v níže uvedeném obrázku ukazují na extrudovaný polární filament.

**Obrázek č. 8: Germinace spór *Brachiola algerae* ve vodném kyselém roztoku**

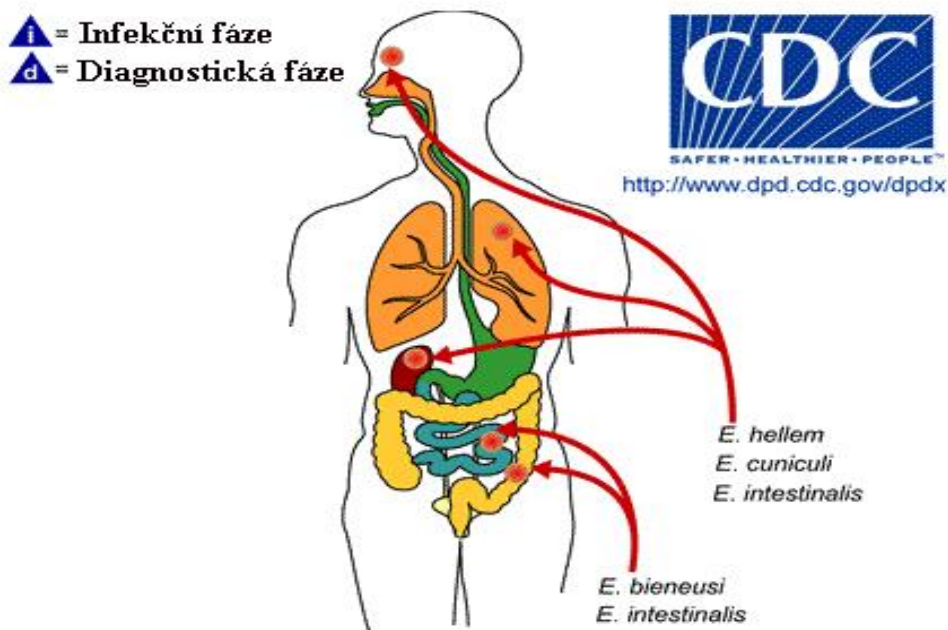


Zdroj: Xu et Weiss (2005)

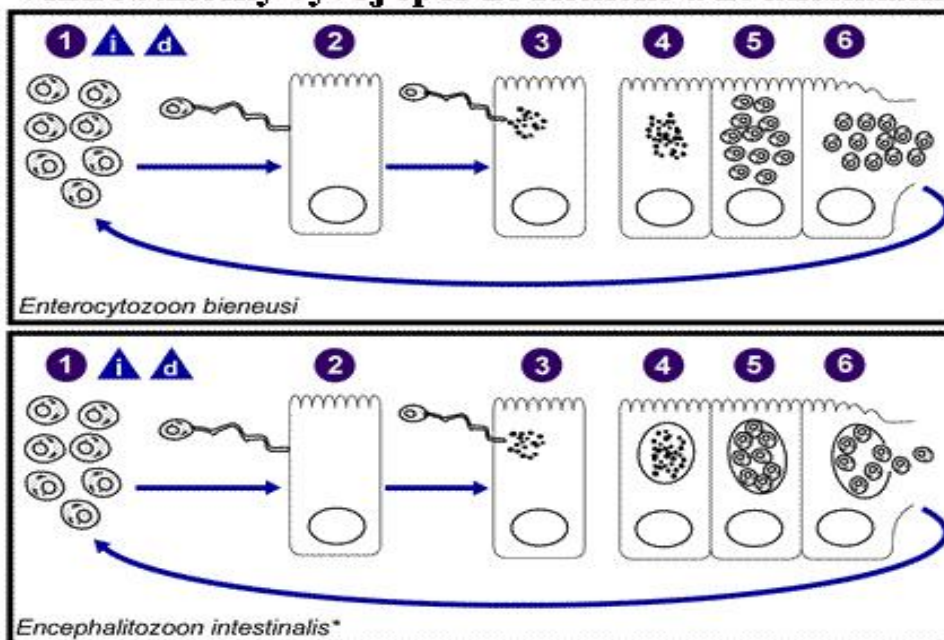
Filament napojený na hostitelskou buňku evokuje funkci potrubí, které do hostitele dopravuje infekční materiál, sporoplazmu. Mikrosporidie využívají podobného mechanismu pro únik z buněčné vakuoly fagocytů, kterými byly polapeny (Franzen 2005). Po přibližně 20 minutách se sporoplazma mění v meront, nastává rozlišení vnitřních organel (Vávra 1976).

Uvnitř buňky prochází meront extenzivní multiplikací a podstupuje merogonii, případně schizogonii, jak dokumentuje obrázek č. 9. Jakmile počet spór kompletně vyplní hostitelskou cytoplazmu, praská buněčná membrána a spóry unikají do okolí. Již volné dospělé spóry mohou infikovat nové buňky a pokračovat tak v životním cyklu (CDC 2012).

Obrázek č. 9: Životní cyklus vybraných zástupců kmene Microsporidium



### Vnitrobuněčný vývoj spór *E. bienewisi* a *E. intestinalis*



\*Vývoj uvnitř parazitoforní vakuoly probíhá také v případě *E. hellem* a *E. cuniculi*

Infekční spóra (1). Spóra infikuje hostitelskou buňku (2). Pomocí polárního filamentu je do hostitele dopravována sporoplazma (3). Vývoj může probíhat v přímém kontaktu s hostitelskou cytoplazmou (*E. bienewisi*), nebo v parazitoforní vakuole (*E. intestinalis*). V cytoplasmě, nebo v parazitoforní vakuole procházejí mikrosporidie sporogonií, vytvářejí se sporoblasty, které dozrávají v jednotlivé spóry (4). Během sporogonie se kolem spór utváří obal, který jí poskytuje ochranu před nepříznivými podmínkami (5). Zralé spóry unikají do okolí (6).

Zdroj: CDC (2012)

### 4.3 Známé mikrosporidie infekční pro člověka

Pandemie viru HIV a s ním nedílně spojené nemoci AIDS zcela změnila pohled odborníků na mikrosporidiózu. Zatímco do sedmdesátých let minulého století bylo popsáno pouze osm lidských infekcí vyvolaných mikrosporidiiemi (Weber et al. 1994), po roce 1985, tedy dva roky po objevu viru HIV, byli u osob trpících chronickým průjmem jako následkem onemocnění AIDS, identifikováni paraziti druhu *Enterocytozoon bienewisi* (Desportes et al. 1985). Následně byly popisovány stále nové rody a druhy mikrosporidií, které byly nově rozeznávány jako významné oportunistické patogeny infikující orgány v lidském těle (Orenstein 2003). O potvrzených případech imunodeficitních a imunokompetentních osob infikovaných mikrosporidiiemi do roku 2005 informuje tabulka číslo 3.

**Tabulka č. 3: Vybrané případy lidské mikrosporidiózy do roku 2005**

| Druh                                      | Hostitel | Počet imunodeficitních pacientů | Počet imunokompetentních pacientů |
|---|----------|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Enterocytozoon bienewisi</i>           | Člověk   | Více než 1000                   | Méně než 20                       |
| <i>Encephalitozoon hellem</i>             | Člověk   | Méně než 50                     | 3                                 |
| <i>Encephalitozoon intestinalis</i>       | Člověk   | Méně než 200                    | 2                                 |
| <i>Encephalitozoon cuniculi</i>           | Králík   | Méně než 20                     |                                   |
| <i>Vittaforma corneae</i>                 | Člověk   | 1                               | 3                                 |
| <i>Vittaforma</i>                         | Člověk   | 22                              | 3                                 |
| <i>Pleistophora ronneafiei</i>            | Člověk   | 1                               | 0                                 |
| <i>Trachipleistophora hominis</i>         | Člověk   | 1                               | 1                                 |
| <i>Trachipleistophora anthropophthera</i> | Člověk   | 3                               | 0                                 |
| <i>Brachiola algerae</i>                  | Moskyté  | 1                               | 1                                 |
| <i>Brachiola connori</i>                  | Člověk   | 1                               | 0                                 |
| <i>Brachiola vesicularum</i>              | Člověk   | 1                               | 0                                 |
| <i>Nosema ocularum</i>                    | Člověk   | 0                               | 1                                 |
| <i>Microsporidium ceylonensis</i>         | Člověk   | 1                               | 1                                 |
| <i>Microsporidium africanum</i>           | Člověk   | 1                               | 0                                 |

Zdroj: Mathis et al. (2005)



Nejběžnější mikrosporidiové infekce v lidském hostiteli způsobuje nejčastěji *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon intestinalis*. Oba druhy se vyskytují celosvětově, hlavně v HIV pozitivních pacientech s chronickým průjmem. Diagnostikovány jsou ale také v imunokompetentních osobách s akutním průjmem (Mathis et al. 2005).

*Encephalitozoon cuniculi* a *Encephalitozoon hellem* byli zjištěni s několika výjimkami u pacientů s oslabenou imunitou, přičemž paraziti vyvolávali lokální infekce, například očí (Weber et al. 2000), ale také multiorgánové poruchy (Sprague 1977).

Imunodeficitní pacienti jsou infikováni také dalšími vzácnějšími druhy mikrosporidií typu *Vittaforma corneae* (dříve *Nosema corneum*), *Pleistophora ronaeaei*, *Trachipleistophora* spp., *Brachiola* spp., *Trachipleistophora hominis*, *Brachiola algerae*, *Nosema ocularum*, *Microsporidium ceylonensis*, *Microsporidium africanum*, ještě vzácněji druhy rodu *Tubulinosema* (*Tubulinosema acridophagus*) (Choudhary et al. 2011).

Díky rozšířené antiretrovirální léčbě HIV pozitivních osob výrazně poklesl počet lidské mikrosporidiózy (Weber et al. 2000). Přesto se odhaduje, že dvě třetiny lidí s HIV, kteří žijí v oblasti subsaharské Afriky, kde není dostupná moderní léčba, trpí nemocemi a častými úmrtími kvůli oportunním parazitům, a tedy i mikrosporidiím. Studie prokázaly, že 13 % HIV pozitivních dospělých z Mali, kteří trpí chronickým průjmem, je pozitivních na *E. bieneusi*. Jde zároveň o nejrozšířenější typ mikrosporidie v Africe (Cisse et al. 2002). Mikrosporidiální infekce jsou v rostoucí míře případů diagnostikovány u lidí se záměrně potlačenou imunitou, kteří podstoupili orgánovou transplantaci, parazit rovněž vyvolává oční infekce u jinak zdravých osob (Goetz et al. 2001; Theng et al. 2001; Gamboa-Dominguez et al. 2003; Chan et al. 2003; Lewis et al. 2003; Carlson et al. 2004).

Mikrosporidióza bývá léčena albendazolem a fumagillinem, terapie je však náročná (Molina et al. 2002; Gross 2003). Nemoc se ale může po zahájení další imunopresivní terapie rychle vrátit (Kotková et al. 2013).

## 4.6 Zoonotické mikrosporidie v kočičích hostitelích

Kočky a lidé jsou společní hostitelé několika dosud objevených mikrosporidií. V první řadě se jedná o *Enterocytozoon bieneusi*, který bývá původcem onemocnění zažívacího ústrojí u koček (Sulaiman et al. 2003b; Jamshidi et al. 2012). Dalším z řady mikrosporidií, jejichž hostiteli mohou být jak kočky, tak lidé, je *Encephalitozoon intestinalis* (Velásquez et al. 2012). Trojici parazitů společných oběma hostitelům uzavírá *Encephalitozoon cuniculi* jako původce závažného onemocnění ledvin u kočkovitých šelem (Hsu et al. 2011).

Zdroje a cesty přenosu mikrosporidie z koček na člověka dosud nebyly jednoznačně popsány. S ohledem na dosud získanou evidenci je však pravděpodobné, že se jedná o zoonózu (Dengjel et al. 2001).

### 4.6.1 *Enterocytozoon bieneusi*

#### Infekce u člověka

*Enterocytozoon bieneusi* řazený v rámci kmene Enterocytozoonidae do rodu *Enterocytozoon* je od roku 1985 popsán jako oportunistický střevní patogen člověka v souvislosti s onemocněním HIV (Desportes et al. 1985). I když se výskyt parazita mezi HIV pozitivními osobami daří postupně díky účinné antiretrovirální léčbě snižovat (Conteas et al. 1998; Weber et al. 1999a), byla už lidská mikrosporidie vyvolaná *E. bieneusi* diagnostikována na všech obydlených kontinentech.

Dosud bylo popsáno více než 120 genotypů druhu *Enterocytozoon bieneusi* s mnoha vysoce adaptovanými genotypy, které pravděpodobně nemají příliš velký dopad na lidské zdraví, a které jsou zároveň spojeny se specifickými skupinami zvířat (Santín et al. 2006, 2010). Velká skupina genotypů *E. bieneusi* ale není striktně hostitelsky specifická a často parazituje jak ve zvířatech, tak lidech (Sulaiman et al. 2003a,b; Kašíčková et al. 2009; Ślodka-Kowalska 2009).

V České republice vyšetřoval Sak a kolektiv (2010) 386 osob na přítomnost mikrosporidií. Infikována jimi byla přibližně třetina. Vysoká promořenost mikrosporidiami

byla zaznamenána u lidí starších padesáti let. Také v následujícím výzkumu našel Sak a kolektiv (2011a,b) specifické protilátky proti *E. bieneusi* u sedmi z 15 vyšetřovaných osob.

Současně bylo zachyceno sedm různých genotypů *E. bieneusi*. Studie dokazují, že je expozice mikrosporidiím běžná i u imunokompetentních osob, u kterých není mikrosporidíóza spojena s jakoukoliv klinickou manifestací nemoci. Parazit byl popsán rovněž ve Španělsku u 17 % lidí důchodového věku, kteří trpěli průjmovým onemocněním (Lores et al. 2001). Důvodem infekce může být imunitní systém oslabený stářím. Na druhou stranu se nepotvrdilo, že by děti byly náchylnější k infekci *E. bieneusi* než zdravé dospělé osoby (van Gool et al. 1995).

Ve Švýcarsku díky moderní léčbě klesla četnost výstkytu *E. bieneusi* mezi imunodeficientními pacienty o přibližně padesát procent (Weber et al. 1999b). Podle zjištění Mathise a kolektivu z roku 2005 byl chronický průjem vyvolaný *E. bieneusi* diagnostikován u stovek HIV pozitivních pacientů. Prevalence parazita mezi HIV pozitivními osobami může dosahovat až padesáti procent, jak přibližuje tabulka č. 4.

**Tabulka č. 4: Vybrané studie, které demonstrují prevalenci *E. bieneusi* u HIV pozitivních osob**

| Stát      | Počet vyšetřených pacientů/klinické příznaky | Prevalence (%) | Autor                      |
|-----------|--|----------------|----------------------------|
| Mali      | 88/chronický průjem                          | 32,0           | Mathis et al. 2005         |
| Zimbabwe  | 88/průjem déle než týden                     | 51,0           | Gumbo et al. 1999          |
| USA       | 88/průjem déle než týden                     | 30,0           | Orenstein et al. 1990      |
|           | 68/průjem                                    | 37,0           | Coyle et al. 1996          |
| Austrálie | 139/průjem                                   | 3,5            | Ryan et al. 1993           |
| Thajsko   | 66/chronický průjem                          | 33,3           | Wanachiwanawin et al. 1998 |
| Francie   | 18/chronický průjem                          | 50,0           | Molina et al. 1993         |
| Německo   | 46/průjem                                    | 22,0           | Franzen et al. 1996        |
| Anglie    | 59/průjem                                    | 14,0           | Peacock et al. 1991        |
| Švýcarsko | 164/chronický průjem                         | 10,7           | Weber et al. 1999          |

Spóry *E. bieneusi* byly nalezeny také ve stolici sedmi z téměř sto padesáti osob s průjmovým onemocněním, kteří se z tropických oblastí vraceli do Německa (Müller et al. 2001). Ze studií provedených v minulé dekádě plyne, že parazit vyvolává asymptomatické infekce u jinak zdravých lidí, kteří žijí v tropických oblastech.

Organismus byl identifikován v jednom procentu vyšetřovaných vzorků stolice u dětí v Africe a v Asii (Bretagne et al. 1993). V Asii a Africe se *E. bienersi* nakazili kromě dětí i jejich pečovatelé (Mungthin et al. 2001).

Projevy infekce vyvolané *E. bienersi* byly popsány hlavně mezi dospělými osobami, které trpí poruchami imunity kvůli HIV/AIDS, případně u lidí, kteří užívají imunosupresivní léčbu (Goetz et al. 2001). Parazit ale vyvolává onemocnění také u HIV negativních imunokompetentních osob. Takové případy bývají v Evropě a Africe spojovány s takzvaným cestovním průjmem (Deluol et al. 1994; Sobottka et al. 1995). Byl zjištěn u pacientů, kteří prodělali orgánovou transplantaci (Gainzarain et al. 1998; Ligoury et al. 2001). Popsány byly také případy HIV pozitivních osob z Peru infikovaných *E. bienersi* (Sulaiman et al. 2003a).

### **Infekce u koček**

Genetické studie prokázaly v případě *E. bienersi* přítomnost mnoha genotypů, z nichž některé jsou hostitelsky specifické, zatímco jiné jsou schopny infikovat jak zvířata, tak člověka (Rinder et al. 2000; Buckholt et al. 2002; Sulaiman et al. 2003a,b). Celosvětová prevalence mikrosporidií u koček dosud nebyla stanovena. V současnosti je tak nutné spoléhat se na dílčí studie, která byly provedeny v několika zemích.

Kočky trpící mikrosporidiazou byly popsány například v Íránu (Momtaz et al. 2012). Momtaz a kolektiv odhalil mezi čtyřiceti kočkami tři, které byly infekční. Míru prevalence vyčíslili vědci na 7,5 % s tím, že se jen stěží jedná o ojedinělý případ. Zjištění podle Momtaze indikuje to, že jsou kočkovité šelmy důležitým zoonotickým rezervoárem lidské mikrosporidiazы.

Podobná analýza uskutečněná v Kolumbii identifikovala spóry parazita v osmi ze šestačtyřiceti vyšetřovaných zvířat. Míra prevalence byla stanovena na 17 %. Šelmy byly infikovány čtyřmi genotypy *E. bienersi*: D (9 %), K (4 %), Peru 10 (2 %) a Peru 5 (2 %) (Santín et al. 2006).

### **Další hostitelé**

Výskyt *E. bienersi* byl prokázán u domestikovaných prasat. Spóry parazita byly poprvé identifikovány ve Švýcarsku v roce 1996 (Deplazes et al. 1996a). Podle studie Breitenmosera (1999) byla ze 109 prasat nakažena více než třetina. Také Buckholt (2002), který zkoumal přítomnost *Enterocytozoonu bienersi* ve stolici prasat z oblasti severovýchodní Ameriky,

prokázal přítomnost spór v přibližně třetině odebraných vzorků z více než dvou set odchycených zvířat. Nákazy způsobené *E. bienersi* byly popsány také u psů, domestikovaných koček, králíků a kuřat. Nevyhnuly se ani dobytku, či lamám (Mathis et al. 1999; Dengjel et al. 2001; Lores et al. 2002b).

Parazit byl identifikován také u koní. U čtyř zvířat byl popsán *E. bienersi* genotyp D, který je infekční mimo jiné pro člověka (Santín et al. 2010). Experimentálně se izoláty lidských mikrosporidií podařilo z vyšších savců nakazit makaky (Tzipori et al. 1997) a prasata chovaná v prostředí se známými mikroorganismy (Kondova et al. 1998).

Mezi dosud popsané hostitele *E. bienersi* patří například zástupci čeledi papouškovitých, holubovitých a vrbcovitých (Kašičková et al. 2009). Parazit se vyskytuje jak u volně žijících, tak u domestikovaných ptáků.

Podle Kašičkové a kolektivu (2009) byla infekce *E. bienersi* zjištěna u osminy z 287 vzorků trusu, které pocházely z exotických druhů ptáků prodávaných v České republice. Přibližně 9 % ptáků bylo infikováno *E. bienersi* spolu s *E. cuniculi*, nebo *E. hellem*. Zjištění podporuje tvrzení o vysokém zoonotickém potenciálu *E. bienersi* a nízké hostitelské specifitě *E. bienersi* (Kašičková et al. 2009).

#### **4.6.2 *Encephalitozoon intestinalis***

##### **Infekce u člověka**

*Encephalitozoon intestinalis* (rod *Encephalitozoon*) je původcem průjmových onemocnění i v případě osob s neoslabeným imunitním systémem (Raynaud et al. 1998). Průnik lidské populace s tímto parazitem je nejspíše poměrně častý, neboť proti *E. intestinalis* má nejen podle van Goolovy studie z roku 1997 obranné protilátky valná část lidstva (van Gool et al. 1997; Lucy et al. 2008).

Onemocnění bylo zjištěno u HIV pozitivních pacientů na všech kontinentech kromě Antarktidy a Arktidy (Coyle et al. 1996; Boldorini et al. 1998; Leder et al. 1998; Ferreira et al. 2001).

## **Infekce u koček**

Spojitost s onemocněním kočky a jejího majitele, které vyvolal parazit *E. intestinalis*, byla poprvé v určitých obrysech nastíněna teprve před dvěma lety (Velásquez et al. 2012). Hostitelem mikrosporidie byl jak pacient trpící syndromem získaného selhání imunity, tak jeho domácí kočka. U zvířete byla přítomnost *E. intestinalis* prokázána v exkrementech pomocí metody PCR.

## **Další hostitelé**

Experimentálně nakažené myši vylučují spóry *E. intestinalis* náhodně a v nevelkém množství (Achbarou et al. 1996). Situace se podobá stavu u prasat, které byly nakaženy *E. bienewisi* (Breitenmoser et al. 1999). Podle Graczyka a kolektivu (2002) byly stejným parazitem infikovány i horské gorily a rovněž lidé, kteří se pohybovali v jejich prostředí.

Spóry *E. intestinalis* byly popsány také ve výkalech lemurů vari (*Varecia variegata rubra*), resp. kata (*Lemur catta*) (Slodkowicz-Kowalska 2009). Na přítomnost *E. intestinalis* v huse domácí upozornila studie Slodkowicz-Kowalské (2006). Stejný parazit byl identifikován také u holubů chovaných na farmě a u divokých vran (Slodkowicz-Kowalská 2009).

### **4.6.3 *Encephalitozoon cuniculi***

#### **Infekce u člověka**

*Encephalitozoon cuniculi* může u lidských hostitelů vyvolávat celou řadu závažných onemocnění. Jedná se jak o choroby nervového systému, tak o multiorgánové poruchy (Gamboa-Dominguez et al. 2003; Ditrich et al. 2011).

Přestože většina mikrosporidióz vyvolaných *E. cuniculi* byla popsána u osob s rozvinutým syndromem AIDS (Fournier et al. 2000), je znám také případ HIV negativního pacienta (Weber 2000). Protilátky proti *E. cuniculi* byly nalezeny také u imunokompetentních osob žijících v České republice (Sak et al. 2011a,b). Projevy mikrosporidiózy způsobené parazitem *E. cuniculi* však vešly ve známost už na počátku 20. století v souvislosti s neurologickými poruchami (Wright et Craighead 1922). Nicméně u člověka byly projevy choroby pravděpodobně zadokumentovány až v roce 1959 (Matsubayashi et al. 1959).

Matsubayashi se ale při identifikaci spór spoléhal pouze na jejich morfologii. Není tak možné jednoznačně potvrdit, že šlo skutečně o mikrosporidíózu způsobenou *E. cuniculi*.

Obranné protilátky proti parazitu má až 42 % osob, u kterých proběhlo některé z tropických onemocnění, případně strávili v tropech určitou dobu. Podobná prevalence protilátek byla popsána u lidí s onemocněním ledvin, psychickými a neurologickými poruchami (Hollister et al. 1987). Bergquist a kolektiv pak ve studii z roku 1984 popisují skupinu třiceti homosexuálních mužů ze Švédska, z nichž má protilátky proti *E. cuniculi* více než 30 % z nich.

Studie naznačují, že se člověk setkává s *E. cuniculi* často, ve velké většině případů však bez klinického projevu (Malčeková et al. 2010a). Parazit je rozšířený celosvětově, jak vyplývá z tabulky č. 5.

**Tabulka č. 5: Hlavní hostitelé a geografická území, na kterých byl popsán *E. cuniculi***

| Genotyp   | Hostitel       | Území   |
|---|----------------|---|
| <i>E. cuniculi</i> genotyp I<br>(rabbit genotype) | králík         | Švýcarsko, USA, Německo,<br>Itálie, Japonsko, Austrálie |
|   | člověk         | Švýcarsko, Itálie, USA                                  |
| <i>E. cuniculi</i> genotyp II<br>(mouse genotype) | myš            | Česká republika, Anglie, USA                            |
|   | krysa          | Švýcarsko   |
|   | arktická liška | Norsko, Finsko  |
| <i>E. cuniculi</i> genotyp III<br>(dog genotype)  | pes            | USA, jižní Afrika                                       |
|   | poloopice      |   |
| <i>E. cuniculi</i> genotyp IV<br>(human genotype) | člověk         | Francie   |

Zdroj: Mathis et al. (2005); Talabani et al. (2010)

O tom, že je mikrosporidíóza jen velmi obtížně léčitelná, svědčí případ rozšířené infekce, jejíž příčinou byl *E. cuniculi* genotyp IV. Infekční spory nebyly v exkrementech pacienta po transplantaci ledviny zachyceny až po více než pětíměsíční léčbě albendazolem (Talabani et al. 2010).

## **Infekce u koček**

Onemocnění ledvin patří mezi kočkovitými šelmami k jednomu z hlavních příčin úhynu. *Encephalitozoon cuniculi* může být podle současných poznatků zodpovědný právě za tuto orgánová selhání (Hsu et al. 2011).

Ve studii z roku 2011 provedené v americké Virginii bylo mezi více než dvěma sty kočkami odhaleno patnáct procent zvířat s protilátkami na *E. cuniculi*. Čtyři kočky přitom trpěly chronickou ledvinovou poruchou.

Vůbec poprvé se přitom o *E. cuniculi* v souvislosti s kočičí mikrosporidiosis zmiňuje studie z roku 1986 (Canning et Lom 1986). O necelá dvě desetiletí později byly spóry parazita objeveny také exkrementech kočkovitých šelem žijících v portugalské zoo (Lobo et al. 2003).

## **Další hostitelé**

*Encephalitozoon cuniculi* může být příčinou zánětu placenty a potratů u koní (Patterson-Kane et al. 2003). Seroepidemiologické studie odhalily protilátky proti stejnému parazitu také u koz a dobytka (Halánová et al. 1999, 2003). Použitý test ale nebyl pro *E. cuniculi* specifický.

Zatímco v laboratorních podmínkách je možné *E. cuniculi* díky vysoce hygienickému prostředí a pravidelnému screeningu vymýtit (Wasson et Peper 2000), stále zůstává v domácích chovech. Ve Švýcarsku a Anglii byly specifické protilátky proti *E. cuniculi* nalezeny skoro u čtvrtiny zdravých zvířat. V případě zvířat, která byly v přímém kontaktu s nemocnými králíky s projevujícími se symptomy nemoci, byly protilátky diagnostikovány až u 85 procent hostitelů (Deplazes et al. 1996b; Müller 1998; Harcourt-Brown et Holloway 2003). Přírodním rezervoárem *E. cuniculi* jsou pravděpodobně volně žijící divocí králíci (Wilson 1979). Zvířata se mohou infikovat požitím spór, případně jejich přijetím spolu s močí (Baneux et Pognan 2003). Vylučování spór bylo popsáno u 9 z 11 zvířat trpících projevem parazitického onemocnění vyvolaného *E. cuniculi* (Cox et Walden 1972).

V laboratorních a domácích podmínkách patří encefalitozoonóza způsobená *E. cuniculi* mezi celosvětově rozšířenou chorobu, která se vyskytuje u králíků. Chronická infekce probíhá několik let bez příznaků. Vyústit může ve vážné neurologické onemocnění bez ohledu na pohlaví a věk zvířat (Müller 1998).



*Encephalitozoon cuniculi* byl v mnoha případech diagnostikován u myši, krys, křečků a morčat (Canning et Lom 1986; Wasson et Peper 2000). Myši by zároveň mohly být rezervoáry parazita, který napadá arktické lišky a norky (Hersteinsson et al. 1993). V Norsku a Finsku byly lišky infikovány *E. cuniculi* genotyp II. Stejný genotyp se mimo jiné podařilo identifikovat také u myši pocházející z České republiky.

Parazit je schopen infikovat také psy - onemocnění způsobuje *E. cuniculi* genotyp III. Infekce byla popsána v Tanzánii, Jižní Africe a v USA (Shaddock et al. 1978; Botha et al. 1979; Canning et Lom 1986; Snowden et al. 1999). U koček bylo rozpoznáno jen několik případů encefalitozoonózy (Canning et Lom 1986, Lobo et al. 2003).

Onemocnění způsobuje velké ztráty v chovech modrých lišek (*Alopex lagopus*) na severu Evropy (Akerstedt 2002). Vyvolává jej *E. cuniculi* genotyp II. Zjištěno bylo rovněž u mnoha šelem, například u lišek, divokých psů, nebo leopardů. Jsou známy i případy, kdy nákaza propukla u opic (Wenker et al. 2002; Guscetti et al. 2003; Reetz et al. 2004).

*Encephalitozoon cuniculi* může díky nízké hostitelské specifitě infikovat širokou řadu zvířat i vyšších savců (Weber et al. 1994; Didier et al. 1998). Díky imunohistologické metodě (Reetz 1993, 1999) byl parazit nalezen v kuřatech.

V roce 2007 byl popsán u nového ptačího hostitele - australského papouška (Kašičková et al. 2007). Kašičková a kolektiv (2009) posléze diagnostikovali u exotických druhů ptáků *E. cuniculi* genotypu I (2,4 %), II (8,0 %) a III (0,7 %). *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II byl popsán také v exkrementech rarocha obecného (Malčeková et al. 2010b).

## 5 Metodika práce

### 5.1 Původ vzorků

Materiál použitý k laboratorním vyhodnocením pro účely této diplomové práce byl postupně sbírán v letech 2010 až 2013. Celkem byly shromážděny vzorky trusu sta jedinců kočky domácí z lokalit, o kterých blíže informuje tabulka č. 6. Necelá polovina těchto zvířat byla chována v domácích podmínkách, druhá žila před odchylem volně v přírodě či v městských aglomeracích. Exkrementy byly ihned po sběru uchovávány ve vzduchotěsných vzorkovnicích a transportovány do laboratoře Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky.

**Tabulka č. 6: Lokality sběru materiálu kočky domácí žijící na území České republiky**

| <b>Způsob chovu</b>  | <b>Lokalita</b> | <b>Počet jedinců / vzorků</b> | <b>Rok sběru</b> |
|----------------------|-----------------|-------------------------------|------------------|
| Divoké/polodivoké    | Brněnsko        | 65/65                         | 2010             |
| Chované v domácnosti | Benešovsko      | 23/23                         | 2013             |
| Chované v domácnosti | Ostravsko       | 12/12                         | 2013             |
| <b>Celkem</b>        |                 | <b>100/100</b>                |                  |

### 5.2 Zpracování vzorků

#### 5.2.1 Izolace DNA

Extrakce DNA ze vzorků byla uskutečněna s pomocí komerčně dodávaného kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex) podle instrukcí dodaných jeho výrobcem.

#### Postup práce

- 1) Do mikrozkušavky s 200 mg vzorků exkrementů a skleněnými kuličkami o velikosti 0,5 mm (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) byl připipetován 1 ml Lysis pufru.

- 2) Vzorky byly po dobu 60 sekund homogenizovány při rychlosti 5,5 m/s (v přístroji MP Fast Prep - 24 Instrument).
- 3) V termobloku byly mikrozkušavky inkubovány při 95 °C po dobu 10 minut. Poté byl jejich obsah centrifugován jednu minutu při 16 000 g.
- 4) Do zkumavek InviAdsorb-Tube byl vložen supernatant, vortexován dvacet sekund a dále inkubován šedesát sekund při laboratorní teplotě.
- 5) Mikrozkušavka byla centrifugována 3 minuty při 16 000 g.
- 6) Poté byl supernatant přepipetován do zcela čistých mikrozkušavek. Jejich obsah byl centrifugován 3 minuty při 16 000 g.
- 7) K 25 µl Proteinázy K, která byla napipetována do čistých zkumavek, bylo přidáno 400 µl supernatantu. Obsah zkumavek byl po dobu několika sekund homogenizován. Následně byl celý objem mikrozkušavek inkubován 10 minut při 70 °C.
- 8) K takto získanému obsahu bylo do mikrozkušavky přidáno 400 µl Binding Buffer P. Celý objem byl homogenizován.
- 9) Objem mikrozkušavky byl pipetou přenesen na kolonu Spin Filter+Tube. Směs byla následně inkubována, a to při laboratorní teplotě a následně centrifugována po dobu šedesáti sekund při 16 000 g.
- 10) Odpad, který se nacházel ve sběrné zkumavce, byl vylit. Na kolonu bylo napipetováno 500 µl roztoku Wash I. Její obsah byl centrifugován 1 minutu při 16 000 g.
- 11) Odpad, který se nacházel ve sběrné zkumavce, byl vylit. Na kolonu bylo přidáno 800 µl roztoku Wash II. Obsah byl centrifugován 1 minutu při 16 000 g.
- 12) Odpad byl potřetí odstraněn. Mikrozkušavka byla centrifugována 3 minuty při 16 000 g.
- 13) Následně byla do čisté mikrozkušavky vložena kolona, na kterou bylo napipetováno 200 µl roztoku Elution Buffer D. Obsah byl inkubován po tři minuty při laboratorní teplotě a centrifugován šedesát sekund při 8 000 g.

Vyizolovaná DNA byla uchována při - 20 °C.

### 5.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rDNA) kryptosporidií a ITS mikrosporidií byla použita metoda nested PCR.

Použité chemikálie:

- PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, ČR)
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- bovinní sérový albumin (BSA 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, ČR)
- Taq purple DNA polymeráza (Top-Bio, 1 U/μl, ČR)
- deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP's, 10 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- primery (10 μM, Generi Biotech, ČR)

Pomocí metody nested PCR (cca 830 bp, Jiang et al. 2005) byla standardně uskutečněna molekulární charakterizace kryptosporidií. Molekulární charakterizace mikrosporidií byla určena pomocí nested PCR (390 bp, Buckholt et al. 2002). Nukleotidové sekvence primerů, jejichž požadované úseky byly amplifikovány v termocykleru, jsou uvedeny níže. Objem reakčních směsí se pro primární i sekundární reakci rovnal 20 μl.

Pro primární a sekundární PCR byly podmínky reakcí nastaveny následovně: amplifikační program termocykleru obsahoval úvodní denaturaci při 94 °C po dobu 3 minut, následovalo 35 cyklů při 94 °C po dobu 45 sekund, 55 °C po dobu 45 sekund (nasedací teploty primerů pro kryptosporidie a *E. bienensi* byly v primární i sekundární PCR shodné) a 72 °C po dobu 60 sekund. V případě mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* byly podmínky reakcí v termocykleru stejné, pouze s tím rozdílem, že nasedací teploty primerů činily při primární PCR 57 °C, při sekundární 55 °C.

Na závěr reakcí byl po dobu 10 minut dosyntetizován řetězec při 72 °C. Jako pozitivní kontroly byly použity DNA *C. serpentis*, DNA *E. intestinalis* spolu s DNA *E. bienensi*.

## Sety primerů pro molekulární analýzy

### *Cryptosporidium* spp.

#### Primární PCR

- SSU F1 5' - TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG - 3'
- SSU R1 5' - CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA - 3'

#### Sekundární PCR

- SSU F2 5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG - 3'
- SSU R2 5' - AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A - 3'

### *Encephalitozoon* spp.

#### Primární PCR

- INT580F 5' - TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT - 3'
- INT580R 5' - TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG - 3'

#### Sekundární PCR

- MSP-3 5'- GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G) (C,T)TAT - 3'
- MSP-4A 5'- CCA AGC TTA TGC TTA AGT (C,T)(A,C)A A(A,G)G GGT - 3'

### *Enterocytozoon bieneusi*

#### Primární PCR

- EBITS3 5' - GGT CAT AGG GAT GAA GAG - 3'
- EBITS4 5' - TTC GAG TTC TTT CGC GCT C - 3'

#### Sekundární PCR

- EBITS1 5' - GCT CTG AAT ATC TAT GGC T - 3'
- EBITS2,4 5' - ATC GCC GAC GGA TCC AAG TG - 3'

### 5.2.3 Gelová elektroforéza

S využitím gelové elektroforézy byla zjišťována velikost DNA fragmentů. Pro tyto účely byl použit 2% agarózový gel s 0,2 µg/ml ethidium-bromidu, který zrál při 70 V po dobu asi 60 minut. Poté byl při vlnové délce 320 nm vizualizován na transluminátoru.

#### Chemikálie

- Agaróza (Biotech)
- 50× TAE pufr (242 g tris báze, 457,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA, pH=8,00)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich)
- 100 bp DNA Ladder (Biogen)

#### Pracovní postup

V mikrovlnné troubě byla ve varné baňce zahřáta agaróza smíchaná s jednocentním roztokem TAE pufru. Směs byla ochlazena pod tekoucí vodou. K roztoku byly napipetovány 2 µl ethidium bromidu. Tekutina byla opatrně nalita do nosiče, do něhož byl zároveň vložen hřeben. Po přibližně čtvrt hodině byl už ztuhlý gel umístěn do elektroforetického tanku s jednocentním TAE pufrém. Ze směsi byl vyjmut hřeben.

Do prvního takto vzniklého otvoru bylo napipetováno 5 µl ladderu. Do dalších jamek 20 µl produktu PCR. K tanku bylo přivedeno napětí 70 V. Po šedesáti minutách došlo k separaci fragmentů DNA, které byly vizualizovány na transluminátoru.

### 5.2.4 Příprava vzorků na sekvenci

Pomocí komerčně dodávaného kitu Extraction QIAquick Gel Kit (Qiagen, Germany) byla provedena extrakce DNA z gelu.

#### Pracovní postup

Při vizualizaci na transluminátoru byla z gelu pečlivě čistým skalpelem vyříznuta část DNA. K fragmentu DNA, který byl umístěn do zcela čisté mikrozkuhavky, bylo připipetováno 400 µl QG pufru. Směs byla po dobu 10 minut inkubována při 50 °C. Následně

byl veškerý objem přenesen na kolonu, kde byl centrifugován při 16 000 g po dobu 60 sekund. Ze sběrné zkumavky byl odstraněn odpad. Na kolonu bylo připipetováno 500 µl OQ pufru. Směs byla centrifugována při 16 000 g. Ze sběrné zkumavky byl opět odstraněn odpad. Na kolonu bylo přidáno 750 µl E pufru.

Takto vzniklý objem byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Mikrozkušavka byla centrifugována 60 sekund při 16 000 g. Ze sběrné zkumavky byl odstraněn odpad a výsledná směs byla centrifugována po dobu 60 sekund při 16 000 g. Kolona byla přenesena do zcela čisté mikrozkušavky o objemu 1,5 µl. Ke koloně bylo připipetováno 30 µl EB pufru. Ze směsi, která byla 60 sekund při laboratorní teplotě inkubována, byla následně extrahována DNA, a to centrifugací z kolony při 16 000 g po dobu 60 sekund.

DNA byla vysušena ve vakuovém evaporizátoru. Uchována byla při 4 °C.

### **5.2.5 Statistické zpracování výsledků**

Zjištěná data byla vyhodocena s pomocí programu Epi Info verze 7. ([wwwn.cdc.gov/epiinfo](http://wwwn.cdc.gov/epiinfo)). Ke statistické analýze by využit test StatCalc, 2 × 2 kontingenční tabulka.

### **5.2.6 Fylogenetická analýza**

Sekvence nukleotidů každého z genů získaných v této studii byla editována s použitím programu ChromasPro 1.5 (Technelysium, Pty, Ltd.) a byla zároveň porovnána s referenčními sekvencemi z databáze GenBank (Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI)) s využitím softwaru ClustalX 2.0.6. Fylogenetická analýza byla uskutečněna díky metodě Neighbor - Joining (NJ), která je postavena na Kimura-2-parametrickém testu (Kimura 1980). Získané sekvence nukleotidů 18S rRNA *Cryptosporidium* spp. a ITS *Enterocytozoon* spp. byly porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank.

## 6 Výsledky

Ze 100 vzorků, které byly vyšetřovány na kryptosporidie a mikrosporidie v rámci této práce, bylo na testované parazity pozitivních deset zvířat. Zatímco ani kryptosporidie, ani *E. bienensi* nebyly detekovány u žádné z 35 vyšetřených koček chovaných v domácnosti, 6,5% volně (toulavě) žijících koček bylo pozitivních na sledované parazity (tabulka 7). Nejčastěji identifikovaným parazitem byl *Enterocytozoon bienensi* u devíti koček a *Cryptosporidium* spp. u tří zvířat. U dvou koček byla zároveň popsána koinfekce kryptosporidie a *E. bienensi*, u všech ostatních pozitivních zvířat byl detekován pouze jeden druh výše uvedených parazitů.

Žádné z vyšetřovaných zvířat nebylo pozitivní na přítomnost parazitů rodu *Encephalitozoon*.

Sekvenační a následná fylogenetická analýza prokázala u devíti koček přítomnost specifické DNA *Enterocytozoon bienensi* genotype D, jehož genová sekvence ITS byla 100% shodná se sekvencí uloženou v GenBank (KF675191).

V rámci rodu *Cryptosporidium* byly všechny získané izoláty identifikovány jako *Cryptosporidium felis*. Všechny obdržené sekvence byly identické se sekvencí získanou z kočky a uloženou v GenBank databázi pod označením AF112575.

Z celkového počtu 100 vyšetřených zvířat byla 4 koťata, ostatní zvířata byla starší jednoho roku. Žádný ze sledovaných parazitů nebyl detekován v trusu pocházejících od koťat. Statistická analýza neprokázala vliv věku na výskyt *E. bienensi* ( $\chi^2=1,29$ ;  $p=0,88$ ) nebo *C. felis* ( $\chi^2=0,06$ ;  $p=0,68$ ).

Statistická analýza prokázala, že *E. bienensi* a *C. felis* se častěji vyskytovaly u volně žijících koček domácích ( $p=0,01$ ).



**Tabulka č. 7: Kryptosporidie a mikrosporidie identifikované u skupin kočky domácí s odlišnou mírou habituace ve vybraných lokalitách v České republice**

| Typ chovu            | Lokalita   | Počet jedinců<br>/<br>pozitivních vzorků | <i>Encephalitozoon</i> spp. | <i>Enterocytozoon<br/>bienewisi</i> | <i>Cryptosporidium felis</i> |
|----------------------|------------|--|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Volně žijící/toulavé | Brněnsko   | 65/10                                    | 0                           | 9                                   | 3                            |
| V domácnosti         | Benešovsko | 23/0                                     | 0                           | 0                                   | 0                            |
| V domácnosti         | Ostravsko  | 12/0                                     | 0                           | 0                                   | 0                            |
| <b>Celkem</b>        |            | 100/10                                   | 0                           | 9                                   | 3                            |

## 7 Diskuze

Počet imunodeficitních osob se celosvětově každý rok zvyšuje, a to nejen kvůli pandemii viru HIV. Roste také vlivem imunosupresivní léčby po transplantacích, jako následek terapie rakoviny či kvůli podvýživě (Stark et al. 2009). I z těchto důvodů je nutné uvědomit si možná zdravotní rizika spojená s chovem koček či při náhodném kontaktu s nimi. To vše s přihlédnutím k tomu, že množství popsanych případů, při nichž paraziti přecházejí ze zvířat na člověka, neustále stoupá (Mathis et al. 2005; Stark et al. 2009; Waldron et al. 2010).

Prevalence parazita *E. bienersi*, zjištěná v této studii, byla relativně nízká (9 %). Takový výsledek odpovídá poznatkům učiněným v kolumbijské Bogotě, kde bylo ze 46 vyšetřovaných koček nakaženo *E. bienersi* 17 % (Santín et al. 2006), nebo v Japonsku, kde ze sedmi zvířat z Osaky byla pozitivní pouze jedna kočka (14 %; Abe et al. 2009). Přesný genotyp nicméně určen nebyl. Na rozdíl od výsledků Santín et al. (2006) nebyl vyjma *E. bienersi* genotypu D v této studii detekován žádný jiný genotyp. Nicméně Santín et al. (2006) popisují genotyp D u koček jako dominantní.

Přítomnost *E. bienersi* genotypu D byla dosud popsána v mnoha savcích, v nedávné době například také ve skupině afrických horských goril (Sak et al. 2013) či v koních (Wagnerová et al. 2012). Genotyp D, jediný detekovaný genotyp v této studii, je široce rozšířeným a byl izolován z celé řady různých hostitelů (prase, skot, bobr, liška, ondatra, mýval, sokol, pes a makak) včetně člověka (Chalifoux et al. 2000; Buckholt et al. 2002; Sulaiman et al. 2003a,b; Santín et al. 2005; Lobo et al. 2006; Espern et al. 2007; Muller et al. 2008; Sak et al. 2008). Na základě standardní nomenklatury je genotyp D řazen do skupiny 1, tedy k izolátům s nízkou hostitelskou specifitou a zoonotickým potenciálem (Thellier et Breton 2008).

*Enterocytozoon bienersi* byl považován za parazita koček již ve studii z roku 1999 (Mathis et al. 1999). Analýza izolátu v jednom ze 12 vyšetřovaných zvířat prokázala, že bylo nakaženo *E. bienersi*, jehož genotyp byl z 96 až 98 % příbuzný izolátům získaných z člověka a prasete. Autoři už tehdy na základě těchto poznatků vyslovili předpoklad, že kočky, které jsou v blízkém kontaktu s člověkem, mohou být přenašeči pro lidi infekčních genotypů.

*Encephalitozoon* spp. jsou druhově nespecifičtí paraziti, kteří byli identifikováni u řady hostitelů, jako jsou hlodavci, zajáci, koně, masožravci a primáti včetně člověka (Hollister

et Canning 1987; Reetz 1993; Kašičková et al. 2009). Žádný z druhů rodu *Encephalitozoon* nebyl u koček v rámci této studie identifikován, a to na rozdíl od jiných prací, v nichž je u těchto zvířat považován za patogen vedoucí k selhání ledvin (*E. cuniculi*, Hsu et al. 2011), nebo za příčinu keratokonjunktivitidy (Benz et al. 2011).

Obecně lze konstatovat, že kočky pravděpodobně nejsou častými hostiteli těchto parazitů, což potvrzuje i dosud jediný popsáný případ přenosu *E. intestinalis* z kočky na člověka (Velásquez et al. 2012).

*Cryptosporidium felis*, který byl v této studii identifikován u tří ze sta vyšetřovaných zvířat (prevalence činila 3 %), může vyvolat závažná onemocnění osob s oslabeným imunitním systémem. Výskyt *C. felis* mezi kočkami zjištěný v této studii vykazuje podobnou míru prevalence, jako byla popsána ve studii z roku 2009 (Ballweber et al. 2009). Autoři analýzy zvířecích vzorků z Mississippi a Alabamy (USA) identifikovali *C. felis* ve dvanácti z 250 odebraných vzorků u koček žijících ve společné domácnosti s lidmi (prevalence činila 4,8 %).

Na rozdíl od studie z USA nebyly kryptosporidie v naší práci nalezeny ve skupině koček žijících v domácnosti. Důvodem odlišných výsledků popsáných v České republice může být například přístup ke kvalitnější vodě s přihlédnutím k tomu, že voda kontaminovaná oocystami kryptosporidií může být zdrojem infekce (Van den Akker et al. 2011).

Námi zjištěná prevalence kryptosporidií odpovídá výsledkům získaných v dalších zemích (Argentině, Německu, Velké Británii a USA), kde se pohybuje v rozmezí od 2,2 do 5,9 %) (Hill et al. 2000; Fonatarrosa et al. 2006; Smith et al. 2009; Sotiriadou et al. 2013). Vyšší míra prevalence kryptosporidií u koček byla popsána například v Nizozemí (8,6 %), v Kanadě (7,1 %), v Japonsku (12,7 %) nebo v Koreji (9,7 %) (Kim et al. 1998; Shukla et al. 2006; Overgaauw et al. 2009; Yoshiuchi et al. 2010). Vyjma dvou studií, v Japonsku (8,6 %) a v USA (4,8 %), nebyly kryptosporidie detekované u koček genotypizovány (Ballweber et al. 2009; Yoshiuchi et al. 2010).

Na rozdíl od *E. bienersi*, detekovaného v této studii, je *C. felis* identifikováno u lidí velmi zřídka (Pedraza-Diaz et al. 2001; Caccio et al. 2002; Caccio 2005; Leoni et al. 2006). Přenos *C. felis* z kočky na člověka například nevylučuje Morgan et al. (2000). Práce autorů navazuje na případ chovatele koček, který stejně jako jeho kočka vykazoval příznaky

onemocnění vyvolaného kryptosporidiiemi (Bennett et al. 1985). Z dílčích studií ale vyplývá, že se mezi osobami s oslabeným imunitním systémem jedinci infikovaní *C. felis* vyskytují.

Například v Jakartě byly mezi šestatřiceti HIV pozitivními pacienty identifikovány dvě osoby, které byly nakaženy několika druhy kryptosporidií zároveň včetně *C. felis* (Kurniawan et al. 2013). Také ve studii provedené v Etiopii bylo *C. felis* popsáno u pěti z 520 HIV pozitivních osob (Adamu et al. 2014).

## 8 Závěry

- 1) Kočky představují potenciální zdroj spór *E. bienersi* a oocyst *C. felis* infekčních pro člověka.
- 2) Kočky chované v domácnosti s omezením volného pohybu mimo ni nejsou vystaveny riziku infekce *E. bienersi* a *C. felis* z prostředí.
- 3) Osoby s oslabeným imunitním systémem by se měly vyvarovat blízkého kontaktu s volně žijícími/toulavými kočkami, případně důsledně dodržovat přísné hygienické návyky k omezení možnosti nákazy některým ze sledovaných parazitů.

## 9 Použité zdroje

- Adamu H., Petros B., Zhang G., Kassa H., Amer S., Ye J., Feng Y., Xiao L. (2014). Distribution and Clinical Manifestations of *Cryptosporidium* Species and Subtypes in HIV/AIDS Patients in Ethiopia. PLoS Negl Trop Dis. 17;8:e2831.
- Achbarou A., Ombrouck C., Gneragbe T., Charlotte F., Rénia L., Desportes-Livage I., Mazier D. (1996). Experimental model for human intestinal microsporidiosis in interferon gamma receptor knockout mice infected by *Encephalitozoon intestinalis*. Parasite Immunol. 18:387-392.
- Akersted J. (2002). An indirect ELISA for detection of *Encephalitozoon cuniculi* infection in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*). Acta. Vet. Scand. 43:211-220.
- Alabani H., Sarfati C., Pillebout E., van Gool T., Derouin F., Menotti J. (2010). Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. J. Clin. Microbiol. 48:2651-2653.
- Alves M., Matos O., Pereira da Fonseca I., Delagado E., Lourenco A. M., Antunes F. (2001). Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human HIV-infected and animal hosts. J. Eukaryot. Microbiol. Suppl:17S-18S.
- Arai H., Fukuda Y., Hara T., Funakoshi Y., Kaneko S., Yoshida T., Asahi H., Kumada M., Kato K., Koyama T. (1990). Prevalence of *Cryptosporidium* infection among domestic cats in the Tokyo metropolitan district. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 43:7-14.
- Asahi H., Koyama T., Arai H., Funakoshi Y., Yamaura H., Shirasaka R., Okutomi K. (1991). Biological nature of *Cryptosporidium* sp. isolated from a cat. Parasitol Res. 77:237-240.
- Ballweber L. R., Panuska C., Huston C. L., Vasilopoulos R., Pharr G. T., Mackin A. (2009). Prevalence of and risk factors associated with shedding of *Cryptosporidium felis* in domestic cats of Mississippi and Alabama. Vet- Parasitol. 160:306-310.
- Baneux P. J., Pognan F. (2003). In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. Lab. Anim. 37:132-138.
- Barr S. C., Jamrosz G. F., Hornbuckle W. E., Bowmann D. D., Fayer R. (1994). Use of paromomycin for treatment of cryptosporidiosis in a cat. J. Am. Vet. Med. Assoc. 205:1742-1743.
- Barta J. R., Thompson R. C. (2006). What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. Trends Parasitol. 22:463-468.
- Bennett M., Baxby D., Blundell N., Gaskell C. J., Hart C. A., Kelly D. F. (1985). Cryptosporidiosis in the domestic cat. Vet. Rec. 116:73-74.

- Bergquist R, Morfeldt-Månsson L, Pehrson PO, Petrini B, Wasserman J. (1984). Antibody against *Encephalitozoon cuniculi* in Swedish homosexual men. *Scand. J. Infect. Dis.* 16:389-391
- Blagburn B. L., Current W. L. (1983). Accidental infection of a researcher with human *Cryptosporidium*. *J. Infect. Dis.* 148:772-773.
- Blagburn B., Lindsay D. S., Giambrone J. J., Sundermann C. A., Hoerr F. J. (1987). Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 66:442-449.
- Boldorini R., Monga G., Tosoni A., Didier E. S., Nebuloni M., Costanzi G., Mazzucco G., Orenstein J. M. (1998). Renal *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in a patient with AIDS. Post-mortem identification by means of transmission electron microscopy and PCR. *Virchows. Arch.* 432:535-539.
- Bornay-Llinares F. J., da Silva A. J., Moura I. N., Myjak P., Pietkiewicz H., Kruminis-Lozowska W., Graczyk T. K., Pieniazek N. J. (1999). Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1455-1458.
- Botha W. S., van Dellen A. F., Stewart C. G. (1979). Canine encephalitozoonosis in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 50:135-144.
- 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. *Parasitol.* 118:447-453.
- Bretagne S., Foulet F., Alkassoum W., Fleury-Feith J., Develoux M. (1993). Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* spores in the stool of AIDS patients and african children not infected by HIV. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 86:351-357.
- Buckholt M. A., Leem J. H., Tzipori S. (2002). Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: An 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Applied. Environ. Microbiol.* 68:2595-2599.
- Buret A. G., Chin A. C., Scott K. G. (2003). Infection of human and bovine epithelial cells with *Cryptosporidium andersoni* induces apoptosis and disrupts tight junctional ZO-1: effects of epidermal growth factor. *Int. J. Parasitol.* 33:1363-1371.
- Cacciò S. M. (2005). Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitol.* 47:185-192.
- Cacciò S., Pinter E., Fantini R., Mezzaroma I., Pozio E. (2002). Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. *Emerg. Infect. Dis.* 8:85-86.
- Cama V. A., Bern C., Roberts J., Cabrera L., Sterling C. R., Ortega Y., Gilman R. H., Xiao L. (2008). *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1567-1574.

- Canning E. U., Lom J. (1986). The microsporidia of vertebrates. Academic Press, London, United Kingdom. 289p.
- Carlson J. R., Li L., Helton C. L., Munn R. J., Wasson K., Perez R. V., Gallay B. J., Finkbeiner W. E. (2004). Disseminated microsporidiosis in a pancreas/kidney transplant recipient. Arch. Pathol. Lab. Med. 128:41-43.
- Casemore D. P. (1993). Is human cryptosporidiosis a zoonotic disease? Lancet. 342:312.
- Cavalier-Smith T. (2002). The Phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of protozoa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:297-354.
- CDC (2012). Dostupné z: <http://www.cdc.gov>, staženo dne 16. ledna 2014.
- Centers for Disease Control and Prevention (2005). Cryptosporidiosis Surveillance, US1999 - 2002. Morb. and Mort. Weekly Rep. 54:1.
- Centers for Disease Control and Prevention (2006). Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational Water, United States, 2003-2004. 55:1-30.
- Cirak V. Y., Bauer C. (2004). Comparison of conventional coproscopical methods and commercially coproantigen elisa kits for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dogs and cats. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 117:410-413.
- Cisse A. O., Ouattara A., Thellier M., Accoceberry I., Biligui S., Minta D., Doumbo O., Desportes-Livage I., Thera M. A., Danis M., Datry A. (2002). Evaluation of an immunofluorescent-antibody test using monoclonal antibodies directed against *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali). J. Clin. Microbiol. 40:1715-1718.
- Conteas C. N., Berlin O. G., Lariviere M. J., Pandhumass S. S., Speck C. E., Porschen R., Nakaya T. (1998). Examination of the prevalence and seasonal variations of intestinal microsporidiosis in the stools of persons with chronic diarrhea and human immunodeficiency virus infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58:559-556.
- Corradi N., Keeling P. J. (2009). Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. Fung. Biol. Rev. 23:1-8.
- Cox J. C., Walden N. B. (1972). Presumptive diagnosis of *Nosema cuniculi* in rabbits by immunofluorescence. Res. Vet. Sci. 13:595-597.
- Coyle C. M., Wittner M., Kotler D. P., Noyer C., Orenstein J. M., Tanowitz H. B., Weiss L. M. (1996). Prevalence of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* among patients with AIDS-related diarrhea: determination by polymerase chain reaction to the microsporidian small-subunit rRNA gene. Clin. Infect. Dis. 23:1002-1006.
- Crawford F., Vermund S. H. (1988). Human cryptosporidiosis. Crit. Rev. Microbiol. 16:113-159.



- Current W., Garcia L. S. (1991). Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:325-358.
- Current W., Reese N. C. (1986). A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J. Protozool.* 33:98-108.
- Current W., Reese N. C., Ernst J. V., Bailey W. S., Heyman M. B., Weinstein W. M. (1983). Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N. Engl. J. Med.* 308:1252-1257.
- Deluol A. M., Poirot J. L., Heyer F., Roux P., Levy D., Rozenbaum W. (1994). Intestinal microsporidiosis: about clinical characteristics and laboratory diagnosis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41:33s.
- Dengjel B., Zahler M., Hermanns W., Heinritzi K., Spilimann 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., Müller C., Weber R. (1996b). Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43:93s.
- 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-Priollet B., Lavergne A., Ravisse P., Modigliani R. (1985). Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n. g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool.* 32:250-254.
- Didier E. S., Snowden K. F., Shaddock J. A. (1998). Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv. Parasitol.* 40:283-320.
- Didier E. S., Weiss L. M. (2008). Overview of microsporidia and microsporidiosis. *Protist.* 5:243-255.
- Dillingham R. A., Lima A. A., Guerrant R. L. (2002). Cryptosporidiosis: Epidemiology and impact. *Microb. and Infect.* 4:1059-1066.
- Ditrich O., Chrdle A., Sak B., Chmelík V., Kubále J., Dyková I., Kváč M. (2011). *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* 49:2769-2771.
- Ditrich O., Palkovič L., Štěřba J., Prokopič J., Loudová J., Giboda M. (1991). The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. *Parasitol. Res.* 77:44-47.

- DuPont H., Chappell C. L., Sterling C. R., Okhuysen P. C., Rose J. B., Jakubowski W. (1995). The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 332:855-859.
- 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 bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 45:2999-3002.
- Fayer R. (2007). General biology. In Fayer R., Xiao L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Second edition, CRC Press. 576p.
- Fayer R., Leek R. G. (1984). The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. *J. Protozool.* 31:567-569.
- Fayer R., Santín M., Macarisin D. (2010). *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet Parasitol.* 27:23-32.
- Fayer R., Ungar B. L. (1986). *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50:458-483.
- Feltus D. C., Giddings C. W., Schneck B. L., Monson T., Warshauer D., McEvoy J. M. (2006). Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *J Clin. Microbiol.* 44:4303-4308.
- Ferreira F. M., Bezerra L., Santos M. B, Bernardes R. M., Avelino I., Silva M. L. (2001). Intestinal microsporidiosis: a current infection in HIV-seropositive patients in Portugal. *Microb. Infect.* 3:1015-1019.
- Fleta J., Sanchez-Acedo C., Clavel A., Quilez J. (1995). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extraintestinal tissues of sheep and pigs. *Vet. Parasitol.* 59:201-205.
- Fontanarrosa M. F., Vezzani D., Basabe J., Eiras D. F. (2006). An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. *Vet. Parasitol.* 136:283-295.
- Forgacs P., Tarshis A., Ma P., Federman M., Mele L., Silverman M. L., Shea J. A. (1983). Intestinal and bronchial cryptosporidiosis in an immunodeficient homosexual man. *Ann. Intern. Med.* 99:793-794.
- Fournier S., Liguory O., Sarfati C., David-Ouaknine F., Derouin F., Decazes J. M., Molina J. M. (2000). Disseminated infection due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: case report and review. *HIV Med.* 1:155-161.
- Franzen (2005). How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol.* 52:36-40.

- Franzen C., Müller A., Hegener P., Hartmann P., Salzberger B., Franzen B., Diehl V., Fätkenheuer G. (1996). Polymerase chain reaction for microsporidian DNA in gastrointestinal biopsy specimens of HIV-infected patients. *AIDS*. 10:23-27.
- Gainzarain C., Canut A., Lozano M., Labora A., Carreras F., Fenoy S., Navajas R., Pieniazek N. J., da Silva A. J., del Aguila C. (1998). Detection of *Enterocytozoon bieneusi* in two human immunodeficiency virus-negative patients with chronic diarrhea by polymerase chain reaction in duodenal biopsy specimens and review. *Clin. Infect. Dis.* 27:394-398.
- Gallas-Lindemann C., Sotiriadou I., Plutzer J., Karanis P. (2013). Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. *Epidemiol. Infect.* 141:9-21.
- Gamboa-Dominguez A., de Anda J., Donis J., Ruiz-Maza F., Visvevara G. S., Diliz H. (2003). Disseminated encephalitozoon *cuniculi* infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Transplant.* 75:1898-1900.
- Gatei W., Ashford R. W., Beeching N. J., Kamwati S. K., Greensill J., Hart C. A. (2002). *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. *Emerg Infect Dis.* 8:204-206.
- Gatei W., Suputtamongkol Y., Waywa D., Ashford D. W., Bailey J. W., Greensill J., Beeching N. J., Hart C. A. (2002b). Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96:797-802.
- Gatei W., Wamae C. N., Mbae C., Waruru A., Mulinge E., Waithera T., Gatika S. M., Kamwati S. K., Revathi G., Hart C. A. (2006). Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:78-82.
- Göbel E., Brändler U. (1982). Ultrastructure of microgametogenesis, microgametes and gametogony of *Cryptosporidium* sp. in the small intestine of mice. *Protistolog.* 18:331-344.
- Goetz M., Eichenlaub S., Pape G. R., Hoffmann R. M. (2001). Chronic diarrhea as a result of intestinal microsporidiosis in a liver transplant recipient. *Trans.* 71:334-337.
- Gomes R. S., Huber F., da Silva S., Bergamo do Bomfim T. C. (2012). *Cryptosporidium* spp. parasitize exotic birds that are commercialized in markets, commercial aviaries and pet shops. *Parasitol. Res.* 110:1363-1370.
- Goodwin M. A., Barsanti J. A. (1990). Intractable diarrhea associated with intestinal *cryptosporidiosis* in a domestic cat also infected with feline leukemia virus. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 26:335-337.
- Graczyk T. K., Bosco-Nizeyi J., da Silva A. J., Moura I. N., Pieniazek N. J., Cranfield M. R., Lindquist H. D. (2002). A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. *Parasitol. Res.* 88:926-931.
- Gross U. (2003). Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitol Res.* 90:14-18.

- Gumbo T., Sarbah S., Gangaidzo I. T., Ortega Y., Sterling C. R., Carville A., Tzipori S., Wiest P. M. (1999). Intestinal parasites in patients with diarrhea and human immunodeficiency virus infection in Zimbabwe. *AIDS* 13:819-821.
- Guo Y., Alderisio K. A., Yang W., Cama V., Feng Y., Xiao L (2014). Host specificity and source of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in a drinking source watershed. *Appl Environ Microbiol.* 80:218-225.
- Guscetti F., Mathis A., Hatt J. M., Deplazes P. (2003). Overt fatal and chronic subclinical *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis in a colony of captive emperor tamarins (*Saguinus imperator*). *J. Med. Primatol.* 32:111-119.
- Guyot K., Follet-Dumoulin A., Lelievre E., Sarfati C., Rabodonirina M., Nevez G., Cailliez J. C., Camus D., Dei-Cas E. (2001) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.* 39:3472-3480.
- 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.
- Halánová M., Cisláková L., Valenčáková A., Bálent P., Adam J., Trávníček M. (2003). Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10:117-120.
- Halánová M., Letková V., Macák V., Stefkovic M., Halán M. (1999). The first finding of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cows in Slovakia. *Vet. Parasitol.* 82:167-171.
- Harcourt-Brown F. M., Holloway H. K. (2003). *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Vet. Rec.* 152:427-431.
- Hashimoto K., Sasaki Y., Takinami K. (1976). Conditions for extrusion of the polar filament of the spore of *Pleistophora anguillarum*, a microsporidian parasite in *Anguilla japonica*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 42:837-845.
- Hersteinsson P., Gunnarsson E., Hjartartardóttir S., Skírnisson K. (1993). Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in terrestrial mammals in Iceland, 1986 to 1989. *Wild. J. Dis.* 29:341-344.
- Hill S. L., Cheney J. M., Taton-Allen G. F., Reif J. S., Bruns C., Lappin M. R. (2000). Prevalence of enteric zoonotic organisms in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 216:687-692.
- Hofmannová L., Bertolino S., Wauters L., Tosi G., Modrý D. (2008). Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitol.* 55:95-99.
- Hollister W. S., Canning E. U. (1987). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infections in man. *Parasitol.* 94:209-219.

- Hsu V., Grant D. C., Zajac A. M., Witonsky S. G., Lindsay D. S. (2011). Prevalence of IgG antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in cats with and without chronic kidney disease from Virginia. *Vet Parasitol.* 176:23-26.
- Hunter P. R., Nichols G. (2002). Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 15:145-154.
- Chalifoux L. V., Carville A., Pauley D., Thompson B., Lackner A. A., Mansfield K. G. (2000). *Enterocytozoon bieneusi* as a cause of proliferative serositis in simian immunodeficiency virus-infected immunodeficient macaques (*Macaca mulatta*). *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124:1480-1484.
- Chan C. M., Theng J. T., Li L., Tan D. T. (2003). Microsporidial keratoconjunctivitis in healthy individuals: a case series. *Ophthalmol.* 110:1420-1425.
- Charles K., Roser D., Ashbolt N., Deere D., Mc Guinness R. (2003). Buffer distances for on-site sewage systems in Sydney's drinking water catchments. *Water Sci. Technol.* 47:183-189.
- Choudhary M. M., Metcalfe M. G., Arrambide K., Bern C., Visvevara G. S., Pieniazek N. J., Bandea R. D., Deleon-Carnes M., Adem P., Zaki S. R., Saeed M. U. (2011). *Tubulinosema* sp. microsporidian myositis in immunosuppressed patient. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1727-1730.
- Jamshidi S. h., Tabrizi A. S., Bahrami M., Momtaz H. (2011). Microsporidia in household dogs and cats in Iran; a zoonotic concern. *Vet Parasitol.* 185:121-123.
- Jiang J., Alderisio A. K., Xiao L. (2005). Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl Environ Microbiol.* 71:4446-4454.
- Jokipii L., Jokipii A. M. (1986). Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 315:1643-1647.
- Jokipii L., Pohjola S., Jokipii A. M. (1983). *Cryptosporidium*: a frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet.* 2:358-361.
- Karanis P., Kourenti C., Smith H. (2007). Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Health* 5:1-38.
- Kašičková D., Sak B., Kváč M., Ditrich O. (2007). Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host-cockateel (*Nymphicus hollandicus*) using molecular methods. *Parasitol. Res.* 101:1685-1688.
- Kašičková D., Sak B., Kváč M., Ditrich O. (2009). Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Vet. Parasitol.* 165:125-130.
- Katsumata T., Hosea D., Ranuh I. G., Uga S., Yanagi T., Kohno S. (2000). Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62:70-72.

- Keeling P. (2009). Five Questions about Microsporidia. *PLoS Pathog.* 5:1000489.
- Keeling P. J., Fast N. M. (2002). Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Ann. Rev. Microbiol.* 56:93-116.
- Kicia M., Wesolowska M., Jakuszko K., Kopacz Z., Sak B., Květonova D., Krajewska M., Kvač M. (2014). Concurrent Infection of the Urinary Tract with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in a Renal Transplant Recipient. *J. Clin. Microbiol.* 52:1780-1782.
- Kim J. T., Wee S. H., Lee C. G. (1998). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in canine fecal samples by immunofluorescence assay. *Kor. J. Parasitol.* 36:147-149.
- Kondova I., Maansfield M., 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.
- Kotkova M., Sak B., Kvetonova D., Kvac M. (2013). Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. *PLoS One.* 8:e60941.
- Kurniawan A., Dwintarsi S. W., Connelly L., Nichols R. A., Yunihastuti E., Karyadi T., Djauzi S. (2013). *Cryptosporidium* species from human immunodeficiency-infected patients with chronic diarrhea in Jakarta, Indonesia. *Ann Epidemiol.* 23:720-723.
- Kváč M., Kestřánová M., Květoňová D., Kotková M., Ortega Y., McEvoy J., Sak B. (2012). *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Exp. Parasitol.* 131:107-110.
- Kváč M., Květoňová D., Ditrich O. (2009) *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. *Emerg Infect Dis.* 15:982-983.
- Kváč M., Ortega Y. R. (2013). Foodborne protozoa. In: Labbé R. G. and García S. (Eds.): *Guide to Foodborne Pathogens, Second Edition.* John Wiley&Sons, Ltd. Chapter 19, 330-316.
- Lappin M. R., Dowers K., Edsell D., Taton-Allen G., Cheney J. (1997). Cryptosporidiosis and inflammatory bowel disease. *Feline Pract.* 25:10-13.
- Leder K., Ryan N., Spelman D., Crowe S. M. (1998). Microsporidial disease in HIV-infected patients: a report of 42 patients and review of the literature. *Scand. J. Infect. Dis.* 30:331-338.
- Lee S. C., Corradi N., Doan S., Dietrich F. S., Keeling P. J., Hettman J. (2010). Evolution of the sex-Related Locus and Genomic Features Shared in Microsporidia and Fungi. *PLoS One.* 5:e10539.
- Lee S. C., Weiss L. M., Heitman N. J. (2009). Generation of genetic diversity in microsporidia via sexual reproduction and horizontal gene transfer. *Commun. Integr. Biol.* 2:414-417.

- Leoni F., Gallimore C., Green J., McLauchlin J. (2006). Characterisation of small double stranded RNA molecule in *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Parasitol. Int.* 55:299-306.
- Lewis N. L., Francis I. C., Hawkins G. S., Coroneo M. T. (2003). Bilateral microsporidial keratoconjunctivitis in an immunocompetent non-contact lens wearer. *Corn.* 22:374-376.
- Li N., Xiao L., Alderisio K., Elwin K., Cebelinski E., Chalmers R., Santin M., Fayer R., Kvac M., Ryan U., Sak B., Stanko M., Guo Y., Wang L., Zhang L., Cai J., Roellig D., Feng Y., Sak B. (2014). Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a Zoonotic Pathogen Emerging in Humans. *Emerg. Inf. Dis.* 20:217-224.
- Li W., Diao R., Yang J., Xiao L., Lu Y., Li Y., Song M. (2014). High diversity of human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in swine in northeast China. *Parasitol. Res.* 113:1147-1153.
- Liguory O., Sarfati C., Derouin F., Molina J. M. (2001). Evidence of different *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 39:2672-2674.
- Lobo M. L., Teles A., Da Cunha M. B., Henriques J., Lourenco A. m., Antunes F., Matos O. (2003). Microsporidia detection in stools from pets and animals from the zoo in Portugal: a preliminary study. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50:581-582.
- Lobo M. L., Xiao L., Cama V., Magalhaes N., Antunes F., Matos O. (2006). Identification of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in various birds. *Appl. Env. Microbiol.* 11:7380-7382.
- Lores B., Arias C., Lopez-Miragaya I., Torres J., Fenoy S., del Aguila C. (2001). Molecular diagnosis of intestinal microsporidiosis in pediatric patients from Vigo (NW, Spain). *Res. Rev. Parasitol.* 61:43-49.
- Lores B., del Aquilla C., Aries C. (2002b). *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia), in faecal samles from domestic animals from Galicia, Spain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97:941-945.
- Lucy E. F., Graczyk T. K., Tamang L., Miraflor A., Minchin D. (2008). Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitol. Res.* 103:1369-1375.
- Ma P., Soave R. (1983). Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J. Infect. Dis.* 147:824-828.
- Malčeková B., Halánová M., Sulínová Z., Molnára L., Ravaszová P., Adamec J., Halána M., Valocký I., Baranovič M. (2010a). Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon intestinalis* in humans and animals. *Res. Vet. Sci.* 89:358-361.

- Malčecová B., Valenčáková A., Luptáková L., Molnar L., Ravaszová P., Novotný F. (2010b). First detection and genotyping of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host species, gyrfalcon (*Falco rusticolus*) Parasitol. Res. 108:1479-1482.
- Mathis A., Breitenmoser A. C., Deplazes P. (1999). Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and cat. Paras. 6:189-193.
- Mathis A., Tanner I., Weber R., Deplazes P. (1999). Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. Int. J. Parasitol. 29:767-770.
- Mathis A., Weber R., Deplazes P. (2005). Zoonotic Potential of the Microsporidia. Clin Microbiol Rev. 18:423-445.
- Matos O., Alves M., Xiao L., Cama V., Antunes F. (2004). *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with hiv, Portugal. Emerg. Infect. Dis. 10:2256-2257.
- 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.
- McReynolds C. A., Lappin M. R., Ungar B., McReynolds L. M., Brunsc C., Spilkera M. M., Thrallb M. A., Reifc J. S. (1999). Regional seroprevalence of *Cryptosporidium parvum*-specific IgG antibodies of cats in the United States. Vet. Parasitol. 80:187-195.
- Meinhardt P. L., Casemore D. P., Miller K. B. (1996). Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. Epidemiol. Rev. 18:118-136.
- Meisel J., Perera D. R., Meligro C., Rubin C. E. (1976). Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroenter. 70:1156-1160.
- Metge S., van Nhieu J. T., Dahmane D., Grimbert P., Foulet F., Sarfati C., Bretagne S. (2000). A case of *Enterocytozoon bienersi* infection in an HIV-negative renal transplant recipient. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19:221-223.
- Molina J. M., Sarfati C., Beaivais B., Lémann M., Lesourd A., Ferchal F., Casin I., Lagrange P., Modigliani R., Derouin F. (1993). Intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic unexplained diarrhea: prevalence and clinical and biologic features. J. Infect. Dis. 167:217-221.
- Monticello T. M., Levy M. G., Bunch S. E., Fairley R. A. (1987). Cryptosporidiosis in a feline leukemia virus-positive cat. J. Am. Vet. Med. Assoc. 191:705-706.
- Morgan U. M., Buddle J. R., Armson A., Elliot A., Thompson R. C. (1999). Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs. Aust. Vet. J. 77:44-47.
- Morgan U. M., Deplazes P., Forbes D. A., Spano F., Hertzberg H., Sargent K. D., Elliot A., Thompson R. C. (1999). Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. Parasitol. 118:49-58.



- 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. *Parasitol.* 117:31-37.
- Morgan U., Weber R., Xiao L., Sulaiman I., Thompson R. C., Ndiritu W., Lai A., Moore A., Deplazes P. (2000). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J. Clin. Microbiol.* 38:1180-1183.
- Mota P., Rauch C. A., Edberg S. C. (2000). Microsporidia and Cyclospora: epidemiology and assessment of risk from the environment. *Crit. Rev. Microbiol.* 26:69-90.
- Mtambo M. M. A., Nash A. S., Blewett D. A., Smith H. V., Wright S. (1991). *Cryptosporidium* infection in cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. *Vet. Rec.* 129:502-504.
- Müller A., Bialek R., Kämper A., Fätkenheuer G., Salzberger B., Franzen C. (2001). Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 39:1630-1632.
- Müller C. (1998). Untersuchungen zur Diagnostik, Biologie und Verbreitung von Microsporidien bei Kaninchen und anderen Tierarten. University of Zürich, Zürich, Switzerland, 110p.
- Müller M. G., Kinne J., Schuster R. K., Walochnik J. (2008). Outbreak of microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bieneusi* in falcons. *Vet. Parasitol.* 152:67-78.
- Mungthin M., Suwannasaeng R., Naaglor T., Areekul W., Leelayoova S. (2001). Asymptomatic intestinal microsporidiosis in Thai orphans and child-care workers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95:304-306.
- Nägeli K. W. (1857). Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot. Z.* 15:760-761.
- Nime F., Burek J. D., Page D. L., Holscher M. A., Yardley J. H. (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenter.* 70:592-598.
- O'Donoghue P. (1995). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25:139-195.
- O'Hara S. P., Chen X. M. (2011). The cell biology of *cryptosporidium* infection. *Microb. Infect.* 13:721-730.
- Okhuysen P. C., Chappell C. L. (2002). *Cryptosporidium* virulence determinants - are we there yet? *Int. J. Parasitol.* 32:517-525.
- Okhuysen P. C., Chappell C. L., Crabb J. H., Sterling C. R., DuPont H. L. (1999). Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.* 180:1275-1281.

- Orenstein J. M. (2003). Diagnostic pathology of microsporidiosis. *Ultrastruct. Pathol.* 27:141-149.
- 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.
- Overgaauw P. A., van Zutphen L., Hoek D., Yaya F. O., Roelfsema J., Pinelli E., van Knapen F., Kortbeek L. M. (2009). Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Vet. Parasitol.* 163:115-122.
- Palmer C. J., Xiao L., Terashima A., Guerra H., Gotuzzo E., Saldías G., Bonilla J. A., Zhou L., Lindquist A., Upton S. J. (2003). *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Perú. *Emerg. Infect. Dis.* 9:1174-1176.
- Panciera R. J., Thomassen R. W., Garner F. M. (1971). Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8:479-484.
- Patterson-Kane J. C., Caplazi P., Rurangirwa F., Tramontin R. R., Wolfsdorf K. (2003). *Encephalitozoon cuniculi* placentitis and abortion in a quarterhorse mare. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:57-59.
- Pavlassek I., Ryan U. (2007). The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Vet. Parasitol.* 144:349-352.
- Peacock C. S., Blanshard C., Tovey D. G., Ellis D. S., Gazzard B. G. (1991). Histological diagnosis of intestinal microsporidiosis in patients with AIDS. *J. Clin. Pathol.* 44:558-563.
- Pedraza-Díaz S., Amar C., Iversen A. M., Stanley P. J., Mc Lauchlin J. (2001). Unusual *cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. *J. Med. Microbiol.* 50:293-296.
- Putignani L., Menchella D. (2010). Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 753512.
- Rašková V., Květoňová D., Sak B., McEvoyc J., Edwinsonc A., Stengerc B., Kváč M. (2013). Human Cryptosporidiosis Caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* Isolates Presumably Transmitted from Wild Mice, *J. Clin. Microbiol.* 51:360-362.
- Raynaud L., Delbac F., Broussolle V., Rabodonirina M., Girault V., Wallon M., Cozon G., Vivares C. P., Peyron F. (1998). Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* 36:37-40.
- Raynaud L., Delbac F., Broussolle V., Rabodonirina M., Girault V., Wallon M., Cozon G., Vivares C. P., Peyron F. (1998). Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* 36:37-40.
- Reduker D., Speer C. A. (1985). Factors influencing excystation in *Cryptosporidium* oocysts from cattle. *J. Parasitol.* 71:112-115.

- Reetz J. (1993). Naturally-acquired microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) infections in hens. *Tierarztl. Prax.*, 21:429-435.
- Reetz J., Wiedemann M., Aue A., Wittstatt U., Ochs A., Thomschke A., Manke H., Schwebs M., Rinder H. (2004). Disseminated lethal *Encephalitozoon cuniculi* (genotype III) infections in cotton-top tamarins (*Oedipomidas oedipus*)--a case report. *Parasitol. Int.* 53:29-34.
- Reynolds K. A., Mena K. D., Gerba C. P. (2008). Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192:117-158.
- 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.
- Robertson L., Campbell A. T., Smith H. V. (1993). In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol.* 106:13-19.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S. J., Katzer F., Bartley P. M., Hunter P. R., Nath M., Innes E. A., Chalmers R. M. (2010). Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* In man and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* 40:1539-1548.
- Rosales M. J., Cordon G. P., Moreno M. S., Sanchez C. M. (2005). Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Trop.* 95:74-78.
- Rose J. B. (1997). Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annu. Rev. Public Health* 18:135-61.
- Rossle N. F., Latif B. (2013). Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3:916-924
- Ryan N. J., Sutherland G., Coughlan K., Globan M., Doultree J., Marshall J., Baird R. W., Pedersen J., Dwyer B. (1993). A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 31:3264-3269.
- Ryan U. M., Monis P., Enemark H. L., Sulaiman I. M., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R. C., Xiao L. (2004). *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* 90:769-773.
- Ryan U. M., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A., Pavlásek I. (2003b). Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4302-4307.
- Sak B., Brady D., Pelikánová M., Květoňová D., Rost M., Kostka M., Tolarová V., Hůzová Z., Kváč M. (2011b). Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* 49:1064-1070.
- Sak B., Kučerová Z., Kváč M., Květoňová D., Rost M., Secor E. W. (2010). Seropositivity for *Enterocytozoon bieneusi*, Czech Republic. *Emerg. Infect. Dis.* 16:335-337.

- 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.
- Sak B., Kváč M., Kučerová Z., Květoňová D., Saková K. (2011a). Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals - a longitudinal study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:e1162.
- Sak B., Petrzalková K. J., Kvetonová D., Mynarova A., Shutt K. A., Pomajbíková K., Kalousova B., Modry D., Benavides J., Todd A., Kvac M. (2013). Long-term monitoring of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at different stages of habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *PLoS One.* 8:e71840.
- Santín M., Cortés V., Jesús A., Fayer R. (2010). A zoonotic genotype of *enterocytozoon bieneusi* in horses. *J. Parasitol.* 96:157-161.
- Santín M., Cortés V., Jesús A., Fayer. (2010) A zoonotic genotype of *enterocytozoon bieneusi* in horses. *J. Parasitol.* 96:157-161.
- Santín M., Trout J. M., Fayer R. (2005). *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in dairy cattle in the eastern United States. *Parasitol. Res.* 97:535-538.
- Santín M., Trout J. M., Vecino J. A., Dubey J. P., Fayer R. (2006). *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Vet. Parasitol.* 141:334-339.
- Sargent K. D., Morgan U. M., Elliot A., Thompson R. C. (1998). Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. *Vet Parasitol.* 77:221-227.
- Sax P. E., Rich J. D., Pieciak W. S., Trnka Y. M. (1995). Intestinal microsporidiosis occurring in a liver transplant recipient. *Trans.* 60:617-618.
- Scorza A. V., Brewer M. M., Lappin M. R. (2003) Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. in cat feces. *J. Parasitol.* 89:423-426.
- Shadduck J. A., Bendele R., Robinson G. T. (1978). Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. *Vet. Pathol.* 15:449-460.
- Shukla R., Giraldo P., Kraliz A., Finnigan M., Sanchez A. L. (2006). *Cryptosporidium* spp. and other zoonotic enteric parasites in a sample of domestic dogs and cats in the Niagara region of Ontario. *Can. Vet. J.* 47:1179-1184.
- Schwartz D. A., Abou-Elella A., Wilcox C. M., Gorelkin L., Visvesvara G. S., Thompson S. E. 3rd, Weber R., Bryan R. T. (1995) The presence of *Enterocytozoon bieneusi* spores in the lamina propria of small bowel biopsies with no evidence of disseminated microsporidiosis. Enteric Opportunistic Infections Working Group. *Arch Pathol Lab Med.* 119:424-428.
- Siński E., Behnke J. M. (2004). Apicomplexan parasites: environmental contamination and transmission. *Pol. J. Microbiol.* 53:67-73.

- Slavin D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). J. Comp. Pathol. 65:262-266.
- Slodkowicz-Kowalska A. (2009). Animal reservoirs of human virulent microsporidian species. Wiad. Parazytol. 55:63-65.
- Slodkowicz-Kowalska A., Graczyk T. K., Tamang L., Jedrzejewski S., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A. S., Majewska A. C. (2006). Microsporidia species known to infect humans are present in aquatic birds; implications for transmission via water? Appl. Environ. Microbiol. 72:4540-4544.
- Smith H. V., Caccio S. M., Tait A., McLauchlin J., Thompson R. C. A. (2006). Tools for investigating the abiotic transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. Appl. Environ. Microbiol. 76:5977-5986.
- Smith H. V., Rose J. B. (1998). Waterborne cryptosporidiosis: current status. Parasitol. Tod. 14:14-22.
- Smith S., Elliot A. J., Mallaghan C., Modha D., Hippisley-Cox J., Large S., Regan M., Smith G. E. (2010). 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. 15:19643.
- Snowden K., Logan K., Didier E. S. (1999). *Encephalitozoon cuniculi* strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. J. Infect. Dis. 180:2086-2088.
- Soave R., Danner R. L., Honig C. L., Ma P., Hart C. C., Nash T., Roberts R. B. (1984). Cryptosporidiosis in homosexual men. Ann. Intern. Med. 100:504-511.
- Sobottka I., Albrecht H., Schottelius J., Schmetz C., Bentfeld M., Laufs R., Schwartz D. A. (1995). Self-limited traveller's diarrhea due to a dual infection with *Enterocytozoon bieneusi* and *Cryptosporidium parvum* in an immunocompetent HIV-negative child. Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis. 14:919-920.
- Sprague (1977). Systematics of the Microsporidia. Plenum Press, USA, New York, 510.
- Sprague V., Becnel J. J. (1998). Note on the name author-date combination for the taxon Microsporidies Balbiani, 1882, when ranked as a phylum. J. Invertebr. Pathol. 71:91-94.
- Sprague V., Becnel J. J., Hazard E. I. (1992). Taxonomy of phylum Microspora. Crit. Rev. Microbiol. 18:285-239.
- Stark D., Barratt J. L., van Hal S., Marriott D., Harkness J., Ellis J. T. (2009). Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. Clin. Microbiol. Rev. 22:634-650.
- Strong W., Gut J., Nelson R. G. (2000). Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60 - kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45 - kilodalton zoite surface antigen products. Infect. Immun. 68:4117-4134.

- Sulaiman I. M., Bern C., Gilman R., Cama V., Kawai V., Vargas D., Ticona E., Vivar A., Xiao L. (2003a). A molecular biologic study of *Enterocytozoon bieneusi* in HIV-infected patients in Lima, Peru. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50:591-596.
- Sulaiman I. M., Fayer R., Lal A. A., Trout J. M., Schaefer F. W., Xiao L. (2003b). Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4495-4501.
- Šlapeta J. (2013) *Cryptosporidiosis* and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? *Int. J. Parasitol.* 2013 Nov 43:957-970.
- Theulier M., Breton J. (2008). *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Paras.* 15:349-358.
- Theng J., Chan C., Ling M. L., Tan D. (2001). Microsporidial keratoconjunctivitis in a healthy contact lens wearer without human immunodeficiency virus infection. *Ophthalmol.* 108:976-978.
- Thompson R. C., Olson M. E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M. S., Hijjawi N. S. (2005). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 59:77-158.
- Tiangtip R., Jongwutiwes S. (2002). Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from hiv-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health.* 7:357-364.
- Troemel E. R., Félix M. A., Whiteman N. K., Barrière A., Ausubel M. F. (2008). Microsporidia are natural intracellular parasites of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 6:309.
- Tyzzer E. (1907). A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 5:12-13.
- Tyzzer, E. E. (1910). An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23:487-511.
- Tyzzer, 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., Angus K. W., Gray E. W., Cambell I., Allan F. (1981). Diarrhea in lambs experimentally infected with *Cryptosporidium* isolated from calves. *Am. J. Vet. Res.* 42:1400-1404.
- Tzipori S., Carville A., Widmer G., Kotler D., Mansfield K., Lackner A. (1997). Transmission and establishment of a persistent infection of *Enterocytozoon bieneusi*, derived from a human with AIDS, in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J. Infect. Dis.* 175:1016-1020.
- Tzipori S., Smith M., Birch C., Barnes G., Bishop R. (1983). Cryptosporidiosis in hospital patients with gastroenteritis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:931-934.

- Tzipori S., Ward H. (2002). Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microb. Infect.* 4:1047-1058.
- Undeen A. H., Avery S. E. (1984). Germination of experimentally nontransmissible microsporidia. *J. Invertebr. Pathol.* 43:299-301.
- Undeen A. H., Epsky N. D. (1990). In vitro and vivo germination of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) spores. *J. Invertebr. Pathol.* 56:371-379.
- Upton S. J., Current W. L. (1985). The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *J. Parasitol.* 71:625-629.
- Van den Akker B., Whiffin V., Cox P., Beatson P., Ashbolt N. J., Roser D. J. (2011). Estimating the risk from sewage treatment plant effluent in the Sydney catchment area. *W. Sci. Technol.* 63:1707-1715.
- Van Gool T., Luderhoff E., Nathoo K. J., Kiire C. F., Dankert J., Mason P. R. (1995). High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* infections among HIV-positive individuals with persistent diarrhoea in Harare, Zimbabwe. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89:478-480.
- Van Gool T., Vetter J. C., Weinmayr B., van Dam A., Derouin F., Dankert J. (1997). High seroprevalence of Encephalitozoon species in immunocompetent subjects. *J. Infect. Dis.* 175:1020-1024.
- Vávra J. (1976). Structure of the Microsporidia. In: I. A. Bulla, Cheng T. C. (Eds.), *Comparative Pathobiology*. Vol. 1., Plenum Press, New York, pp. 1-85.
- Vávra J., Larsson J. (1999). Structure of the Microsporidia. In: Wittner M., Weiss L. M., (Eds.), *The Microsporidia and microsporidiosis*, ASM Press, Washington D. C. pp. 7-84.
- Velásquez J. N., Chertcoff A. V., Etchart C., di Risio C., Sodr  F. C., Cucher M. A., Carnevale S. (2012). First case report of infection caused by *Encephalitozoon intestinalis* in a domestic cat and a patient with AIDS. *Vet Parasitol.* 190:583-586.
- Vossbrinck C. R., Woese C. R. (1986). Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nat.* 320:257-288.
- Waldron L. S., Cheung-Kwok-Sang C., Power M. L. (2010). Wildlife-associated *Cryptosporidium fayeri* in human, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 16:2006-2007.
- Waldron L. S., Ferrari B. C., Power M. L. (2009). Glycoprotein 60 diversity in *C. hominis* and *C. parvum* causing human cryptosporidiosis in NSW Australia. *Exp. Parasitol.* 122:124-127.
- Wanachiwanawin D., Manatsathis S., Lertlaituan P., Thakerngpol K., Suwanagool P. (1998). Intestinal microsporidiosis in HIV infected patients with chronic diarrhea in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Heal.* 29:767-771.

- Wanke C. A., Degirolami P., Federman M. (1996). *Enterocytozoon bieneusi* infection and diarrheal disease in patients who were not infected with human immunodeficiency virus: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 23:816-818.
- Wasson K., Peper R. L. (2000). Malian microsporidiosis. *Vet. Pathol.* 37:113-128.
- Webber R., Deplazes P., Schwartz D. (2000). Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contrib. Microbiol.* 6:166-192.
- Weber R., Bryan R. T. (1994). Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* 19:517-521.
- 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.
- Weber R., Ledergerber B., Zbinden R., Altwegg M., Pfyffer G. E., Spycher M. A., Briner J., Kaiser L., Opravil M., Meyenberger C., Flepp M. (1999a). Enteric infections and diarrhea in human immunodeficiency virus-infected persons: prospective community-based cohort study. Swiss HIV Cohort Study. *Arch. Intern. Med.* 159:1473-1480.
- Weber R., Schwartz D. A., Deplazes P. (1999b). Laboratory diagnosis of microsporidiosis. In: Wittner M., Weiss L. M. (Eds.), *The microsporidia and microsporidiosis*, ASM Press, Washington D. C., 553p, 315-363.
- Weisburger W. R., Hutcheon D. F., Yardley J. H., Roche J. C., Hillis W. D., Charache P. (1979). Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. *Am. J. Clin. Pathol.* 72:473-478.
- Wenker C. J., Hatt J. M., Ziegler D., Mathis A., Tanner I., Deplazes P. (2002). Microsporidiosis (*Encephalitozoon* spp.) of new world primates - an emerging disease? A seroepidemiological, pathological and therapeutical survey in the Zurich zoo. In *Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the European Association of Zoo and Wildlife Vets*, Heidelberg, Germany. 503-508.
- Williams B. A., Hirt R. P., Lucocq J. M., Embley T. M. (2002). A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nat.* 418:865-869.
- Wilson J. M. (1979). *Encephalitozoon cuniculi* in wild European rabbits and a fox. *Res. Vet. Sci.* 26:114.
- Wittner M., Weiss L. M. (1999). *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press. USA, Washington D. C. 533p.
- Wright J. H., Craighead E. M. (1922). Infectious motor paralysis in young rabbits. *J. Exp. Med.* 36:135-140.



- Xiao L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp. Parasitol.* 124:80-89.
- Xiao L., Ryan U. M. (2004). Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17:483-490.
- Xiao L., Ryan U. M. (2008). Molecular epidemiology. In R. Fayer and L. Xiao (ed.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 576p. 119-172.
- Xu Y., Weiss L. M. (2005). The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. *Int. J. Parasitol.* 35:941-953.
- Yoshiuchi R., Matsubayashi M., Kimata I., Furuya M., Tani H., Sasai K. (2010). Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. *Vet. Parasitol.* 174:313-316.
- Zhao W1, Zhang W, Yang F, Cao J, Liu H, Yang D, Shen Y, Liu A. (2014). High Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in Asymptomatic Pigs and Assessment of Zoonotic Risk at a Genotype Level. *Appl Environ Microbiol.* Apr 11. [Epub ahead of print]
- Zhou L., Kassa H., Tischler M. L., Xiao L. (2004). Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in canada geese (*Branta canadensis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4211-4215.