

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

---

**Kryptosporidiové a mikrosporidiové infekce koní**  
Cryptosporidial and microsporidial infection of horses

**disertační práce**

**Ing. Pavla Wagnerová**

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

**České Budějovice 2015**

## **Disertační práce**

Wagnerová, P. 2015: Kryptosporidiové a mikrosporidiové infekce koní. [Cryptosporidial and microsporidial infection of horses]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 137 s.

## Anotace

Cílem práce bylo popsat výskyt a prevalenci kryptosporidií a mikrosporidií infikujících domestikované a divoké koně a dále populaci oslů v závislosti na věku, pohlaví a systému chovu. Mezi roky 2011–2015 bylo celkem ve 4 zemích (Česká republika, Polsko, Alžír a USA) odebráno, mikroskopicky a molekulárně vyšetřeno na přítomnost kryptosporidií nebo mikrosporidií 1300 vzorků trusu, z toho 90 vzorků pocházelo z divokých koní ze třech lokalit v USA, 124 vzorků z oslů a 357 vzorků z koní pocházejících z různých provincií v Alžíru, 81 vzorků z koní z Polska a 648 vzorků od koní z České republiky.

Z důvodů prohloubení znalostí o průběhu infekce způsobené mikrosporidií *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II byl proveden experimentální pokus na devíti koních plemene minihorse. Z výsledků komplexní studie vyplývá, že akutní fáze infekce nastupuje 28. DPI a je charakterizována diseminací spor *E. cuniculi* téměř do všech sledovaných orgánů.

Rozdíly ve vnímavosti koní ke kryptosporidiím v závislosti na věku, pohlaví nebo systému chovu nebyly na námi zkoumaném reprezentativním vzorku zvířat zaznamenány. Naopak v případě infekce *E. cuniculi*, byla věková specifita potvrzena, když starší koně v českých chovech byli infikováni více.

Z našich výsledků dále vyplývá, že koně jsou vnímaví k pěti různým druhům kryptosporidií (*C. parvum*, *C. muris*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei*, *C. hominis*) a jednomu genotypu (*Cryptosporidium* horse genotype).

Celkem bylo identifikováno 16 různých genotypů *E. bieneusi* a 3 genotypy *E. cuniculi*. Navíc bylo nově popsáno devět genotypů *E. bieneusi* nazvaných Horse 3–Horse 11. *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II byl v chovech koní obecně více rozšířen.

I přes velkou diverzitu detekovaných druhů mikrosporidií a kryptosporidií se zoonotickým potenciálem, nepředstavují koně významné riziko v možném přenosu a šíření infekce v lidské populaci.

**Klíčová slova:**

technologie chovu; věková specifita; experimentální infekce; *Encephalitozoon cuniculi*; *Enterocytozoon bieneusi*; *Cryptosporidium* spp.; SSU; gp60; ITS; COWP; TRAP-C1; HSP70

## **Anotation**

The aim of the thesis was to describe the occurrence and prevalence of *Cryptosporidium* spp. and microsporidia in domestic and wild horses and donkeys, and to determine any statistically significant association between parasite occurrence and age, sex or farm technology. Fecal samples were collected from 1300 horses and donkeys from four different countries (Czech, Poland, USA, and Algeria) during the years 2011–2015. Ninety samples were from three different locations in the USA, 81 were from Poland, 481 were from Algeria (124 and 357 from donkeys and horses, respectively), and 648 were from the Czech Republic.

Nine ponies were experimentally infected with *E. cuniculi* genotype II. Acute microsporidiosis in these animals was characterized by the dissemination of microsporidia into almost all organs and a significant increase in the concentration of specific antibodies in blood from 28 DPI.

Associations between the occurrence of *Cryptosporidium* and age, sex or farm technology were generally not statistically significant. However, older horses in the Czech Republic were statistically more likely to be infected with *E. cuniculi*.

Our results show that horses are susceptible to at least five different *Cryptosporidium* species (*C. parvum*, *C. muris*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei*, *C. hominis*) and one genotype (*Cryptosporidium* horse genotype).

Three genotypes of *E. cuniculi* and 16 genotypes of *E. bienersi*, including seven previously described and nine novel genotypes (Horse 3 - Horse 11) were detected.

*Encephalitozoon cuniculi* genotype II was the most frequently detected.

Despite high diversity of detected zoonotic microsporidia and cryptosporidia, horses do not appear to be a major source of infection for humans.

**Key words:**

breeding technology; age specificity; experimental infection; *Encephalitozoon cuniculi*; *Enterocytozoon bieneusi*; *Cryptosporidium* spp.; SSU; gp60; ITS; COWP; TRAP-C1; HSP70

## **Prohlášení**

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě disertační práci zpracovanou na závěr doktorského studia na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Prohlašuji tímto, že jsem práci vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a dostupných zdrojů uvedených v seznamu, jenž je součástí této práce.

Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné sekci databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 1. května 2015

.....

Ing. Pavla Wagnerová

## **Práce vznikla za podpory následujících grantů**

**GA JU 022/2010/Z** - Využití genetických a biotechnologických postupů při upevňování zdraví zvířat (2010–2012)

**GA JU 11/2013/Z** - Zdraví hospodářských zvířat a zdravotní bezpečnost potravin - genetické, parazitární a nutriční aspekty (2013–2015)

**MŠMT ČR - MSM 6007665806** - Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním (2005–2011)

**MŠMT ČR - LH11061** - Diverzita, biologie a fylogenetika kryptosporidií parazitujících u hlodavců (2011–2014)

**GAČR 15-01090S** - Rozkrývání rozmanitosti kryptosporidií: propojení studia genetické variability a biologie parazitů (2015–2017)



## Seznam impaktovaných publikací

### Disertační práce vychází z těchto publikací:

- I. Wagnerová, P.,** Sak, B., Květoňová, D., Buňatová, Z., Civišová, H., Maršálek, M., Kváč, M. 2012. *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* in horses kept under different management systems in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 190, 573–577.
- II. Wagnerová, P.,** Sak, B., Květoňová, D., Maršálek, M., Langrová, I., Kváč, M. 2013. Humoral immune response and spreading of *Encephalitozoon cuniculi* infection in experimentally infected ponies. *Vet Parasitol* 197, 1–6.
- III. Laalamna, A.E., Wagnerová, P.,** Sak, B., Květoňová, D., Aissi, M., Rost, M., Kváč, M. 2013. Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog genotype in Algeria. *Vet Parasitol* 197, 350–353.
- IV. Wagnerová, P.,** Sak, B., Květoňová, D., McEvoy, J., Rost, M., Perek Matysiak, A., Kváč, M. 2015. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in Czech Republic and Poland. *Parasitol Res* 114, 1619–1624.
- V. Laalamna, A.E., Wagnerová, P.,** Sak, B., Květoňová, D., Xiao, L., Rost, M., McEvoy, J., Saadi, A.R., Aissi, M., Kváč, M. 2015. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Vet Parasitol* 208, 135–142.
- VI. Wagnerová, P.,** Sak, B., Rost, M., McEvoy, J., Kváč, M. *Cryptosporidium* and microsporidia in free-roaming Mustangs and Chincoteque ponies in Oregon, North Dakota, and Virginia (USA). *Equine Vet J*, under review

**Další impaktované publikace, na kterých jsem spolupracovala a které se přímo netýkají tématu disertační práce (nejsou součástí práce):**

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

Scháňková, Š., Maršálek, M., **Wagnerová, P.**, Langrová, I., Starostová, L., Stupka, R., Navrátil, J., Brožová, A., Truněčková, J., Kudrnáčová, M., Jankovská, I., Vadlejch, J., Čadková, Z., Křivská, D. 2014. Arrested development of experimental *Cyathostominae* infections in ponies in Czech Republic. *Vet Parasitol* 206, 3–4.

Scháňková, Š., Maršálek, M., **Wagnerová, P.**, Lukešová, D., Starostová, L., Jankovská, I., Čadková, Z., Kudrnáčová, M., Brožová, A., Truněčková, J., Langrová, I. 2013. Treatment failure of ivermectin for *Oxyuris equi* in naturally infected ponies in Czech Republic. *Helmintologia* 50, 232–234.

## **Poděkování**

Tato disertační práce byla vypracována v průběhu studia na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity ve spolupráci s vědeckým týmem Laboratoře veterinární a medicínské protistologie Parazitologického ústavu Akademie věd České republiky.

Tímto bych chtěla poděkovat všem, kteří mi byli nápomocni při mé práci. Velké poděkování patří mému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za odborné vedení v průběhu celého studia, cenné rady a trpělivost nejenom při zpracování této práce, poskytnutí kvalitního zázemí nezbytného pro výzkum a zprostředkování stáže v USA, která pro mne byla jedinečným zážitkem, inspirací a výrazným posunem v mém životě.

Mé poděkování dále patří spolupracovníkům a kolegům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie za vytvoření přátelské a pozitivní atmosféry při práci. Zejména bych chtěla poděkovat RNDr. Daně Květoňové, RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. a RNDr. Michaele Kotkové za pomoc v průběhu experimentálního pokusu, při zpracovávání vzorků, psaní publikací a i za to, že mi byli vždy oporou.

Velice si vážím spolupráce tuzemských i zahraničních chovatelů koní, kteří se zásadním způsobem, tím, že poskytli vzorky svých koní, zasadili o výsledky disertační práce.

Děkuji všem spoluautorům publikací, kteří se velkou měrou podíleli na tvorbě odborných článků, na něž tato práce odkazuje.

Závěrem chci poděkovat své rodině, blízkým a přátelům za podporu, pochopení a trpělivost.

## Obsah

1. ÚVOD.....	16
2. CÍL PRÁCE.....	19
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	20
3.1 Kryptosporidie a kryptosporidióza koní.....	20
3.1.1 Historie .....	20
3.1.2 Taxonomie.....	21
3.1.3 Vývojový cyklus kryptosporidií .....	21
3.1.3.1 Vývojový cyklus a lokalizace kryptosporidií u koní .....	22
3.1.4 Přenos infekce .....	23
3.1.5 Klinické příznaky .....	23
3.1.5.1 Klinické příznaky kryptosporidiózy koní .....	24
3.1.6 Terapie .....	25
3.1.7 Hostitelská specifita.....	25
3.1.8 Zoonotický potenciál kryptosporidií .....	26
3.1.9 Prevalence kryptosporidií u koní.....	27
3.1.10 Druhy a genotypy infikující koně.....	28
3.1.9.1 <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	29
3.1.9.2 <i>Cryptosporidium</i> horse genotype.....	30
3.1.9.3 <i>Cryptosporidium muris</i> .....	30
3.1.9.4 <i>Cryptosporidium hominis</i> .....	31
3.1.9.5 <i>Cryptosporidium erinacei</i> .....	31
3.1.9.6 <i>Cryptosporidium tyzzeri</i> .....	32
3.1.9.7 <i>Cryptosporidium felis</i> .....	32

3.2 Mikrosporidie a mikrosporidióza koní .....	33
3.2.1 Historie .....	33
3.2.2 Taxonomie .....	34
3.2.3 Stavba buňky .....	34
3.2.4 Vývojový cyklus mikrosporidií .....	35
3.2.5 Infekce hostitelské buňky a přenos infekce .....	35
3.2.6 Patogenita a klinické příznaky .....	36
3.2.6.1 <i>Enterocytozoon bieneusi</i> .....	37
3.2.6.2 <i>Encephalitozoon spp.</i> .....	37
3.2.7 Terapie .....	38
3.2.8 Zoonotický potenciál mikrosporidií .....	39
3.2.9 Hostitelská specifita .....	40
3.2.9.1 <i>Enterocytozoon bieneusi</i> .....	40
3.2.9.2 <i>Encephalitozoon spp.</i> .....	40
3.2.10 Prevalence mikrosporidií u koní .....	40
3.2.11 Druhy a genotypy infikující koně a osly .....	41
4. MATERIÁL A METODIKA .....	42
4.1 Materiál .....	42
4.2 Metody .....	44
4.2.1 Mikroskopická diagnostika oocyst kryptosporidií .....	44
4.2.2 Experimentální infekce .....	45
4.2.2.1 Zdroj spor pro experimentální infekci .....	45
4.2.2.2 Experimentální zvířata .....	45
4.2.2.3 Infekce experimentálních zvířat .....	45

4.2.2.4 Odběr vzorků orgánů a tkání .....	46
4.2.2.5 Příprava histologických preparátů .....	46
4.2.2.6 Barvení podle Brown-Brenna (modifikace Gramova barvení) .....	47
4.2.2.7 Barvení hematoxylin-eosinem .....	48
4.2.2.8 Barvení pomocí Calcofluoru White M2R (Vávra et Chalupský 1982) .....	48
4.2.2.9 Nepřímá ELISA - detekce specifických protilátek .....	49
4.2.2.10 Izolace DNA z tkání .....	49
4.2.2.11 Izolace DNA z trusu .....	50
4.2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	51
4.2.4. Gelová elektroforéza .....	52
4.2.5. Příprava vzorků na sekvenaci a sekvenace .....	53
4.2.6. Fylogenetická analýza .....	53
4.2.7. Statistická analýza .....	53
5. SHRUTÍ NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ DISERTAČNÍ PRÁCE .....	54
5.1 Výskyt a prevalence kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí v chovech koní, oslů a volně žijících stádech divokých koní .....	54
5.1.2 Prevalence kryptosporidií v závislosti na technologii chovu .....	55
5.1.3 Prevalence kryptosporidií v závislosti na věku a pohlaví .....	55
5.1.4 Prevalence kryptosporidií u divokých koní a oslů .....	56
5.1.5 Prevalence mikrosporidií v závislosti na technologii chovu .....	56
5.1.6 Prevalence mikrosporidií v závislosti na věku a pohlaví .....	56
5.1.7 Prevalence mikrosporidií u divokých koní .....	57
5.2 Klinické příznaky kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí .....	57
5.3 Diverzita genotypů kryptosporidií .....	57
5.4 Diverzita genotypů <i>E. bieneusi</i> a <i>E. cuniculi</i> .....	58

5.5 Průběh experimentální infekce způsobené <i>E. cuniculi</i> .....	58
6. ZÁVĚRY .....	60
7. PROHLÁŠENÍ SPOLUAUTORŮ .....	61
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	62
9. PŘÍLOHY .....	91

# 1. ÚVOD

Kůň byl pro člověka vždy velmi důležitý. Historie tohoto druhu je stará více než milion let. První pokusy o domestikaci proběhly v Asii 5500 let př. n. l. Kůň sloužil k dopravě, zemědělství a důležitou úlohu hrál ve vojenství. S postupným rozvojem technického pokroku však začal chov koní ztrácet na významu a kůň byl postupně nahrazován mechanizací. Tyto okolnosti způsobily hlubokou krizi v oblasti chovu koní a byly příčinou prudkého poklesu jejich počtu. Díky potřebě lidí aktivně trávit volný čas, došlo k návratu člověka k přírodě a ke koním samotným. Rozvojem sportovního ježdění byla selekce koní zaměřena na výkonnost v jednotlivých disciplínách jezdeckého sportu. Kůň hraje též důležitou roli při hipoterapii a hiporehabilitaci a jako partner při vyjížděcích.

Chov koní má v České republice i ve světě dlouholetou tradici, ale Česká republika není ve všech směrech chovu koní konkurenceschopná. Vyplyvá to z celé řady odborných srovnávání, v poslední době však zejména nárůstem počtu importovaných koní. Se zvyšující se migrací koní ze zahraničí je nutné se obávat nárůstu infekčních chorob včetně parazitóz. Paraziti mohou velmi negativně ovlivňovat zdravotní stav, pohodu a výkonnost koní. Nejvíce ohroženou skupinou bývají hříbata a mladí koně. Ve většině případů nebývají paraziti přímou příčinou výrazných klinických příznaků onemocnění či úhynů koní, nicméně snižují celkovou odolnost, přírůstky a sportovní výkonnost, což může vést ke značným ekonomickým ztrátám. V ojedinělých případech končí parazitární infekce bez včasné terapie pro hostitele smrtí. Z těchto důvodů je velmi důležité věnovat parazitům koní náležitou pozornost.

Do jedné z celosvětově sledovaných skupin parazitů se řadí jednobuněčná protista patřící do rodu *Cryptosporidium*, infikující široké spektrum obratlovců (Fayer 2010). Ačkoli první zmínka o výskytu kryptosporidií u koní se objevila v roce 1978 v USA a jednalo se o kryptosporidiózu u imunodeficientních arabských hříbat (Snyder et al. 1978), o prevalenci, klinických příznacích a zoonotickém potenciálu kryptosporidií infikujících koně je narozdíl od ostatních druhů hospodářských zvířat a lidí doposud velmi málo informací. Pouze zlomek z dosud publikovaných prací (vyjma těch, které



jsou podstatou této práce) týkajících se kryptosporidií a kryptosporidiózy u koní se kromě mikroskopického vyšetření zabýval i genotypizací původce kryptosporidiových infekcí (Burton et al. 2010; Grinberg et al. 2003, 2008, 2009; Chalmers et al. 2005; Imhasly et al. 2009; Ryan et al. 2003; Veronesi et al. 2010). Přirozené infekce kryptosporidii byly u koní prokázány v mnoha zemích světa: v USA (e.g. Burton et al. 2010), Kanadě (e.g. Gajadhar et al. 1985), Brazílii (de Souza et al. 2009), Novém Zélandu (e.g. Grinberg et al. 2009) a Evropě, zahrnující Polsko (e.g. Majewska et al. 1999), Itálii (Veronesi et al. 2010), Českou republiku (e.g. Ryan et al. 2003), Německo (Epe et al. 2004), Velkou Británii (e.g. Sturdee et al. 2003) a Švýcarsko (Imhasly et al. 2009).

Za jedinou hostitelsky specifickou kryptosporidii je dosud považováno *Cryptosporidium* horse genotype identifikováno u hřiběte koně Převalského v Pražské Zoo (Ryan et al. 2003). Později byl tento stejný genotyp detekován u dvou lidí (Robinson et al. 2008), telete (Thompson et al. 2007) a ježka (*Atelerix albiventris*; Abe et Matsubara 2015).

Druhou celosvětově rozšířenou a sledovanou skupinou protist jsou mikrosporidie, obligátní intracelulární paraziti patřící do říše Fungi a kmene Mikrosporidia zahrnující přibližně 1300 druhů ve 160 rodech (Lee et al. 2009; Choudhary et al. 2011). Z pohledu lékařských a veterinárních věd jsou v rámci mikrosporidií nejsledovanější dva zoonotické rody, a to rod *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* (Didier et Weiss 2006). Zástupci obou rodů, *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis* a *E. hellem* patří mezi nejčastější původce mikrosporidiových infekcí jak imunodeficitních, tak imunokompetentních osob a zvířat (Didier et al. 2004). Přestože *E. bieneusi* je nejrozšířenější mikrosporidií se zoonotickým potenciálem, která byla detekována u mnoha druhů zvířat (Buckholt et al. 2002; Reetz et al. 2002; Fayer et al. 2003; Santín et al. 2004), teprve až v roce 2010 byla tato mikrosporidie poprvé diagnostikována u koní v Jižní Americe (Santín et al. 2010).

Taktéž zástupci rodu *Encephalitozoon*, zejména *E. cuniculi* a *E. intestinalis*, patří mezi nejvíce rozšířené druhy mikrosporidií parazitujících u savců (Wasson et Peper 2000). Obdobně jako v případě *E. bieneusi*, také infekce způsobené *Encephalitozoon*

spp. u koní nejsou příliš často předmětem vědeckého zájmu. U koní je výskyt *E. cuniculi* vzácně spojován s placentitidami a aborty u klisen (Patterson-Kane et al. 2003; Szeredi et al. 2007).

Z výše uvedeného krátkého úvodu je zřejmé, že vědeckých studií zabývajících se kryptosporidiovými a mikrosporidiovými infekcemi koní a případně dalších domestikovaných koňovitých je zatím velmi málo. Z důvodů rozšíření našeho vědeckého poznání je nezbytné provést ještě celou řadu studií. Cílem předložené práce je vyplnit některé mezery ve studované oblasti.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem disertační práce bylo doplnit kritické mezery ve znalostech výskytu, diverzity a způsobu šíření kryptosporidií a mikrosporidií infikujících domestikované a divoké koně z USA a další domestikované koňovité.

Následující konkrétní dílčí cíle představují jednotlivé kroky výzkumu nezbytné pro dosažení hlavního cíle:

- Popsat výskyt a prevalenci kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí v chovech koní a volně žijících stádech divokých koní v Severní Americe.
- Charakterizovat kryptosporidie a mikrosporidie koní na úrovni druhu, respektive na úrovni genotypu/subtypu.
- Popsat vliv zoohygieny a technologie chovu na výskyt kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí v chovech koní.
- Získat nové poznatky o dynamice šíření mikrosporidiové infekce vyvolané *Encephalitozoon cuniculi* v tkáních a orgánech infikovaných koní.
- Porovnat výsledky získané z chovů koní s výsledky získanými u volně žijících stád divokých koní.

## 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Kryptosporidie a kryptosporidióza koní

#### 3.1.1 Historie

Na počátku 20. století byly popsány první druhy kryptosporidií, ale až na jeho konci byly zařazeny mezi významné infekční agens. První zmínka o kryptosporidiích pochází z roku 1907 (Tyzzer 1907), kdy Ernest Edward Tyzzer popsal vývojový cyklus tohoto parazita, kterého našel ve sliznici žaludku laboratorních myší a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). V roce 1910 byla popsána všechna morfologická stadia tohoto parazita a *Cryptosporidium* byl uznán jako nový rod (Tyzzer 1910). O dva roky později byl stejným autorem popsán další druh kryptosporidií s vývojovým cyklem v tenkém střevě myší pojmenovaný *C. parvum* (Tyzzer 1912). Jako třetí kryptosporidie bylo popsáno *C. meleagridis* u krůt v roce 1955 (Slavin 1955). Až do roku 1975 nebyl kryptosporidiím připisován prakticky žádný lékařský či veterinární význam, ale v roce 1976 došlo k prvnímu výskytu kryptosporidií u imunokompromitovaných lidí (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976). Významné pozornosti kryptosporidiím se jako život ohrožujícím parazitům dostalo až počátkem 90-tých let 20. století, kdy v důsledku rozsáhlé epidemie způsobené kontaminací vodního zdroje v Milwaukee (Wisconsin, USA) bylo postiženo více než 400 000 osob. Infekce rodu *Cryptosporidium* byla laboratorními metodami prokázána u více než 600 osob, které trpěly těžkými průjmy, inapetencí, úbytkem váhy, horečkou a zvracením (Mac Kenzie et al. 1994).

Ačkoliv byly kryptosporidie poprvé detekovány u koní v roce 1978 (Snyder et al. 1978), informací ohledně prevalence, genotypů kryptosporidií infikujících koně, zoonotickém potenciálu, vývojovém cyklu, patogenitě a klinických příznacích, je stále velmi málo. Přirozené infekce kryptosporidii byly popsány hlavně u hříbat mladších 6 měsíců v Evropě (Browning et al. 1991; Chalmers et al. 2005; Hajdušek et al. 2004; Imhasly et al. 2009; Majewska et al. 1999; Sturdee et al. 2003; Veronesi et al. 2010), v Severní Americe (Cole et al. 1998; Xiao et Herd 1994a), v Jižní Americe (de Souza et al. 2009), na Středním Východě (Mahdi et Ali 2002) a Novém Zélandu (Grinberg

et al. 2003, 2009). Na základě molekulárních analýz bylo *C. parvum* detekováno u koní až v roce 2003 (Grinberg et al. 2003), ve stejném roce byl identifikován i *Cryptosporidium* horse genotype u hřiběte koně Převalského (Ryan et al. 2003).

### 3.1.2 Taxonomie

Kryptosporidie jsou řazeny do kmene Apicomplexa. Dříve byly nesprávně označovány jako kokcidie, zejména díky morfologické podobnosti a vývojovém cyklu v gastrointestinálním traktu (Fayer et al. 1997). Molekulární analýzy provedené v pozdější době však odhalily bližší příbuznost s gregarinami (Gregarinasina) než s kokcidiemi (Coccidiasina; Carreno et al. 1999). Gregariny jsou pravděpodobně polyfyletické s eugregarinami a neogregarinami, které jsou příbuznější rodu *Cryptosporidium* a *Rhydocystidae* než archigregarinám (Cavalier-Smith 2014).

V současné době je známo 27 platných druhů kryptosporidií, které byly rozlišeny na základě morfologických rozdílů, hostitelské specifity, či lokalizace vývojového cyklu a molekulárních rozdílů (Kvác et al. 2013).

### 3.1.3 Vývojový cyklus kryptosporidií

Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní a probíhá v epiteliálních buňkách zažívacího traktu (Current et Blagburn 1990), dělí se do čtyř hlavních fází: excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie (Fayer et al. 1997; Thompson et al. 2005).

Přenos infekce je nejčastěji zprostředkován fekálně-orální cestou. Po požití oocystami kontaminované vody či potravy dochází k excystaci a uvolnění sporozoitů, kteří infikují buňky střevního epitelu a mění se na trofozoity uzavřené v parazitoforním vaku (Elliott et al. 2001; Melicherová et al. 2014; Valigurová et al. 2007). Dále probíhá merogonie (asexuální množení), kdy se jádro trofozoita dělí a vznikají dva typy merontů, výjimkou je druh *C. baileyi*, který tvoří tři typy merontů (Current et al. 1986). Meront I. typu má 6–8 jader, množí se asexuálně a vytváří 6–8 merozoitů, zatímco meront II. typu se množí sexuálně (tzv. gametogonie) a tvoří pouze 4 merozoity (Aydin 1997; Melicherová et al. 2014). Merozoiti vzniklí z meronta II. typu napadají nové epiteliální buňky hostitele a transformují se na dvě sexuální stádia, vícejaderné

mikrogamonty a jednojaderné makrogamonty. Z mikrogamontů vznikají pohyblivé mikrogamety, které migrují a oplodňují makrogamety vzniklé přeměnou makrogamontů, čímž vzniká zygota (Sunnotel et al. 2006). Zygota prochází sporogonií, dochází k formování sporozoitů a výsledkem je zralá oocysta sporulující *in situ*. Vzniklé oocysty jsou dvojího typu: silnostěnné (80 %) a tenkostěnné (20 %). Silnostěnné oocysty opouští tělo hostitele s trusem (případně s jinými tekutinami, pokud je infekce lokalizována extraintestinálně) a jsou plně infekční. Tenkostěnné oocysty slouží k tzv. autoinfekci, kdy dochází k excystaci v hostiteli a uvolnění sporozoiti napadají další epiteliální buňky hostitele (Current et Reese 1986). Dle lokalizace excystace dělíme kryptosporidie na žaludeční a střevní druhy. Žaludeční druhy kryptosporidií excystují výhradně v pravém žláznatém žaludku. Jejich sporozoiti jsou adaptováni na kyselé prostředí žaludku, které by u střevních druhů způsobilo inaktivaci (Widmer et al. 2007). Excystace střevních druhů kryptosporidií probíhá v duodenu pomocí enzymů slinivky břišní a žluči, ale mechanismus vedoucí k otevření stěny oocysty a uvolnění sporozoitů není doposud plně objasněn. Na základě experimentálních studií však bylo prokázáno, že oocystám k excystaci může postačit i vyšší teplota vodního prostředí a změna pH (Smith et al. 2005a). Za těchto podmínek pak může docházet k infekcím oka a respiračního traktu (Fayer et al. 1990).

Nové poznatky v oblasti lokalizace a vývojového cyklu byly získány při popisu nového druhu *C. huwi* v rybích hostitelích (dříve známé jako *Cryptosporidium piscine* genotype 1). Tyto kryptosporidie byly oproti jiným nalezeny hluboko v epitelu žaludeční sliznice (Ryan et al. 2015).

### **3.1.3.1 Vývojový cyklus a lokalizace kryptosporidií u koní**

O vývojovém cyklu a lokalizaci jednotlivých druhů kryptosporidií, které byly u koní nalezeny, nebylo doposud nic popsáno. Infekce *C. parvum* je primárně vázána na tenké střevo a z důvodu hostitelské nespecifity se předpokládá, že vývojový cyklus této kryptosporidie bude u všech hostitelů stejný. U ostatních kryptosporidií, které mají úzkou hostitelskou specifitu je místo působení druhově specifické; např. *Cryptosporidium baileyi* nacházíme u ptáků, kde napadá respirační trakt a kloaku

(Current et al. 1986). Orgánová specifita *Cryptosporidium* horse genotype nebyla dosud determinována.

### **3.1.4 Přenos infekce**

Nejčasteji dochází k přenosu infekce požitím oocystami kontaminované vody, či potravy. Hostitelé mohou být infikováni i přímým kontaktem s infikovaným jedincem (Feng 2008; Ziegler et al. 2007). Oocysty jsou díky své struktuře vysoce odolné ve vnějším prostředí a zůstávají po dlouhou dobu životaschopné a plně infekceschopné. Ve vodě a vhodných klimatických podmínkách jsou schopny přežít až 140 dní (Ramirez et al. 2004), odolávají klasickým dezinfekčním prostředkům používaných při úpravě vody včetně chlorování (Dolejš 2004; Domenéch-Sánchez et al. 2008).

Hlavním faktorem, který přežívání oocyst ovlivňuje je teplota. Vysoké teploty (65 °C po dobu 20 minut nebo vroucí voda po dobu 1 minuty) oocysty spolehlivě zničí (Fayer 2004) stejně jako teploty hluboko pod bodem mrazu (spolehlivě jsou oocysty devitalizovány při -70 °C) (Fayer et al. 1991, 1996, 1998). Dalším faktorem, který oocysty spolehlivě inhibuje, je UV záření (Bukhari et al. 1999).

### **3.1.5 Klinické příznaky**

Onemocnění vyvolané kryptosporidiiemi se nazývá kryptosporidióza. Klinické příznaky kryptosporidiové infekce jsou závislé na celé řadě faktorů: i) na imunitním stavu hostitele (Bjorneby et al. 1991a,b; Gentile et al. 1991; Hong et al. 2007), ii) věku hostitele (Castro-Hermida et al. 2002; de la Fuente et al. 1999; Fayer et al. 2007; Garber et al. 1994; Geurden et al. 2006; Kváč et al. 2006; Trotz-Williams et al. 2005), iii) získané imunitě, tedy zda se jedinec s infekcí již setkal (Cama et al. 2008; Hill et al. 1990) a iv) kondici hostitele (Anderson 1987; Pospischil et al. 1987). Naopak infekční dávka, plemeno nebo pohlaví nemá vliv na průběh infekce a klinické příznaky (McKenzie et Diffay 2000; Veronesi et al. 2010; Wagnerová et al. 2015). Nejčastějším a nejcharakteristějším klinickým příznakem u imunokompetentních i imunokompromitovaných jedinců je průjem, charakterizován jako profuzní a vodnatý. Ve výjimečných případech může obsahovat hlen a velmi vzácně leukocyty a krev

(Griffiths 1998; Tzipori et Ward 2002). Obecně kryptosporidóza není spojena s krvácením. Dalšími příznaky jsou abdominální bolesti, nechutenství, nevolnost, horečka, malátnost, únava a zvýšené pocení (Khan et al. 2004; Rašková et al. 2013; Thompson et al 2005; Xiao et al. 2009).

Žaludeční kryptosporidie savců, mezi které patří *C. muris* a *C. andersoni*, nezpůsobují žádné klinické příznaky a ve většině případů ani makroskopické změny. Za charakteristické histopatologické změny jsou považovány hypertrofie, atrofie a metaplazie žláznatého epitelu a dilatace infikovaných žláz (Anderson 1987; Aydin et Özkul 1996; Kváč et Vítovec 2003; Özkul et Aydin 1994).

### **3.1.5.1 Klinické příznaky kryptosporidiózy koní**

U koní se klinické příznaky nejčastěji v podobě průjmů objevují převážně u hříbat ve věku 1–4 týdny, ačkoli kryptosporidióza byla příležitostně diagnostikována i u hříbat ve věku 2 dny a mladších, dále u odstávčat a ročků (Grinberg et al. 2003; Netherwood et al. 1996). U starších koní je průjem způsobený kryptosporidiiemi vzácný, ale subklinické infekce jsou běžné jak u zdravých mladých, tak dospělých koní. Souvislost průjmů a kryptosporidiových infekcí u dospělých koní, ale i hříbat často nebyla prokázána (McKenzie et Diffay 2000; Laamanna et al. 2015; Veronesi et al. 2010; Wagnerová et al. 2015; Xiao et Herd 1994b). Predispozičním faktorem pro rozvinutí klinických příznaků kryptosporidiózy u mladých hříbat je nedostatečně vyvinutý imunitní systém (Mair et al. 2009). Kryptosporidióza je proto častá u hříbat trpících těžkou kombinovanou imunodeficiencí (Snyder et al. 1978), která může postihovat zejména hříbata arabských plnokrevníků. U těchto hříbat s porušenou imunitou (SCID hříbata) je stupeň klinických příznaků těžký, postupně vede k oslabení a dehydrataci a nezřídka končí smrtí jedince (Bjerneby et al. 1991b; Gibson et al. 1983; Mair et al. 1990; Snyder et al. 1978). Inkubační doba trvá nejčastěji 3–7 dní a klinické příznaky obvykle přetrvávají 5–14 dní (Mayhew et Greiner 1986) u starších hříbat ve věku 3–6 měsíců může průjem přejít do chronického stavu a přetrvávat až do věku 9–12 měsíců (Mair et al. 2009).



### 3.1.6 Terapie

Zatím nebyla vyvinuta specifická a účinná terapie proti kryptosporidiím. Žádný přípravek nebyl do současné doby nikdy zkoušen u hříbat ani dospělých koní (Cohen 2002). U lidí se k potlačení klinických příznaků používá paromycin, nitazoxanide a azithromycin (Farthing 2006; Gargala 2008). Využití nitazoxanidu v terapii a profylaxi kryptosporidiózou postižených telat však neukázalo pozitivní efekt jak ve zmírnění klinických příznaků, tak i v počtu uvolňovaných oocyst (Schnyder et al. 2008) narozdíl od halofuginonu, kdy byl prokázán pozitivní efekt na zmírnění klinických příznaků kryptosporidiózy telat (de Waele et al. 2010; Keidel et Dauschies 2013; Klein 2008; Trotz-Williams et al. 2011), ale pouze v nižších dávkách léčiva. Při vyšším dávkování než 500 µg/kg byly zaznamenány vedlejší účinky terapie jako nechutenství, vodnatý průjem a hubnutí (Villacorta et al. 1991). Poslední studie ukazují, že využití halofuginonu zmírňuje průjem a redukuje uvolňování oocyst kryptosporidií, ale neposkytuje komplexní terapeutický efekt (Delafosse et al. 2015; Silverlas et al. 2009). Terapie je proto zaměřena na rehydrataci a iontovou rovnováhu organismu. U imunokompetentních jedinců dochází většinou k samovyléčení, tzv. „self-cure“ (Chappel et al. 1999; Xiao et al. 2004).

### 3.1.7 Hostitelská specifita

Hostitelská specifita parazita představuje soubor hostitelů, které parazit infikuje a je v nich schopen ukončit svůj vývojový cyklus. Pro ověření hostitelského spektra jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií se využívají oocysty získané z jednoho přirozeně infikovaného hostitele a jejich experimentální přenos na další hostitelské druhy. Pokud je v novém hostiteli dokončen vývojový cyklus a oocysty vylučované do prostředí jsou geneticky shodné s těmi, které byly použity pro infekci, je hostitelské spektrum rozšířeno. Obecně se předpokládá, že izoláty kryptosporidií z jedné třídy obratlovců nejsou infekční pro hostitele z dalších tříd a také, že většina druhů a genotypů kryptosporidií má úzkou hostitelskou specifitu. Nicméně existuje celá řada případů, kdy byla prokázána přítomnost oocyst u hostitelů, kteří jsou pro jednotlivé druhy/genotypy kryptosporidií netypičtí (Fayer et Xiao 2008).

Některé druhy kryptosporidií infikují široké spektrum hostitelů (*C. parvum* nebo *C. ubiquitum*), zatímco jiné jsou přísně orientovány na hlodavce, přežvýkavce nebo ptáky obecně (*C. baileyi* (kuře), *C. meleagridis* (krůta), *C. muris* (myš)); existují ale i druhy infikující pouze jediného hostitele. Mezi tyto druhy kryptosporidií s přísnou hostitelskou specifitou patří například *C. wrairi* (morče).

*Cryptosporidium* horse genotype je v současné době považován za hostitelsky specifický pro koně. Kromě koní byl ale detekován také u dvou lidí nezávisle na sobě v Anglii (Robinson et al. 2008) a Novém Mexiku (Xiao et al. 2009). Jednalo se o stejný genotyp, ale odlišnou alelickou rodinu IXb, než byla identifikována u koní. Tato stejná alelická rodina IXb byla nedávno detekována u ježka (*Atelerix albiventris*; Abe et Matsubara 2015). Na základě dnešních znalostí nelze plně posoudit, zda se jednalo o pasáž či jsou lidé opravdu vnímaví k tomuto druhu kryptosporidií. Další druhy a genotypy kryptosporidií detekované u koní jsou podrobně popsány v kapitole 3.1.10.

### **3.1.8 Zoonotický potenciál kryptosporidií**

Druhy kryptosporidií jako *C. baileyi*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* a *C. muris* jsou výhradně orientovány na své hostitele, ale současně bylo prokázáno, že mají schopnost infikovat i člověka, a proto jsou považovány za zoonotické druhy (Tabulka 1; Caccio et al. 2002; Ditrich et al. 1991; Guyot et al. 2001; Pedraza-Diaz et al. 2000, 2001a; Xiao et al. 2001a). Izolát *C. hominis* identifikovaný u vodního savce dugonga indického (*Dugong dugon*) vyvrátil teorii, že je *C. hominis* schopný infikovat pouze lidi, a proto se rovněž řadí mezi kryptosporidie se zoonotickým potenciálem (Morgan et al. 2000). Navíc, v rámci experimentálních pokusů bylo zjištěno, že *C. hominis* může infikovat jehňata, gnotobiotická prasata a telata, ale není infekční pro imunosuprimované myši (Akiyoshi et al. 2002; Giles et al. 2001; Pereira et al. 2002; Widmer et al. 2000).

**Tabulka 1.** Přehled druhů kryptosporidií infekčních pro člověka

<b>Druh/genotyp</b>	<b>Riziko přenosu</b>	<b>Zdroj infekce</b>
<i>C. hominis</i> §	Vysoké	člověk
<i>C. parvum</i> §	Vysoké	tele a člověk
<i>C. canis</i>	Střední/vysoké	pes
<i>C. felis</i>	Střední/vysoké	kočka
<i>C. meleagridis</i> §	Střední/vysoké*	krocan
<i>C. viatorum</i>	Střední/vysoké*	člověk <sup>#</sup>
<i>C. andersoni</i>	Nízké	skot
<i>C. cuniculus</i> §	Nízké	králík, člověk
<i>C. fayeri</i>	Nízké	klokan
<i>C. muris</i> §	Nízké	hlodavci
<i>C. scrofarum</i>	Nízké	prasata
<i>C. suis</i>	Nízké	prasata
<i>C. tyzzeri</i> §	Nízké	hlodavci
<i>C. ubiquitum</i> §	Nízké	přežvýkavci
<i>C. wrairi</i>	Nízké	morče
<i>Cryptosporidium</i> chipmunk genotype	Nízké	čipmank
<i>Cryptosporidium</i> horse genotype	Nízké	kůň
<i>Cryptosporidium</i> monkey genotype	Nízké	opice
<i>Cryptosporidium</i> skunk genotype	Nízké	skunk

\*závislé na geografické poloze; § druhy/genotypy infekční pro laboratorní myši; # přirozený zdroj infekce není znám (upraveno dle Ortega et Kváč 2013)

### 3.1.9 Prevalence kryptosporidií u koní

Z mnoha studií vyplývá, že hříbata a mladí koně jsou více infikováni kryptosporidiiemi oproti koním starším (Burton et al. 2010; Perucci et al. 2011; Veronesi et al. 2010). Prevalence se liší v závislosti na použité technice zpracování vzorků (PCR vs. mikroskopické vyšetření) v rozmezí 1–31 % (e.g. de Souza et al. 2009; Laatanma et al. 2013, 2015; Mahdi et Ali 2002; Majewska et al. 1999; Veronesi et al. 2010; Wagnerová et al. 2015; Xiao et Herd 1994a). Dříve provedené studie prokázaly prevalenci u hříbat na základě pouze mikroskopického vyšetření mnohem vyšší dosahující 17–100 % (Coleman et al. 1989; Olson et al. 1997; Snyder et al. 1978; Xiao et Herd 1994a). Prevalence v populacích koní a oslů v jednotlivých zemích jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tabulka 2. Prevalence u koní a oslů v jednotlivých zemích Světa**

Oblast	Počet koní	Skupina	Prevalence (%)	Citace
Virginia, USA	90	Dospělí koně	27	Wagnerová et al. 2015
New York, USA	175	Hříbata (1–10 týdnů)	2,5	Burton et al. 2010
New York, USA	174	Klisny	0–2,1	Burton et al. 2010
Sierra Nevada, USA	305	Dospělí koně	0–2,3	Atwill et al. 2000
Texas, USA	366	Dospělí koně	0–10,4	Cole et al. 1998
Texas, USA	40	Hříbata (10–21 dní)	1–15	Cole et al. 1998
Kalifornie, USA	90	Dospělí koně	0–3,2	Johnson et al. 1997
Kentucky, USA	74	Koně starší 1 roku	1,3	Xiao et Herd 1994
Kentucky, USA	50	Odstávkata	18	Xiao et Herd 1994
Ohio, USA	42	Koně starší 1 roku	0	Xiao et Herd 1994
Ohio, USA	55	Odstávkata	10,9	Xiao et Herd 1994
Louisiana, USA	57	Hříbata	14	Coleman et al. 1989
Alberta, Kanada	10	Dospělí koně	10	Olson et al. 1997
Alberta, Kanada	24	Hříbata mladší 6 měsíců	21	Olson et al. 1997
ČR, EU	172	Koně mladší 3 let	2,9	Wagnerová et al. 2015
ČR, EU	180	Koně starší 3 let	3,9	Wagnerová et al. 2015
Itálie, EU	90	Hříbata (0–8 týdnů)	4,4	Veronesi et al. 2010
Itálie, EU	30	Hříbata mladší 8 týdnů	23,3	Veronesi et al. 2010
Itálie, EU	30	Klisny	3,3	Veronesi et al. 2010
Polsko, EU	318	Dospělí koně	3,5	Majewska et al. 2004
Warwickshire, UK	80	Dospělí koně	6,4	Sturdee et al. 2003
Brazílie	396	Dospělí koně	0,8	De Souza et al. 2009
Irák	25	Dospělí koně	12	Mahdi et Ali 2002
Alžír	481	Dospělí koně a osli	2,3	Laatamna et al. 2013, 2015

upraveno dle Burton et al. 2010; Laatamna 2013, 2015; Wagnerová et al. 2015

### 3.1.10 Druhy a genotypy infikující koně

Na základě dnešních znalostí, ke kterým výrazně přispěla i tato práce, lze říct, že koně jsou vnímaví k šesti různým druhům kryptosporidií a to *C. parvum* (Chalmers et al. 2005; Grinberg et al. 2008, 2009; Guo et al. 2014; Imhasly et al. 2009; Veronesi et al. 2010; Wagnerová et al. 2015), *C. muris* (Laatamna et al. 2015; Wagnerová et al. 2015), *C. erinacei* (Laatamna et al. 2013), *C. hominis* (Laatamna et al. 2015), *C. tyzzeri* (Laatamna et al. 2015), *C. felis* (Guo et al. 2014) a jednomu genotypu, konkrétně *Cryptosporidium* horse genotype (Burton et al. 2010; Caffara et al. 2013; Ryan et al. 2003; Wagnerová et al. 2015) V případě *C. muris* byly identifikovány dva kmeny i) RN66 (Wagnerová et al. 2015) a ii) TS03 (Laatamna et al. 2015).

### 3.1.9.1 *Cryptosporidium parvum*

*Cryptosporidium parvum* bylo dlouho považováno za jediný druh kryptosporidie způsobující kryptosporidiózu u koní, současně patří mezi nejrozšířenější kryptosporidie s nejnižší hostitelskou specifitou. *Cryptosporidium parvum* je infekční zejména pro neonatální zvířata. Infekce se projevuje především u telat do věku 8 týdnů (Langkjaer et al. 2007). U koní, z toho převážně u hříbat, byl jeho výskyt popsán v Itálii (Veronesi et al. 2010), na Novém Zélandu (Grinberg et al. 2009), v Německu (Imhasly et al. 2009), ve Walesu (Chalmers et Giles 2010) a České republice (Ryan et al. 2003; Wagnerová et al. 2015). Výsledky těchto studií jasně prokazují vztah mezi výskytem kryptosporidií a věkem koní, kdy mladí koně jsou infikováni častěji než starší jedinci.

*Cryptosporidium parvum* se dle subtypizace na lokusu kódujícím 60kDA glykoprotein (gp60) dělí na několik alelických rodin (IIa–IIo), z nichž pouze 3 (IIa, IIc a IId) jsou celosvětově rozšířené. Alely IIa a IId patří mezi nejrozšířenější (Xiao 2010) a byly detekovány jak u zvířat, tak i u člověka. Naopak alelická rodina IIc (dříve známá jako Ic), má pouze antroponotický charakter (Alves et al. 2003; Xiao et Feng 2008), přestože byl popsán ojedinělý výskyt u ježků (Dyachenko et al. 2010). Některé z rodin jako IIb a IIe-k jsou považovány za vzácné. V evropských zemích je dominantní rodinou převážně u skotu rodina IIa a pouze příležitostně je detekována i rodina IId (Xiao 2010), zatímco v Číně, Egyptě, Malaysii a Švédsku převládá rodina IId (Amer et al. 2013; Muhid et al. 2011; Silverlas et al. 2013; Wang et al. 2011).

Za nejčastěji se vyskytující subtyp *C. parvum* v mnoha zemích světa je považován subtyp IIaA15G2R1 známý jako IOWA izolát. Subtyp IIaA15G2R1 byl identifikován u telat a lidí v USA (Strong et al. 2000), Kanadě (Trotz-Williams et al. 2006), Portugalsku (Alves et al. 2003, 2006), Slovinsku (Stantic-Pavlinic et al. 2003), Austrálii (Chalmers et al. 2005) a Japonsku (Wu et al. 2003). U koní byl tento subtyp poprvé detekován u hřebce v České republice (Wagnerová et al. 2015) a chincoteque poníků ve Virginii, USA (Wagnerová et al. 2015).

### 3.1.9.2 *Cryptosporidium* horse genotype

První zmínka o výskytu *Cryptosporidium* horse genotype pochází z roku 2003, kdy Ryan et al. identifikovali tento genotyp u hřiběte koně Převalského v Pražské Zoo (Ryan et al. 2003). Shodný genotyp byl nalezen u hřiběte z New Yorku (Burton et al. 2010), Itálie (Caffara et al. 2013) a hřebce z České republiky (Wagnerová et al. 2015). Izolát *Cryptosporidium* horse genotype nalezený v České republice a zařazený na základě sekvence genu kódujícího gp60 do alelické rodiny VIa a subtypu A15G4 byl identický s izolátem z hřiběte v Itálii (Caffara et al. 2013). Oproti tomu odlišná alelická rodina IVb *Cryptosporidium* horse genotype byla identifikována u dvou lidí z Anglie (Robinson et al. 2008) a Mexika (Xiao et al. 2009). U obou lidí byl detekován identický subtyp VIbA13 (Robinson et al. 2008; Xiao et al. 2009). Tento naprosto stejný subtyp byl později detekován u ježka (*Atelerix albiventris*) v Japonsku (Abe et Matsubara 2015).

### 3.1.9.3 *Cryptosporidium muris*

*Cryptosporidium muris* je známo svou hostitelskou specifitou k některým hlodavcům a přežvýkavcům. Vzhledem k tomu, že bylo detekováno i u lidí, je považováno za zoonotické agens (Xiao et al. 2001a). Předchozí studie ukázaly, že druh *C. muris* je schopný infikovat široké spektrum myšovitých zahrnující myšici křovinnou (*Apodemus sylvaticus*; Torres et al. 2000), myšici východní (*Apodemus speciosus*; Murakoshi et al. 2013), potkana ostrovního (*Rattus exulans*; Ng-Hublin et al. 2013) a myš domácí (*Mus musculus*; Chalmers et al. 1994) a řadu dalších savců včetně koček (Pavlásek et Ryan 2007), křečků zlatých (Ryan et al. 2003), veverek (Hůrková et al. 2003) a tuleňů kroužkovaných (Santín et al. 2005). Vnímavost prasat k tomuto druhu byla experimentálně vyvrácena (Kváč et al. 2012). Kmen RN66 izolovaný z potkana je infekční pro myši, morčata, králíky, psy a kočky (Iseki et al. 1989), ale není schopen infikovat jehňata a kůzlata (Kváč et al. 2008).

V rámci koňovitých byly přirozené infekce prokázány v ojedinělých případech u koní a oslů v Alžíru (Laatamna et al. 2015) a u koní v České republice (Wagnerová et al. 2015).

### 3.1.9.4 *Cryptosporidium hominis*

*Cryptosporidium hominis* způsobuje kryptosporidiónu celosvětově především u lidské populace (Xiao et Ryan 2004). Dle subtypizace na genu kódujícím gp60 má *C. hominis* 6 majoritních alelických rodin - Ia, Ib, Id, Ie, If a Ig (Xiao 2010), z nichž jsou 4 (Ia, Ib, Id a Ie) velmi rozšířeny v rozvojových zemích. Nicméně jejich distribuce do značné míry závisí na geografické poloze. Všechny tyto 4 rodiny byly detekovány u dětí a HIV+ pacientů v Peru, Malawi, Madagaskaru a Indii (Ajjampur et al. 2007; Areeshi et al. 2008; Cama et al. 2007a, 2008; Gatei et al. 2007; Peng et al. 2003). U dětí v Jižní Africe byla zaznamenána rodina If (Leav et al. 2002). Nejvíce rozšířenou rodinou na Jamaice u HIV+ pacientů byla rodina Ib (Gatei et al. 2008).

Narozdíl od *C. parvum* byl *C. hominis* dlouhou dobu považován za neinfekční pro myši, potkany, kočky, psy a imunosuprimované pískomily (Akiyoshi et al. 2002). Později byly ale příležitostně přirozené infekce tímto druhem pozorovány u dugonga, koz a skotu. Následně byl prokázán experimentální přenos infekce s využitím vyšší infekční dávky na pískomily, telata, jehňata a selata (Akiyoshi et al. 2002; Baishanbo et al. 2005; Ebeid et al. 2003; Morgan et al. 2000; Park et al. 2006; Smith et al. 2005b).

V současné době byla přirozená infekce *C. hominis* zachycena pouze u jednoho koně z provincie Tiaret v Alžíru. Jednalo se o zcela novou alelickou rodinu Ik a konkrétní subtyp IkA15G1 (Laatamna et al. 2015).

### 3.1.9.5 *Cryptosporidium erinacei*

Druh *C. erinacei* (dříve známý jako *Cryptosporidium* hedgehog genotype) je považován za vysoce hostitelsky specifický (Kváč et al. 2014a). Nicméně kromě původních ježčích hostitelů byl tento druh v ojedinělých případech detekován u člověka v České republice (Kváč et al. 2014b) a u koně v Alžíru (Laatamna et al. 2013). Narozdíl od původních hostitelů (ježků) není patogenita tohoto genotypu pro koně jasná (Laatamna et al. 2013). Spojitost mezi průjmovým onemocněním a infekcí *C. erinacei* nebyla u ježků a koní prokázána (Graczyk et al. 1998; Laatamna et al. 2013; Meredith et Milne 2009; Pantchev et Moller 2007). Naopak gastroenteritida, provázená velkými

bolestmi břicha a průjmem, způsobená tímto druhem kryptosporidie, byla popsána u imunokompetentního člověka v České republice (Kváč et al. 2014b).

#### **3.1.9.6 *Cryptosporidium tyzzeri***

*Cryptosporidium tyzzeri* (dříve známo jako *Cryptosporidium mouse* genotype I) infikuje zejména myš domácí a ostatní hlodavce (Bajer et al. 2003; Feng et al. 2011a; Foo et al. 2007; Lv et al. 2009; Morgan et al. 1999). Ve studii Ren et al. (2012) nebyla tato kryptosporidie infekční pro telata a jehňata. V jiné studii byl ale výskyt *C. tyzzeri* molekulárními metodami potvrzen u bizona amerického (*Bison bison*; Alves et al. 2005). Prasata, několik druhů savců i ptáků v Číně bylo také infikováno tímto druhem (Chen et Huang 2007; Karanis et al. 2007), rovněž byl výskyt oocyst nalezen v odpadních nádržích na prasečí kejdu (Jenkins et al. 2010). Pozdější studie, kterou provedl Kváč et al. (2012), vyvrátila všechny předchozí závěry. Na základě experimentálního pokusu bylo prokázáno, že *C. tyzzeri* není infekční pro prasata, tudíž ve dříve uveřejněných publikacích se vždy jednalo pouze o pasáž parazita zaživacím traktem nebo znečištění odpadní vody oocystami kontaminovaným trusem od hlodavců. Co se týká koní, bylo *C. tyzzeri* detekováno u plemenného hřebce z píseckého hřebčína v České republice (Wagnerová et al. 2015). Infektivita tohoto druhu kryptosporidie je pro koně vzhledem k ojedinělému výskytu nejasná.

#### **3.1.9.7 *Cryptosporidium felis***

Přestože *Cryptosporidium felis* je výhradně orientováno na svého hostitele (kočka), bylo v jednom případě nalezeno u koně na Taiwanu (Guo et al. 2014) a u dospělého skotu ve Španělsku (Cardona et al. 2015).



## 3.2 Mikrosporidie a mikrosporidióza koní

### 3.2.1 Historie

Poprvé byly mikrosporidie (*Nosema bombycis*) identifikovány u housenky bource morušového v roce 1857 (Nägeli 1857). První mikrosporidii popsanou u savců byl *Encephalitozoon cuniculi*, izolovaný z mozku, míchy a ledvin králíka s motorickou parézou v roce 1922 (Wright et Craighead 1922). Dnes je tento druh známý u širokého spektra hostitelů. V roce 1959 byly poprvé popsány infekce mikrosporidií u lidí (Matsubayashi et al. 1959). Jednalo se spíše o vzácné případy. Od poloviny sedmdesátých let však dramaticky vzrostl počet identifikovaných infekcí u imunodeficitních jedinců postižených virem HIV nebo s imunitou sníženou v důsledku používání imunosuprimujících léků (Weber et al. 1994). Mikrosporidiální infekce jsou v rostoucí míře diagnostikovány u lidí se záměrně potlačenou imunitou, kteří podstoupili orgánovou transplantaci, parazit rovněž vyvolává oční infekce u jinak zdravých osob (Carlson et al. 2004; Chan et al. 2003; Gamboa-Dominguez et al. 2003; Goetz et al. 2001; Lewis et al. 2003; Theng et al. 2001; Teachey et al. 2004).

Z dnes známých druhů mikrosporidií je 16 infekčních pro člověka (Didier et Weiss 2008). Domestikovaná zvířata bývají nejčastěji infikována 4 nejrozšířenějšími savčími druhy mikrosporidií a to – *E. bieneusi*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis* a *E. hellem*. Zvláště rozšířené jsou mikrosporidie u ryb a v hmyzí říši. Většina bezobratlých živočichů nebyla na přítomnost mikrosporidií vyšetřena (Keeling 2009).

Informací o výskytu mikrosporidií u koní je do současné doby stále velmi málo. Ojedinělý případ infekce *E. cuniculi* je dáván do souvislostí s aborty a placentitidami u klisen (Patterson-Kane et al. 2003; Szeredi et al. 2007; Van Rensburg et al. 1991). Přírozená infekce způsobená *E. bieneusi* byla poprvé identifikována u koní až v roce 2010 (Santín et al. 2010).

### 3.2.2 Taxonomie

V roce 1857 byly mikrosporidie zařazeny do uměle vytvořené skupiny hub - Schizomycetes. Později byly považovány za parazitickou odnož říše protistů (podtřída Cnidosporidia). Kvůli domnělé nepřítomnosti mitochondrií byly mikrosporidie popisovány jako prehistorický pozůstatek eukaryotické linie (Vossbrinck et al. 1986). Kmen Mikrospora, patřící do podříše Protozoa uvnitř říše Protista byl založen roku 1976 biologem Spraguem. Tento kmen byl později přejmenován na kmen Mikrosporidia, dle původního názvu z roku 1882. Kmen Mikrosporidia se dělí na dvě třídy Haplophasea (např. rody *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Pleistophora* a *Trachipleistophora*) a Diplophasea (např. rody *Brachiola*, *Nosema* a *Vittaforma*) podle počtu utvořených jader. Haplophasea obsahují jedno jádro a Diplophasea mají jádra dvě, tzv. diplokaryon (Sprague et al. 1992). V současné době jsou mikrosporidie řazeny do říše Fungi (Keeling 2003; Keeling et al. 2000) a je jich známo přibližně 1300 druhů patřících do 160 rodů (Choudhary et al. 2011; Lee et al. 2009).

### 3.2.3 Stavba buňky

Mikrosporidie nemají typický Golgiho aparát, peroxisomy a hydrogenosomy (Vávra et Larsson 1999). Dříve se předpokládalo, že neobsahují ani mitochondrie. Byl u nich však nalezen gen pro HSP70 (heat shock protein), což naznačuje, že se vyvinuly z předka, který mitochondrie měl (Peyretailade et al. 1998). Mikrosporidie mají typické eukaryotní jádro, hladké i drsné endoplazmatické retikulum, vnitrobuněčný membránový systém a cytoskelet. Přítomnost atypického Golgiho aparátu byla také prokázána (Vávra et Larsson 1999). Genom mikrosporidií je mnohem menší než u jiných eukaryot. V rámci celého kmene se u všech doposud genotypizovaných druhů pohybuje od 2,3 Mb do 19,5 Mb. Ve všech dalších vlastnostech jsou ale čistě eukaryotními organismy. Mají mnohočetné lineární chromosomy, telomery a dělení, které se podobá mitóze (Keeling et Fast 2002). Ribozomy mikrosporidií jsou prokaryontního typu (70S), sestávající z malé podjednotky 16S a velké podjednotky 23S rRNA (Cannig et Vávra 2000).

### 3.2.4 Vývojový cyklus mikrosporidií

Vývojový cyklus je přímý, skládající se ze tří fází - infekční, proliferativní a fáze sporogonie (Cali et Takvorian 1999) a může probíhat uvnitř parazitoforní vakuoly (např. *Encephalitozoon* spp.) nebo v cytoplasmě hostitelské buňky (např. *Enterocytozoon bieneusi*, *Nosema* spp.).

Po vniknutí spory do vhodného hostitele je sporoplasma injikována do hostitelské buňky. V novém hostiteli zahájí sporoplasma reprodukci končící produkcí spor. Nejdříve dochází k dozrávání sporoplasmy v meronta, který se po období růstu a jaderného dělení dále dělí na dceřiné buňky, merozoity. Meronti a merozoiti jsou morfologicky identičtí. Sekrece elektrodenzního materiálu na povrch plazmatické membrány je ultrastrukturálním znakem, že parazit vstoupil do sporogoniální fáze reprodukce. Buňky, které pokrývá elektrodenzní materiál, jsou klasifikovány jako sporonti. Sporogonie zahrnuje dělení sporontů a jejich dceřiných buněk, až dokud není vytvořen konečný produkt dělení: sporoblast. Sporoblast dozrává a mění se na sporu (Vávra et Larsson 1999). Některé mikrosporidie se vyvíjí přímo v cytoplasmě hostitelské buňky. Některé, jako například *Encephalitozoon cuniculi* a *Glugoides intestinalis*, prodělávají svůj vývoj v parazitoforní vakuole. Tato vakuola odděluje membránou cytoplasmu hostitelské buňky od mikrosporidie. Mechanismus, kterým mikrosporidie tuto vakuolu vytvářejí, není znám. V počátečních fázích vývoje se mikrosporidiová stádia nachází v těsné blízkosti membrány vakuoly. Během sporogonie se membrána začíná oddělovat od povrchu parazita a sporoblasty a spory leží již volně ve středu vakuoly (Franzen 2005; Vávra et Larsson 1999).

### 3.2.5 Infekce hostitelské buňky a přenos infekce

Rozeznáváme dva způsoby, kterými mikrosporidie pronikají do hostitelské buňky. Prvním způsobem je vystřelení pólové trubice. K vystřelení pólové trubice dochází za vhodných podmínek - změna pH, osmotického tlaku a iontových poměrů (Keohane et Weiss 1998). Přenos celé sporoplasmy trvá pouze 15–500 ms (Keeling et Fast 2002). Druhým ze způsobů je fagocytóza. Spora je fagocytována buňkou a fagozom s fagocytovanou sporou dospívá v lysozom.

K přenosu infekce dochází z jednoho hostitele na druhého, některé mikrosporidie mohou během svého vývoje vystřídat dva druhy hostitelů. Nejčastěji se zralá spora dostává do těla inhalací či s potravou obsahující spóry, např. nedostatečně tepelně upraveným masem. Infekce se přenáší také fekálně-orální a orálně-orální transmisí (Bryan et Schwartz 1999; Deplazes et al. 2000). U lišek, psů, primátů, hlodavců, koní a králíků byl zjištěn přenos transplacentárně (Didier et al. 1998, 2000; Snowden et al. 1998). Rovněž byl potvrzen přenos mikrosporidií na pacienty po orgánové transplantaci (Hocevar et al. 2014). Vzácně se může infekce přenášet přímým kontaktem, např. přes poranění (Canning et Lom 1986).

Velmi často mikrosporidie infikují epiteliální buňky vystýlající gastrointestinální a respirační trakt, ale mezi další možná místa patří i žlučník a žlučovyody, dvanáctník, močový měchýř, oko a řada dalších orgánů (Didier et al. 2000; Vávra et Larrson, 1999). Spóry mikrosporidií jsou běžně vylučovány do prostředí se stolicí, močí či respiračními sekrety.

Experimenty ukázaly, že spóry mikrosporidií zůstávají životaschopné nejenom ve vodě, ale i po vyschnutí a následované inkubaci v různých teplotách (Koudela et al. 1999).

### **3.2.6 Patogenita a klinické příznaky**

*Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon* spp. se řadí mezi oportunní patogeny, infekce propuká převážně u imunodeficientních pacientů, např. u lidí po transplantacích či u HIV pozitivních pacientů (Carlson et al. 2004) majících méně než 100 CD4+T buněk na 1 µl krve (Kotler et Orrenstein 1998, 1999). U imunokompetentních osob probíhá onemocnění většinou asymptomaticky. Průběh infekce do značné míry závisí na imunitním stavu hostitele. Klinické příznaky se obvykle objeví 2–3 týdny po infekci.

### 3.2.6.1 *Enterocytozoon bieneusi*

*Enterocytozoon bieneusi* je nejčastějším původcem lidských mikrosporidiových infekcí způsobující z 30–50 % chronické průjemy, které bývají doprovázeny horečkou, zimnicí, slabostí a hubnutím (Shadduck et Orenstein 1993). Lidská mikrosporidióza způsobená *E. bieneusi* byla diagnostikována ve všech obydlených částech světa. Prevalence parazita mezi pacienty s AIDS se ale postupně snižuje (Conteas et al. 1998). Důvodem je antiretrovirální léčba HIV, která má pozitivní vliv na funkci imunitního systému (Weber et al. 1999).

Infekce u imunokompetentních zvířat probíhá v naprosté většině případů bez klinických příznaků (Santín et Fayer 2011; Wagnerová et al. 2012). Ve studii Santín et al. (2010) a Wagnerová et al. (2012), kde byla prokázána přirozená infekce *E. bieneusi*, koně netrpěli žádnými viditelnými příznaky, které by vypovídaly o infekci.

### 3.2.6.2 *Encephalitozoon spp.*

Do rodu *Encephalitozoon* patří mimo jiné tyto morfologicky neodlišitelné druhy mikrosporidií: *E. cuniculi*, *E. hellem* a *E. intestinalis*. *Encephalitozoon cuniculi* patří mezi nejvíce prostudované savčí mikrosporidie, spontánní infekce byly dokumentovány u králíků, myší, potkanů, ondatery, morčat, křečků, rejšků, koz, ovcí, prasat, koní, psů, lišek, koček, různých druhů masožravců a primátů (Shadduck et Pakes 1971).

*Encephalitozoon cuniculi* způsobuje mozkovou encefalitidu a záněty ledvin u imunokompetentních králíků a potkanů (Wasson et Pepper 2000). U masožravců se vyskytuje u nenarozených mláďat v prenatalním vývoji, postihuje mozek, ledviny, játra a plíce (Szabo et Shadduck 1987).

V případě koní je výskyt *E. cuniculi* spojován s reprodukčními problémy klisen, objevují se placentitidy a aborty (Patterson-Kane et al. 2003; Van Rensburg et al. 1991). *Encephalitozoon cuniculi* byl detekován u abortovaných plodů plemene Clydesdale v Jihoafrické republice (Van Rensburg et al. 1991), Quarter horse v USA (Patterson-Kane et al. 2003) a Lipicán v Maďarsku (Szeredi et al. 2007). U klisny plemene Clydesdale nebyla placentitida zaznamenána (Van Rensburg et al. 1991), kdežto klisna plemene Quarter horse, která předčasně porodila v 9. měsíci gestace, měla rozsáhlý

zánět placenty (Patterson-Kane et al. 2003). Žádné klinické příznaky nebyly zaznamenány v případě experimentální infekce koní plemene minihorse způsobené *E. cuniculi* genotype II v České republice (Wagnerová et al. 2013), rovněž v případech přirozených infekcí (Wagnerová et al. 2012).

Ostatní mikrosporidie z rodu *Encephalitozoon* spp. nebyly u koní detekovány, tudíž patogenita ani klinické příznaky nejsou u těchto hostitelů známy. *Encephalitozoon hellem* je ze zvířecí říše znám svou orientací na ptačí druhy, u nichž způsobuje těžké enteritidy projevující se vysokou mortalitou (Black et al. 1997; Snowden et al. 2001), zatímco *E. intestinalis* byl mimojiné zaznamenán u volně žijících goril (Graczyk et al. 2002), skotu i prasat (Bornay-Llinares et al. 1998).

### 3.2.7 Terapie

Prvním přípravkem, který byl účinně využit k léčbě mikrosporidiózy byl fumagillin (Shadduck 1980). Léčba fumagillinem byla poprvé vyzkoušena u tří HIV-pozitivních pacientů s mikrosporidiální keratokonjunktivitou (Diesenhouse et al. 1993; Rosberger et al. 1993), rovněž se ukázal být účinný u imunokompromitovaných jedinců trpících chronickou infekcí *E. bieneusi*, avšak u 50 % z léčených pacientů byly pozorovány vedlejší efekty léčby jako neutropenie a trombocytopenie (Molina et al. 2002). Účinným terapeutikem se v poslední době zdá být albendazol s výrazným pozitivním efektem na potlačení infekce způsobené *E. cuniculi*. Nicméně výsledky studie Kotkové et al. (2013) ukazují, že účinnost léčby albendazolem závisí na stupni rozvinutí infekce u imunodeficitního hostitele, kdy ani včasná aplikace nemusí vždy vést k úplnému vyléčení.

V případě *E. bieneusi* byl prokázán pouze částečný terapeutický efekt albendazolu (Blanshard et al. 1992; Dieterich et al. 1994), v řadě případů však neměl absolutně žádný účinek (Leder et al. 1998). O něco úspěšněji se v léčbě *E. bieneusi* u HIV+ pacientů jeví využití nitaxozamidu (Bicart-seé et al. 2000).

Žádný ze zde uvedených přípravků nebyl doposud vyzkoušen pro léčbu mikrosporidiových infekcí u koní.

### 3.2.8 Zoonotický potenciál mikrosporidií

Spóry, respektive specifická DNA *E. bienersi*, byly kromě člověka detekovány u prasat, krav, lam, koz, králíků, koček, psů, primátů, šelem i koní, rovněž v okolním prostředí jako jsou povrchové vody, bazény nebo řeky (Coupe et al. 2006; Dowd et al. 1998; Fournier et al. 2000; Haro et al. 2006; Haro et al. 2005; Santín et al. 2004; Sparfel et al. 1997). Studie zabývající se genotypy *E. bienersi* poukazují na zoonotický potenciál tohoto druhu. Z více než 130 identifikovaných genotypů *E. bienersi* na základě variability v ITS regionu genu pro malou ribozomální podjednotku, bylo 34 genotypů nalezeno u lidí, 11 u lidí i zvířat, 12 u skotu, 11 u prasat a ostatní genotypy byly prohlášeny za specifické pro dané hostitele (Santín et al. 2011; Fayer et al. 2014). Za nejčastěji se vyskytující genotyp je považován *E. bienersi* genotype D, který byl nalezen u domestikovaných (Buckholt et al. 2002; Lee 2007, 2008; Sak et al. 2008; Santín et al. 2010), ale i volně žijících druhů zvířat (Sulaiman et al. 2003; Drosten et al. 2005; Muller et al. 2008). Ve studii Cama et al. (2007b) byl potvrzen přenos do té doby hostitelsky specifického genotypu *E. bienersi* Peru 16 z morčat na dítě. Dítě v době infekce trpělo průjmem, což poukazuje na to, že infekce *E. bienersi* může způsobovat gastrointestinální problémy u imunokompetentních jedinců.

V případě *E. cuniculi* rozlišujeme na základě molekulárních a imunologických metod čtyři genotypy: genotyp I - nalezen u králíků a lidí, genotyp II u myši a polárních lišek a genotyp III u psů a lidí (Didier et al. 1996). Pouze v jedné studii byl popsán i typ klasifikovaný jako genotyp IV u člověka, izolovaný z lidských ledvin po transplantaci (Talabani et al. 2010). Analýzou nukleotidových sekvencí genu pro PTP (polar tube protein) bylo 24 izolátů *E. hellem* rozděleno do čtyř genotypů (Xiao et al. 2001b). Později byl popsán další pátý genotyp. Na základě typu repetice se rozlišují dvě alelické rodiny: i) genotypy 1A, 1C a 1D a ii) genotypy 2B a 2C (Haro et al. 2003).

Všechny výše zmíněné druhy mikrosporidií mají antropozoonotický i zoonotický potenciál (Bryan et al. 1999; Deplazes et al. 2000; Didier 2005; Didier et al. 2004).

### **3.2.9 Hostitelská specifita**

#### **3.2.9.1 *Enterocytozoon bieneusi***

Z fylogenetických analýz vyplývá blízký vztah mezi zvířecími a lidskými izoláty v případě *E. bieneusi* (Sulaiman et al. 2003). K lepšímu porozumění příbuzenských vztahů mezi genotypy bylo využito fylogenetických analýz, které rozdělily genotypy *E. bieneusi* do 5 skupin. První nejpočetnější skupina obsahuje všechny popsané lidské izoláty kromě izolátu CAF4, řadícího se samostatně do 5. skupiny. Skupina 2, 3 a 4 se skládá pouze ze zvířecích izolátů (Thelier et Breton 2008). Hostitelsky specifická je potom skupina 4, kde se nachází pouze izoláty popsané u mývala (Sulaiman et al. 2003). Genotypy *E. bieneusi* Horse 2 a Horse 3, nalezené u koní v České republice (Wagnerová et al. 2012) vytváří samostatnou skupinu ve fylogenetickém stromě zkonstruovaném na základě celé ITS sekvence genotypů *E. bieneusi*. Podle dnešních znalostí je tudíž lze považovat za hostitelsky specifické pro koně. Hostitelskou specifitu vykazují dále 3 genotypy *E. bieneusi* - I, J a BEB4 identifikované pouze u dobytka (Rinder et al. 2000; Dengjel et al. 2001; Fayer et al. 2007).

#### **3.2.9.2 *Encephalitozoon spp.***

V případě *E. cuniculi* byl u koní nalezen genotyp I, II a III (Laatamna et al. 2015; Wagnerová et al. 2012). Všechny tyto genotypy se vyznačují hostitelskou nespecifitou (Didier et al. 1996; Kodjikian et al. 2005; Sokolova et al. 2011).

### **3.2.10 Prevalence mikrosporidií u koní**

V současné době existují pouze čtyři studie, kde je popsána prevalence *E. bieneusi* a *E. cuniculi* na základě molekulárních analýz, jedná se o data z Kolumbie, České republiky a Alžíru (Laatamna et al. 2015; Santín et al. 2010; Wagnerová et al. 2012, 2015). Existují ještě studie provedené na koních v Brazílii, Izraeli a USA, zabývající se testováním protilátek pomocí IFAT (Levkutova et al. 2004), přímého aglutinačního testu (Goodwin et al. 2006) nebo ELISA testu (Cray et al. 2014). Séropozitivita se pohybovala v rozmezí 4,8–80 % v závislosti na metodě.



U koní v České republice dosahovala prevalence v případě *E. bieneusi* 17,5 % a v případě *E. cuniculi* 6,9 % (Wagnerová et al. 2012). Oproti tomu v Alžíru byla celková prevalence nižší: 4,96 % u *E. bieneusi* a 1,75 % u *E. cuniculi*. Mikrosporidie *E. bieneusi* byla zaznamenána ve 3 regionech v Kolumbii o celkové prevalenci 10,8 % (Santín et al. 2010). Koně mladší jednoho roku dosahovali vyšších prevalencí oproti koním starším (Santín et al. 2010), zatímco v České republice a Alžíru nebyl vliv věku prokázán (Laatamna et al. 2015; Wagnerová et al. 2012).

### 3.2.11 Druhy a genotypy infikující koně a osly

Až v roce 2010 byla publikována první práce s pozitivními výsledky na *E. bieneusi* genotypu D, Horse 1 a Horse 2 u koní z Kolumbie, přičemž genotyp Horse 1 významně převažoval (Santín et al. 2010), zatímco u koní v České republice, kde byla zjištěna vysoká variabilita nalezených genotypů čítající i nové genotypy Horse 3–11, převládal na většině farem genotyp Horse 2 (Wagnerová et al. 2012). Ze zoonotických genotypů měli koně z českých chovů genotyp D, G, EpbA a WL15. U koní v Alžíru byly detekovány 4 genotypy *E. bieneusi* (Horse 1, Horse 2, D a CZ3; tabulka 3). V případě *E. cuniculi* byl v České republice nalezen genotyp I a II a byl popsán průběh infekce u experimentálních koní plemene minihorse způsobený infekcí *E. cuniculi* genotypem II (Wagnerová et al. 2012, 2013). *Encephalitozoon cuniculi* genotyp III byl poprvé identifikován u koně z Alžíru, narozdíl od populace oslů, kde byl nalezen pouze genotyp II (Laatamna et al. 2015).

**Tabulka 3.** Genotypy *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon cuniculi* nalezené u koní a oslů

Země	Počet koní/oslů	Genotypy <i>E. cuniculi</i>	Genotypy <i>E. bieneusi</i>
Česká republika	377/0	EC I, EC II	Horse 1 - 11, D, G, Epba, WL15
Alžír	219/124	EC I, EC II, EC III	Horse 1, Horse 2, D, CZ3
Kolumbie	195		Horse 1, Horse 2, D

## 4. MATERIÁL A METODIKA

Materiál a metodika jednotlivých studií, které jsou nedílnou součástí této disertační práce, jsou uvedeny v kapitolách Materiál a metodika příslušných rukopisů na konci této práce. V následujícím textu jsou uvedeny veškeré metody používané při zpracování materiálu.

### 4.1 Materiál

Celkem bylo odebráno 1300 individuálních vzorků od koní a oslů z různých chovů v České republice (n=648), Polsku (n=81), Alžíru (n=481) a divokých koní ze Severní Ameriky (n=90). Na přítomnost mikrosporidií *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon cuniculi* bylo vyšetřeno 891 vzorků, 923 vzorků bylo použito na zjištění výskytu kryptosporidií (Tabulka 4).

**Tabulka 4.** Přehled počtu vyšetřených koní a oslů na kryptosporidie nebo mikrosporidie v jednotlivých chovech nebo lokalitách

Země	Počet chovů/lokalit	Technologie	Počet koní/oslů	Vyšetřeno na přítomnost		
				<i>E. bieneusi</i>	<i>Encephalitozoon</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.
Česká republika	5/0	stáj	94/0			
	10/0	pastva	122/0	ANO	ANO	NE
	10/0	kombinace	161/0			
<b>Celkem</b>	<b>25/0</b>		<b>377/0</b>			
Česká republika	4/0	stáj	49/0			
	7/0	pastva	61/0	NE	NE	ANO
	9/0	kombinace	161/0			
<b>Celkem</b>	<b>20/0</b>		<b>271/0</b>			
Polsko	3/0	kombinace	81/0	ANO	ANO	ANO
Severní Amerika	0/3	*	90/0	ANO	ANO	ANO
Alžír	6/0	kombinace	0/38			
	2/0	kombinace	138/0			
	9/0	kombinace	174/0	ANO	ANO	ANO
	9/0	kombinace	45/86			
<b>Celkem</b>	<b>26</b>		<b>357/124</b>			
	<b>74/3</b>		<b>1176/124</b>			

\* divocí koně ve volné přírodě

Do studie v České republice a Polsku bylo celkem zahrnuto 45 chovů z Čech a 3 chovy z Polska. Chovy využívaly různé technologie ustájení - podrobný popis v **publikaci I** a **IV**. Co se týče Alžíru, vzorky byly získávány z jednoho z největších chovů arabských plnokrevníků ležícím v provincii Tiaret a dále ze soukromého chovu čítajícího přibližně 50 koní plemene arabského plnokrevníka, berberského koně a anglického plnokrevníka (**publikace III**). Dále byla provedena komplexní studie z Alžíru, kam bylo zahrnuto 15 farem zabývajících se chovem oslů a 18 koňských farem (**publikace V**).

V Severní Americe bylo odebráno 90 vzorků divokých koní ze třech lokalit - Oregon, Severní Dakota a Assateague Island Maryland-Virginia. Celkem 50 vzorků bylo získáno z volně žijících Chincotengue poníků na Assateague Island. Plemeno Chincoteque pony bylo oficiálně registrováno v roce 1994. V národním parku Theodor Roosevelt v Severní Dakotě a oblasti v Oregonu bylo odebráno 40 vzorků mustangů (**publikace VI**).

K experimentálnímu pokusu pro zjištění průběhu experimentální infekce způsobené *E. cuniculi* genotype II bylo využito devět koní plemene minihorse ve věku jednoho roku (**publikace II**).

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Mikroskopická diagnostika oocyst kryptosporidií

Odebrané vzorky trusu koní byly mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií pomocí barvení anilin-karbol-methylvioletí dle Miláčka a Vítovce (1985).

#### Zásobní roztoky:

- roztok anilin-karbol-methylvioletí

0,6 g methylvioletí

1 ml anilinu

1 g fenolu

30 ml ethanolu

70 ml deionizované vody

- 2% roztok kyseliny sírové
- 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

#### **Pracovní postup:**

Na podložní sklo natřít tenkou vrstvou trusu, nechat zaschnout a fixovat methanolem v plameni (sklo ponořit do methanolu a po vyjmutí zapálit). Podložní sklo s nátěrem barvit 30 minut roztokem anilin-karbol-methylvioletí. Takto obarvený preparát opláchnout vodou a po dobu 2 minut diferencovat 2% kyselinou sírovou. Sklíčko opláchnout pod tekoucí vodou a 3–5 minut dobarvovat v roztoku tartrazinu. Znovu opláchnout preparát slabým proudem tekoucí vody, osušit a prohlížet světelným mikroskopem za použití imerzního oleje při zvětšení 1000×.

Oocysty kryptosporidií se barví modrofialově na žlutém pozadí.

## 4.2.2 Experimentální infekce

### 4.2.2.1 Zdroj spor pro experimentální infekci

Byly použity spory *E. cuniculi* kmene EC2 původně izolovaného Koudelou et al. (1994) z dexamethazonem imunosuprimované myši, které byly kultivovány v buňkách opičích ledvin Vero E6 v termostatu při teplotě 37 °C v kompletním kultivačním médiu RPMI-1640 Hepesmodification (hepes 25 mM, Sigma) s přidavkem 2,5% bovinního fetálního séra (Bofes, ZVOS Hustopeče), směsi 1% antimykotik a antibiotik (Sigma) (100 UI penicilinu; 10 µg streptomycinu; 0,25 µg amfotericinu B/ml média), 0,3% gentamycinu (30 µg/ml RPMI) a neesenciálních 1% aminokyselin (SEVAC, Praha). Adherované infikované buňky byly uvolněny pomocí skleněné tyčinky. V deionizované vodě došlo k plasmolýze buněk a jejich centrifugací (20 minut při 1370 g) byl získán sediment se spory, který byl uchováván v pufru PBS s obsahem antibiotik a antimykotik (100 UI penicillin, 10 µg/ml streptomycin, 0.25/ml µg amphotericin a 30 µg/ml gentamicin) v chladničce při 4 °C.

### 4.2.2.2 Experimentální zvířata

Bylo vybráno 9 koní (8 hřebců a jedna klisna) plemene minihorse bez prokazatelného původu a tudíž nevhodných k chovu. Tato zvířata byla využita pro jejich malý tělesný rámec a nízkou živou hmotnost (50 až 70 kg), která souvisí s nízkou spotřebou krmiva a snadnou manipulací. Před začátkem pokusu byli koně ošetřeni anthelmintikem s účinnou látkou ivermectin. Ustájení byli ve společné stáji s denním přistýláním slámou a měli k dispozici seno a vodu *ad libitum*. Jako kontrolní zvířata byla vybrána skupina 8-týdenních SCID myší. Myši byly chovány za standardních podmínek ve sterilním prostředí v IVC (Air Handling Solutions; Tecnoplast, Italy) s HEPA filtry ve zvěřinci BC AVČR, v.v.i. v Českých Budějovicích. Byly krmeny sterilní komerční směsí (TOP – VELAZ Praha) a napájeny sterilní vodou *ad libitum*.

### 4.2.2.3 Infekce experimentálních zvířat

Koním byla z vény jugularis odebrána krev na test protilátek proti mikrosporidiím rodu *Encephalitozoon* před pokusem a zároveň byly získány vzorky trusu a molekulárně

vyšetřeny na přítomnost mikrosporidií. Na základě negativních výsledků vyšetření byli koně postupně perorálně infikováni mikrosporidiiemi *E. cuniculi* genotyp II v dávce  $1 \times 10^7$  spor ve 20 ml destilované vody pomocí injekční stříkačky. Rovněž SCID myši byly perorálně infikovány mikrosporidiiemi *E. cuniculi* v dávce  $1 \times 10^7$  spor v 0,2 ml vody na myš pomocí jícnové sondy.

Následně proběhla porážka na jatkách v případě koní a utracení pokusných myší a to 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 a 63 dní po infekci a odběr vzorků různých orgánů a tkání. Pomocí molekulárních metod, popsanych na následujících stranách v kapitole 4.2.2.4–4.2.2.10, byla sledována dynamika šíření mikrosporidiové infekce.

#### **4.2.2.4 Odběr vzorků orgánů a tkání**

Po usmrcení zvířat byly odebrány vzorky žaludku, duodena, jejunu, ilea, céca, kolonu, sleziny, jater, ledvin, močového měchýře, srdce, plic a mozku. Každému koni byla odebrána krev před vykrvením z vény jugularis, moč a trus. Jednotlivým myším byla odebrána krev z retroorbitálního sinu, moč a trus. Aby bylo zabráněno kontaminaci vzorků, byla na každý orgán zvlášť použita jedna sada pitevních nástrojů, která byla předem vysterilněna autoklávováním při 125 °C a následně UV světlem o vlnové délce 254 nm (Uvilink CL 508, UVITEC, UK).

#### **4.2.2.5 Příprava histologických preparátů**

Vzorky výše uvedených tkání a orgánů byly fixovány v 10% formaldehydu a následně odvodněny ve vzestupné alkoholové řadě. Po odvodnění byl alkohol nahrazen xylenem. Po nasycení byly vzorky přeneseny do tekutého parafínu a nakonec zality do přefiltrovaného parafínu, z kterého byly zhotoveny bločky. Z bloček byly mikrotomem nakrájeny tenké 4–6 µm histologické řezy. Tyto řezy byly přeneseny na podložní sklička. Před barvením byly řezy odparafinovány v xylenu a sestupnou alkoholovou řadou převedeny do vody. Připravené řezy byly barveny pomocí hematoxylin-eosinu a modifikací Gramova barvení (Brown et Brenn 1931). Nabarvené řezy byly zality do kanadského balzámu a prohlíženy světelným mikroskopem.

#### 4.2.2.6 Barvení podle Brown-Brenna (modifikace Gramova barvení)

Při použití tohoto barvení jsou mikrosporidie tmavofialové, grampozitivní bakterie modré, gramnegativní bakterie červené, jádra buněk červené a ostatní tkáňové komponenty žluté.

##### Příprava jednotlivých roztoků na barvení:

- 1% krystalová violet: 1 g ve 100 ml destilované vody
- 5% hydrogenuhličitan sodný: 5 g ve 100 ml destilované vody
- Gramův jodový roztok: jód 1 g, jodid draselný 2 g, 300 ml destilované vody
- nasycený roztok bazického fuchsinu: 0,25 g fuchsinu ve 100 ml destilované vody
- pracovní roztok fuchsinu: nasycený roztok ředěný vodou 1:1000
- 0,1% roztok kyseliny pikrové: 0,1 g kyseliny pikrové ve 100 ml acetonu

Na odparafinované řezy na podložním skle byl nanesen 1 ml krystalické violeti a 50  $\mu$ l hydrogenuhličitanu po dobu 1 minuty. Poté byla sklíčka opláchnuta vodou a ponořena do roztoku jódu na 1 minutu, následoval opětovný oplach vodou a odbarvení v roztoku aceton-ether 1:1, dokud se neodmyla modrá barva. K dobarvení byl využit roztok fuchsinu (1 minutu). Po opláchnutí vodou byla sklíčka ponořena do roztoku kyseliny pikrové s cílem odbarvit je do žlutavě růžové barvy. Poté byla sklíčka opláchnuta v acetonu a ve směsi aceton-xylen 1:1. V konečné fázi byly řezy projasněny oplachem ve třech lázních xylenů. Obarvené vzorky byly zakápnuty kanadským balzámem a překryty krycím sklíčkem. Vzorky byly prohlíženy světelným mikroskopem pod olejovou imerzí při zvětšení 1000 $\times$ .

#### **4.2.2.7 Barvení hematoxylin-eosinem**

Hematoxylin barví jaderný chromatin a ribosomy, eosin barví cytoplasmu a kolagenní vlákna. Jádra a bazofilní struktury jsou modré, ostatní části preparátu odstínovaně červené.

##### Příprava roztoků před barvením:

- eosin: 0,5 g eosin + 250 ml deionizované H<sub>2</sub>O + 10 ml kyseliny octové
- hematoxylin: 0,5 g hematoxylinu + 500 ml deionizované H<sub>2</sub>O + 25 g síranu hlinito-amonného + 0,1 g jodičnanu sodného + 20 ml kyseliny octové.

Odparafinované řezy na podložních sklech byly ponořeny do hematoxylinu na dobu 10 minut. Poté byly oplachovány pod tekoucí vodou (10 minut) a následně dobarveny v eosinu (5 minut), opláchnuty vodou a odvodněny pomocí vzestupné alkoholové řady: 70% ethanol – 80% ethanol – 96% ethanol – karboxylen – xylen – xylen – xylen. Nakonec byly řezy zakápnuty kanadským balzámem a překryty krycím sklíčkem. Vzorky byly prohlíženy světelným mikroskopem při zvětšení 1000× s využitím imerzního oleje.

#### **4.2.2.8 Barvení pomocí Calcofluoru White M2R (Vávra et Chalupský 1982)**

- 1% calcofluor
- 0,5% Evansova modř

Vzorky trusu byly fixovány methanolem. Následovalo barvení 1% Calcofluorem White M2R v PBS (fosfátový pufr, pH 7,2–7,4) po dobu 10 minut. Poté byl proveden oplach v PBS a dobarvení 0,5% Evansovou modří ve vodě po dobu 30 sekund. Podložní sklíčko bylo opět opláchnuto v PBS, zaschnutí probíhalo ve tmě. Vzorky byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX70) při zvětšení 1000× s využitím imerzního oleje při vlnové délce 490 nm. Obarvené spory mikrosporidií jsou pod mikroskopem oválné a svítí jasně modrobíle.



#### 4.2.2.9 Nepřímá ELISA - detekce specifických protilátek

Pomocí nepřímého ELISA testu byly stanovovány protilátky z vyšetřovaného séra. Bylo využito metody dle Hollister et Canning (1987). Sérum bylo získáno z krve centrifugací 2500 g po 10 minut a až do testování bylo skladováno při -20 °C. Spory *E. cuniculi* imobilizované v mikrotitrační desce byly inkubovány s ředěnými séry (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 a 1:512) s negativním (1:64) a pozitivním (1:256) kontrolním sérem získaným z přirozeně infikovaného koně. Po propláchnutí byla přidána 1:10000 ředěná peroxidásou značená králičí protilátka proti koňským IgG protilátkám (Rabbit Anti-Horse IgG Whole molecule, SIGMA). Barevná reakce byla vyvolána s využitím 0,1 M acetátového pufru (pH 5,5) s přídavkem 2,5 mM o-phenylendiaminu (OPD) a 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a zastavena pomocí 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Fotometrické měření intenzity barvy bylo prováděno při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce větší než 620 nm do 30 minut od přidání zastavovacího roztoku. Vzorky séra s titrem vyšším než 128 byly považovány za pozitivní na základě titru pozitivní a negativní kontroly.

#### 4.2.2.10 Izolace DNA z tkání

Extrakce DNA z tkání byla provedena pomocí komerčního kitu QIAamp® DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), který je určen pro čištění a izolaci DNA ze vzorků živočišných tkání a buněk, kvasinek a bakterií a podle níže uvedeného postupu.

Chemikálie izolačního kitu:

- ATL Buffer
- proteinase K
- 96% EtOH
- AL Buffer
- AW1 Buffer
- AW2 Buffer
- AE Buffer

### **Pracovní postup:**

Do mikrozkušavky nastříhat vzorek tkáně o velikosti 0,5 cm<sup>3</sup>, přidat skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) a 2–3 zirkoniové kuličky o velikosti 2 mm (Invitex, Germany). Poté připipetovat 180 µl ATL Bufferu (Tissue Lysis Buffer; QIAGEN) a rozbít v beadbeateru (FastPrep®-24, M.P. Biomedicals, CA, USA) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s. Následně centrifugovat vzorek 10 s při 14000 g, potom připipetovat 20 µl proteinase K a inkubovat v termobloku po dobu 10 minut při teplotě 56 °C. Po 10 minutách připipetovat 200 µl AL Bufferu a homogenizovat v centrifuze. V dalším kroku přidat 200 µl 96% EtOH a znovu homogenizovat. Vzniklý supernatant přenést do mini spin column, centrifugovat 1 minutu při 8000 g a odpad vylít ze sběrné zkumavky. Poté přidat AW1 buffer o objemu 500 µl, opět centrifugovat 1 minutu při 8000 rpm a odpad slít. Následně připipetovat 500 µl AW2 Buffer a vzorek ponechat v centrifuze 1 minutu při 14000 g odpad vylít ze sběrné zkumavky. V poslední fázi kolonu přendat na čistou mikrozkušavku, přidat 200 µl AE buffru přímo na střed kolony, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a dále centrifugovat 1 minutu při 8000 g. Získanou DNA uchovávat při - 20 °C.

#### **4.2.2.11 Izolace DNA z trusu**

Extrakce DNA z trusu byla provedena pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex) podle níže uvedeného postupu.

##### *Chemikálie izolačního kitu:*

- Lysis Buffer P
- proteinase K
- Binding Buffer P
- promývací pufry Wash I a Wash II
- Elution Buffer D

### **Pracovní postup:**

Čerstvý trus o množství 200 mg dát do Safe-Lock-Tube, přidat skleněné kuličky (BioSpec Products, Inc., USA) a 1,2 ml Lysis Buffer P. Rozbít 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s využitím homogenizátoru Fast Prep 24 Instrument (MP BIOMEDICALS, USA). Inkubovat 10 minut při teplotě 95 °C v inkubačním termobloku. Po 10 minutách centrifugovat 1 minutu rychlostí 14 000 g. Přenést veškerý supernatant do InviAdsorb-Tube, 15 sekund vortexovat, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat po dobu 3 minut při rychlosti 14 000 g. Supernatant přepipetovat do čistých ependorfeč, centrifugovat 3 minuty při rychlosti 14 000 g. Do čistých mikrozkušavek napipetovat 25 µl proteinase K a přidat 400 µl supernatantu, zhomogenizovat. Inkubovat 10 minut při 70 °C. Poté připipetovat 400 µl Binding Buffer P, zhomogenizovat. Přepipetovat veškerý objem na kolonu Spin Filter + Tube (kolona se sběrnou mikrozkušavkou), inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g. V další fázi vylít odpad ze sběrné mikrozkušavky, napipetovat 500 µl Wash I na kolonu, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g. Vylít odpad ze sběrné mikrozkušavky, napipetovat 800 µl Wash II na kolonu, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g. Vylít odpad a znovu centrifugovat 3 minuty/14 000 g. V konečné fázi na čistou ependorfečku dát kolonu, napipetovat 200 µl předehřátého Elution Buffer D (70 °C) na kolonu, inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g. Získaná DNA byla uchovávána při - 20 °C.

### **4.2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Z vyizolované DNA byla provedena amplifikace části různých genů dle povahy studie.

Kryptosporidie byly genotypovány na genech kódujících malou ribozomální podjednotku (Jiang et al. 2005), 60 kDa glykoprotein (gp60) (Alves et al. 2003), *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP; Pedraza et al. 2001b; Spano et al. 1997), Thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1; Spano et al. 1998), Heat shock protein (HSP70; Sulaiman et al. 2000) a 4 minisatelitní markery - MS1, MS2, MS3 a MS4 (Feng et al. 2011b).

Pro genotypizaci mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* byl použit nested PCR protokol amplifikující 3' konec z SSU rRNA genu (malá ribozomální podjednotka), ITS (internal transcribed spacer) a 5' konec z LSU rRNA genu (velká ribozomální podjednotka) dle Buckholt et al. 2002; De Bosschere et al. 2007; Didier et al. 1995; Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996.

Celkový objem jednotlivých reakčních směsí činil pro primární i sekundární PCR reakci 20 µl. V každé reakci byla využita negativní kontrola (PCR voda) a pozitivní kontrola v závislosti na genu (*C. parvum*, *C. muris*, *C. hominis*, *E. bienersi* genotype D, *E. cuniculi* genotype II).

#### **4.2.4. Gelová elektroforéza**

Získané PCR produkty byly vizualizovány pomocí elektroforézy na 1 % agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu (0,2 µg/ml). K vizualizaci je využito UV záření o vlnové délce 302 nm.

##### Použité chemikálie:

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

##### **Pracovní postup:**

Agarózu smíchat s 1× TAE puftrem (výsledná koncentrace je 1%), rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou na teplotu cca 50 °C. Ihned připipetovat ethidium-bromid a připravený gel vylít do předem připravené formy s vloženými hřebeny, nechat ztuhnout. Ztuhlý gel vložit do elektroforetické vany naplněné 1× TAE puftrem. Do jamek gelu napipetovat veškerý produkt sekundární PCR.

Napětí nastavit na 100 V a nechat spuštěné po dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA. Pro vizualizaci DNA fragmentů využít UV transiluminátor.

#### **4.2.5. Příprava vzorků na sekvenaci a sekvenace**

V případě pozitivního výsledku byly jednotlivé PCR produkty vyříznuty z gelu a extrahovány pomocí Gel extraction kitu (Qiagen) dle návodu výrobce a poté byla změřena koncentrace DNA v programu Nanodrop.

Výsledné sekvence byly ručně upraveny v programu Chromas Pro Version 1.5 (Technelysium Pty. Ltd, Qld, Australia) a konsenzus sekvencí byl porovnán pomocí programu ClustalX 2.0.12 (<ftp://ftp-igbmc.ustrasbg.fr/pub/ClustalX/>). Výsledný alignment byl ručně editován v programu Bioedit 7.0.5.3. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank.

#### **4.2.6. Fylogenetická analýza**

Ke zjištění fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií a mikrosporidií byly využity Neighbor-Joining na Maximum Likelihood, metody v programech Treecon a MEGA 5. Bootstrapová analýza byla použita pro vyhodnocení statistické podpory získaných topologií (1000 opakování). Získané sekvence byly uloženy v GenBank pod přístupovými čísly uvedenými v jednotlivých publikacích.

#### **4.2.7. Statistická analýza**

Vztahy mezi výskytem kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí v závislosti na věku, pohlaví a systému chovu byly analyzovány pomocí programu Epi Info (TM) 7.1.1.14 (Centers for Disease Control and Prevention, USA), Statistica® 6.0 a v programovacím prostředí R 2.15.0 (R Development Core Team, 2007). K vyhodnocení jednotlivých proměnných byl využit chí-kvadrát test.

## 5. SHRUTÍ NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ DISERTAČNÍ PRÁCE

### 5.1 Výskyt a prevalence kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí v chovech koní, oslů a volně žijících stádech divokých koní

Mezi roky 2011–2015 bylo na výskyt kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí vyšetřeno celkem 1300 vzorků koní a oslů pocházejících z různých zemí světa (Česká republika, Polsko, Severní Amerika a Alžír), z toho v České republice bylo v letech 2010–2011 molekulárně vyšetřeno 377 vzorků koní na výskyt a prevalenci mikrosporidií *E. bieneusi* a *E. cuniculi*. Ve stejném roce bylo v Alžíru odebráno 138 vzorků použitých na vyšetření výskytu kryptosporidiových infekcí. Dále bylo v letech 2012–2013 vyšetřeno 352 vzorků pocházejících z chovů v České republice a Polsku, 343 vzorků koní a oslů z Alžíru.

V neposlední řadě bylo v letech 2013–2014 odebráno a vyšetřeno 90 vzorků divokých koní ze Severní Ameriky pro porovnání výskytu kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí mezi domestikovanými a divokými koňmi.

Výzkum zaměřený na výskyt mikrosporidiových infekcí u koní je unikátní tím, že se danou problematikou doposud téměř nikdo nezabýval vyjma jediné publikace týkající se pozitivních výsledků na *E. bieneusi* u koní v Jižní Americe (Santín et al. 2010) a třech publikací, kde byl popsán průkaz mikrosporidie *E. cuniculi* v abortovaných plodech koní v Jihoafrické republice (Van Rensburg et al. 1991), USA (Patterson-Kane et al. 2003) a Maďarsku (Szeredi et al. 2007).

Celková prevalence kryptosporidií a mikrosporidií v jednotlivých zemích, kde probíhaly naše studie je shrnuta v tabulce 5. V Alžíru byli kromě koní do pozorování zahrnuti i osli (**publikace V**). V rámci kryptosporidií byla nejvyšší prevalence zaznamenána u divokých koní v Severní Americe. Mikrosporidie byly výrazně více zastoupeny u koní v českých chovech (**publikace I**).

**Tabulka 5.** Celková prevalence kryptosporidií a mikrosporidií u koňovitých v jednotlivých zemích

Země	Počet		Počet vyšetřených vzorků	Počet pozitivních vzorků		
	koní	oslů	krypto/mikro	kryptosporidie	<i>E. bieneusi</i>	<i>E. cuniculi</i>
Severní Amerika	90	-	90/90	12 (13,4%)	7 (7,8%)	0
Polsko	81	-	81/81	7 (8,6%)	0	0
Česká republika	648	-	271/377	5 (1,8%)	66 (17,3%)	26 (6,9%)
Alžír	357	124	481/343	11 (2,3%)	17 (4,8%)	6 (1,7%)
<b>Celkem</b>	1176	124	923/891	35 (3,8%)	90 (10,1%)	32 (3,6%)

### 5.1.2 Prevalence kryptosporidií v závislosti na technologii chovu

Byly testovány různé technologie chovu koní. Rozdílný management i podmínky chovu významně ovlivňují zdraví i výkonnost koní a s tím související výskyt infekčních onemocnění a parazitárních chorob. Z rozsáhlého výzkumu zaměřeného na tuto problematiku bylo zjištěno, že kryptosporidie byly zaznamenány ve všech technologiích v České republice, Polsku a Alžíru bez statistického rozdílu. Nicméně kryptosporidie byly více detekovány v chovech, které využívaly kombinaci pastvy a ustájení přes noc (**publikace IV**) nebo pastvu v období pastevní sezóny (**publikace III**).

### 5.1.3 Prevalence kryptosporidií v závislosti na věku a pohlaví

Z celkového počtu 352 koní z 23 chovů z ČR a Polska bylo 110 klisen a 242 hřebců, z toho u 3 (2,7 %) klisen a 9 (3,7 %) hřebců byl molekulárními metodami prokázán pozitivní výsledek na přítomnost specifické DNA kryptosporidií. Prevalence u koní starších tří let (3,9 %) pocházejících z České republiky a Polska se významně nelišila od koní mladších (2,9 %). Rovněž u koní v Alžíru nebyl prokazatelný rozdíl v případě kryptosporidiových infekcí v závislosti na věku nebo pohlaví (**publikace III a V**).

#### 5.1.4 Prevalence kryptosporidií u divokých koní a oslů

Vzorky divokých koní byly získávány ze třech oblastí Severní Ameriky (Severní Dakota, Oregon, Maryland). Přítomnost specifické DNA kryptosporidií byla molekulárními metodami prokázána ve dvou oblastech - v Oregonu a v Marylandu. U divokých mustangů v Oregonu byly detekovány 3 (8,8 %) pozitivní vzorky, kdežto v Marylandu 17 (34 %) vzorků (**publikace VI**). Celková prevalence u divokých koní v Marylandu byla tedy významně vyšší v porovnání s domestikovanými koňmi v České republice, Polsku a Alžíru (**publikace III, IV a V**). Naopak u oslů z alžírských provincií byla zaznamenána nejnižší prevalence, kdy ze 124 získaných vzorků byly pouze 2 pozitivní na kryptosporidie (**publikace V**).

#### 5.1.5 Prevalence mikrosporidií v závislosti na technologii chovu

Mikrosporidie byly zaznamenány celkem v 16 z 23 chovů v České republice. V 15 chovech byla detekována mikrosporidie *E. bieneusi* a v 8 chovech *E. cuniculi*. Celkově z 377 odebraných koní bylo 66 pozitivních na *E. bieneusi* (17,5 %) a 26 na *E. cuniculi* (6,9 %). Z výsledků v příkládané **publikaci I** lze jednoznačně usuzovat, že závislost technologie chovu na výskyt mikrosporidiových infekcí byla prokázána, když statisticky vyšší prevalence u obou druhů mikrosporidií byla zjištěna ve stájových chovech. Co se týče podrobného studia koní a oslů z Alžíru, zde nebyl prokázán vliv technologie na výskyt mikrosporidiových infekcí (**publikace V**).

#### 5.1.6 Prevalence mikrosporidií v závislosti na věku a pohlaví

Vliv pohlaví na výskyt mikrosporidií nebyl prokázán (**publikace I a V**). Celková prevalence dosahovala 17,1 % u hřebců, 10,9 % u valachů a 21,4 % u klisen v případě *E. bieneusi* a 5,3 % u hřebců, 9,3 % u valachů a 7,9 % u klisen v případě *E. cuniculi* (**publikace I**).

Co se týká věku koní, bylo konkrétně v České republice zjištěno, že mikrosporidie *E. cuniculi* se statisticky významně více vyskytovala u koní starších tří let (10,0 %) v porovnání s mladšími (4,0 %,  $P = 0.0213$ ). Jiný závěr vyplývá z výsledků v chovech koní a oslů z Alžíru, kdy vliv věku nebyl prokázán (**publikace V**).



### 5.1.7 Prevalence mikrosporidií u divokých koní

Z 90 vzorků divokých koní bylo 7 (7,8 %) pozitivních na výskyt *E. bienersi*, přičemž 5 pozitivních vzorků pocházelo z lokality v Marylandu od koní plemene chincoteaque pony. V porovnání s prevalencí *E. bienersi* u domestikovaných koní v České republice (17,3 %) je zjištěná prevalence v USA u divokých koní výrazně nižší. Mikrosporidie *E. cuniculi* nebyla zaznamenána u žádného divokého koně v testované oblasti v USA (**publikace VI**).

### 5.2 Klinické příznaky kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí

Statistická analýza neprokázala na souboru 1300 individuálních vzorků vztah mezi výskytem kryptosporidií či mikrosporidií a průměrným onemocněním (**publikace I, III, IV, V a VI**). Zkoumaní koně ani osli nevykazovali žádné klinické příznaky, které by vypovídali o infekci kryptosporidiiemi.

### 5.3 Diverzita genotypů kryptosporidií

Na základě podrobného zpracování sekvencí získaných z pozitivních vzorků bylo zjištěno, že koně jsou vnímaví nejen k infekci způsobené *C. parvum*, které je známo svou širokou hostitelskou specifikou a *Cryptosporidium* horse genotype, ale i *C. muris*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei* a *C. hominis*. *Cryptosporidium erinacei*, v předchozích letech známé jako *Cryptosporidium* hedgehog genotype, bylo detekováno pouze ve 4 vzorcích arabských plnokrevníků z Alžírského chovu v provincii Tiaret (**publikace III**). V tomto samém chovu byl o dva roky později v jednom případě u koně nalezen druh *C. hominis* (**publikace V**). Ostatní druhy a genotypy byly detekovány celkem ve 4 chovech na území České republiky a Polska. Fylogenetické analýzy genu kódujícího 60kDa glykoprotein odhalily u importovaného hřebce infekci způsobenou *C. tyzzeri* IXb (druh specifický pro myši). Vzhledem k tomu, že se jednalo o alelickou rodinu IXb, která se nevyskytuje u myší východoevropských, tedy v místech, kde byl hřebec v době studie ustájen, jednalo se s největší pravděpodobností o aktivní infekci, kterou si hřebec přivezl z domovské stáje (**publikace IV**). *Cryptosporidium parvum* subtyp IIAA15G2R1 známý jako IOWA izolát byl u koní diagnostikován poprvé a to v jednom případě u hřebce z

České republiky (**publikace IV**) a u chincoteque poníků z Marylandu (**publikace VI**). V případě *C. parvum* byl detekován ještě subtyp IIA13G2R1 ze vzorků z Marylandu a IIA17G2R1 z mustangů v Oregonu (**publikace VI**). *Cryptosporidium* horse genotype subtyp VIA15G4 nalezený v České republice (**publikace IV**) byl identický s izolátem z hřiběte z Itálie (Caffara et al. 2013).

#### **5.4 Diverzita genotypů *E. bieneusi* a *E. cuniculi***

Celkem bylo nalezeno 16 různých genotypů *E. bieneusi* a 3 různé genotypy *E. cuniculi*. *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I byl nalezen pouze ve dvou chovech v České republice, narozdíl od *E. cuniculi* genotyp II, který byl v chovech obecně více rozšířen (**publikace I**). Mikrosporidie *E. cuniculi* genotyp III byla detekována pouze ve vzorku koně z Alžíru (**publikace V**). Nové genotypy *E. bieneusi* označené jako Horse 3–11 byly detekovány pouze v chovech v České republice (**publikace I**). Dosud nejkompexnější výzkum týkající se rozmanitosti genotypů *E. bieneusi* a *E. cuniculi* u koní a oslů je podrobně popsán v **publikaci I a V**.

#### **5.5 Průběh experimentální infekce způsobené *E. cuniculi***

K experimentálnímu pokusu bylo použito 9 poníků plemene minihorse (z toho 1 klisna a 8 hřebců) ve věku jednoho roku. Všichni poníci byli před pokusem molekulárně vyšetřeni na přítomnost specifické DNA *E. cuniculi*, žádný z nich nebyl pozitivní. První 3 týdny infekce byly charakterizovány rozšířením *E. cuniculi* ve slezině. Akutní fáze infekce nastoupila 28. den a skončila zhruba 42. den. V této fázi počet infikovaných orgánů výrazně narostl a zároveň bylo *E. cuniculi* detekovatelné v moči a trusu. Následoval postupný pokles intenzity infekce, kdy rozšíření infekce začalo pozvolna mizet z většiny zasažených orgánů s výjimkou ledvin a plic, které byly pozitivní ještě v době 63. DPI, kdy byl pokus ukončen. Nebyly pozorovány žádné patologické změny s výjimkou klisny, u které byl objeven absces v mozku v oblasti lobus piriformis. Analýza DNA prokázala přítomnost *E. cuniculi* v tomto abscesu.

Pro stanovení koncentrace specifických protilátek v séru byl využit nepřímý ELISA test. Byla prokázána korelace mezi průběhem infekce a koncentrací specifických

protilátek, kdy v akutní fázi infekce byla koncentrace protilátek statisticky významně vyšší.

Podrobnější přiblížení tohoto výzkumu zabývajících se experimentální infekcí koní je shrnuto v **publikaci II.**

## 6. ZÁVĚRY

- Divocí koně jsou kryptosporidii promořeni více než koně domestikovaní.
- Koně jsou vnímaví i k hostitelsky specifickým druhům kryptosporidií jako je *C. erinacei*, *C. muris* a *C. hominis*.
- Vliv technologie chovu, věku či pohlaví chovaných koní nebyl v případě infekce kryptosporidii prokázán.
- Kryptosporidiové infekce koní i oslů nejsou spojeny s klinickými příznaky onemocnění.
- Vliv stájové technologie na výskyt mikrosporidií byl prokázán pouze u koní v České republice.
- Dospělí koně v českých chovech byli více infikováni *E. cuniculi* než mladší koně.
- Byla prokázána značná diverzita genotypů *E. bieneusi* detekovaných u koní.
- Nové genotypy *E. bieneusi* označené jako Horse 3–11 byly detekovány pouze u koní v České republice.
- Nejčastěji se vyskytující genotyp *E. bieneusi* byl genotyp D.
- Oslí jsou hostitelé jak *E. bieneusi*, tak *E. cuniculi*.
- *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II je v chovech koní obecně více rozšířen.
- Akutní fáze mikrosporidiosis byla u experimentálních koní zachycena od 28.–42. dne po infekci.
- Z patologických změn vyvolaných *E. cuniculi* genotypem II byl pozorován pouze absces na mozku u klisny v experimentu v akutní fázi infekce.
- Koně jako hostitelé některých druhů kryptosporidií a mikrosporidií se zoonotickým potenciálem nepředstavují velké riziko v přenosu infekce a ohrožení zdraví lidské populace.

## 7. PROHLÁŠENÍ SPOLUAUTORŮ

Všichni níže uvedení spoluautoři prohlásili, že se Ing. Pavla Wagnerová významnou měrou podílela na publikacích uvedených v příloze této disertační práce. Souhlas jednotlivých autorů byl elektronickou formou zaslán školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., a byl ověřen předsedou oborové rady Zoohygiena a prevence chorob, Doktorského studijního programu Zootechnika, Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích prof. Ing. Janem Trávníčkem, CSc.

1. Dr. Aissi Meriem
2. Ing. Buňatová Zita
3. Ing. Civišová Hana
4. Ježková Jana
5. doc. Ing. Kváč Martin, Ph.D.
6. RNDr. Květoňová Dana
7. Dr. Laatamna Abd Elkarim
8. prof. Ing. Langrová Iva, CSc.
9. McEvoy John, Ph.D., associate professor
10. doc. Ing. Maršálek Miroslav, CSc.
11. Dr. Perc-Matysiak Agnieszka
12. Ing. Rost Michael, Ph.D.
13. Dr. Saadi Ahmed Rachid
14. RNDr. Sak Bohumil, Ph.D.
15. Xiao Lihua, DVM, Ph.D.

V zastoupení všech spoluautorů :

doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D. ....

Ověřil:

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc. ....

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abe, N., Matsubara, K. 2015. Molecular identification of *Cryptosporidium* isolates from exotic pet animals in Japan. *Vet Parasitol* 209, 254–257.
- Ajjampur, S.S., Gladstone, B.P., Selvapandian, D., Muliyl, J.P., Ward, H., Kang, G. 2007. Molecular and spatial epidemiology of cryptosporidiosis in children in a semi-urban community in South India. *J Clin Microbiol* 45, 915–920.
- Akiyoshi, D.E., Feng, X., Buckholt, M.A., Widmer, G., Tzipori, S. 2002. Genetic analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passaged through different host species. *Infect Immun* 70, 5670–5675.
- Alves, M., Xiao, L., Antunes, F., Matos, O. 2006. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol Res* 99, 287–292.
- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O., Antunes, F. 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol* 41, 2744–2747.
- Alves, M., Xiao, L., Lemos, V., Zhou, L., Cama, V., da Cunha, M.B., Matos, O., Antunes, F. 2005. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo. *Parasitol Res* 97, 108–112.
- Amer, S., Zidan, S., Feng, Y., Adamu, H., Li, N., Xiao, L. 2013. Identity and public health potential of *Cryptosporidium* spp. in water buffalo calves in Egypt. *Vet Parasitol* 191, 123–127.
- Anderson, B.C. 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet Pathol* 24, 235–238.
- Areeshi, M., Dove, W., Papaventsis, D., Gatei, W., Combe, P., Grosjean, P., Leatherbarrow, H., Hart, C.A. 2008. *Cryptosporidium* species causing acute diarrhoea in children in Antananarivo, Madagascar. *Ann Trop Med Parasitol* 102, 309–315.
- Aydin, Y. 1997. The ultrastructure of the parasite and the mucus cell relationship and endogenous stages of *Cryptosporidium muris* in the stomach of laboratory mice. *Tr J Vet A Sci* 23, 117–125.

- Aydin, Y., Özkul, I.A. 1996. Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Vet Parasitol* 66, 257–262.
- Baishanbo, A., Gargala, G., Delaunay, A., Francois, A., Ballet, J.J., Favennec, L. 2005. Infectivity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* genotype 2 isolates in immunosuppressed Mongolian gerbils. *Infect Immun* 73, 5252–5255.
- Bajer, A., Caccio, S., Bednarska, M., Behnke, J.M., Pieniazek, N.J., Sinski, E. 2003. Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *J Parasitol* 89, 1053–1055.
- Bjorneby, J. M., Hunsaker, B.D., Riggs, M.W., Perryman, L.E. 1991a. Monoclonal antibody immunotherapy in nude mice persistently infected with *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* 59, 1172–1176.
- Bjorneby, J.M., Leach, D.R., Perryman, L.E. 1991b. Persistent cryptosporidiosis in horses with severe combined immunodeficiency. *Infect Immun* 59, 3823–3826.
- Black, S.S., Steinohrt, L.A., Bertucci, D.C., Rogers, L.B., Didier, E.S. 1997. *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet Pathol* 34, 189–198.
- Blanshard, C., Ellis, D.S., Tovey, D.G., Dowell, S., Gazzard, B.G. 1992. Treatment of intestinal microsporidiosis with albendazole in patients with AIDS. *AIDS* 6, 311–313.
- Bicart-Sée, A., Massip, P., Linas, M.D., Datry, A. 2000. Successful Treatment with Nitazoxanide of *Enterocytozoon bieneusi* Microsporidiosis in a Patient with AIDS. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 167–168.
- Bornay-Llinares, F.J., Da Silva, A.J., Moura, H., Schwartz, D.A., Visvesvara, G.S., Pieniazek, N.J., Cruz-López, A., Hernández-Jaureguim P., Guerrero, J., Enriquez, F.J. 1998. Immunologic, microscopic and molecular evidence for *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *J Infect Dis* 178, 820–826.
- Brown, J.H., Brenn, L. 1931. A method for the differential and gram negative bacteria in tissue sections. *Bull Johns Hopkins Hosp* 48, 69.

- Browning, G.F., Chalmers, R.M., Snodgrass, D.R., Batt, R.M., Hart, C.A., Ormarod, S.E., Leadon, D., Stoneham, S.J., Rossdale, P.D. 1991. The prevalence of enteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland. *Equine Vet J* 23, 405–409.
- Bryan, R.T., Schwartz, D.A. 1999. Epidemiology of microsporidiosis. In: *The microsporidia and microsporidiosis* (Eds. Wittner, M., Weiss, L.M.), ASM Press, Washington D.S., 502–516.
- Buckholt, M.A., Lee, J.H., Tzipori, S. 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl Environ Microbiol* 68, 2595–2599.
- Bukhari, Z., Hargy, T.M., Bolton, J.R., Dussert, B., Clancy, J.L. 1999. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium-pressure ultraviolet light. *J Am Water Works Assoc* 91, 86–94.
- Burton, A.J., Nydam, D.V., Dearen, T.K., Mitchell, K., Bowman, D.D., Xiao, L. 2010. The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. *Vet Parasitol* 174, 139–144.
- Caccio, S., Pinter, E., Fantini, R., Mezzaroma, I., Pozio, E. 2002. Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literatura review. *Emerg Infect Dis* 5, 579–584.
- Caffara, M., Piva, S., Pallaver, F., Iacono, E., Galuppi, R. 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from foals in Italy. *Vet J* 198, 531–533.
- Cali, A., Takvorian, P. M. 1999. Development morphology and life cycles of microsporidia. In: *The Microsporidian and Microsporidiosis* (Eds. Wittner, M., Weiss, L.M.) ASM Press, Washington D. C., 85–128.
- 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 manifestation in Children in Peru. *Emerg Infect Dis* 14, 1567–1574.



- Cama, V.A., Pearson, J., Cabrera, L., Pacheco, L., Gilman, R., Meyer, S., Ortega, Y., Xiao, L. 2007b. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* between a child and guinea pigs. *J Clin Microbiol* 45, 2708–2710.
- Cama, V.A., Ross, J.M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Navincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, R.H., Bern, C., Xiao, L. 2007a. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis* 196, 684–691.
- Cannig, E.U., Lom J. 1986. *The Microsporidia of Vertebrates*. Academic Press, New York, pp. 289.
- Cannig, E.U., Vávra, J. 2000. Phylum Microsporidia. In *An Illustrated Guide to the Protozoa*, 2nd ed. (Eds. Lee, J.J., Leedale, G.F., Bradbury, P.), 39–126.
- Cardona, G.A., de Lucio, A., Bailo, B., Cano, L., de Fuentes, I., Carmena, D. 2015. Unexpected finding of feline-specific *Giardia duodenalis* assemblage F and *Cryptosporidium felis* in asymptomatic adult cattle in Northern Spain. *Vet Parasitol* 209, 258–263.
- 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.
- Carreno, R.A., Martin, D.S., Barta, J.R. 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analyses of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res* 85, 899–904.
- Castro-Hermida, J.A., Yolanda, A., Gonzalez-Losada, A., Ares-Mazas, E. 2002. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol* 106, 1–10.
- Cavalier-Smith, T. 2014. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *Eur J Protistol* 50, 472–495.

- Chalmers, R.M., Giles, M. 2010. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK – challenges for control. *J Appl Microbiol* 109, 1487–1497.
- Chalmers, R.M., Sturdee, A.P., Casemore, D.P., Curry, A., Miller, A., Parker, N.D., Richmond, T.M. 1994. *Cryptosporidium muris* in wild house mice (*Mus musculus*) First report in the UK. *Eur J Protistol* 30, 151–155.
- Chalmers, R.M., Thomas, A.L., Butler, B.A., Morel, M.C. 2005. Identification of *Cryptosporidium parvum* genotype 2 in domestic horses. *Vet Rec* 156, 49–50.
- Chan, C. M., Theng, J. T., Li, L., Tan, D. T. 2003. Microsporidial keratoconjunctivitis in healthy individuals: a case series. *Ophthalmology* 110, 1420–1425.
- Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Sterling, C.R., Wang, C., Jakubowski, W., DuPont, H.L. 1999. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with preexisting anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am J Trop Med Hyg* 60, 157–164.
- Chen, F., Huang, K. 2007. Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* in 196 pigs in Eastern China. *Zoonoses and Public Health* 54, 393–400.
- Choudhary, M.M., Metcalfe, M.G., Arrambide, K., Bern, C., Visvesvara, G.S., Pieniazek, N.J., Bandea, R.D., Deleon-Carnes, M., Adem, P., Choudhary, M.M., Zaki, S.R., Saeed, M.U. 2011. *Tubulinosema* sp. microsporidian myositis in immunosuppressed patient. *Emerg Infect Dis* 17, 1727–1730.
- Cohen, N.D. 2002. Equine cryptosporidial diarrhea. In: *Manual of Equine Gastroenterology* (Eds. Mair, T., Divers, T., Ducharme, N., Saunders, W.B. Edinburgh), 504–507.
- Cole, D.J., Cohen, N.D., Snowden, K., Smith, R. 1998. Prevalence of and risk factors for fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in horses. *J Am Vet Med Assoc* 213, 1296–1302.
- Coleman, S.U., Klei, T.R., French, D.D., Chapman, M.R., Corstvet, R.E. 1989. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in equids in Louisiana. *Am J Vet Res* 50, 575–577.
- Conteas, C.N., Berlin, O.G., Lariviere, M.J., Pandhumass, S.S., Sperck, 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, 559–561.
- Coupe, S., Delabre, K., Pouillot, R., Houdart, S., Santillana-Hayat, M., Derouin, F. 2006. Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in surface water, including recreational areas, a one-year prospective study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47, 351–359.
- Cray, C., Perritt, E., Hughes, C., Belgrave, R.L. 2014. Serological survey for antibody to *Encephalitozoon cuniculi* in horses in the USA. *Parasitol Res* 113, 2757–2759.
- Current, W.L., Blagburn, B.L. 1990. *Cryptosporidium*: infections in man and domesticated animals (Ed. Long, P.L). *Coccidiosis of man and domestic animals* CRC Press, Boca Raton, FL, 155–185.
- Current, W.L., Reese N.C. 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J Protozool* 33, 98–108.
- Current, W.L., Upton S.J., Haynes T.B. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J Protozool* 33, 289–296.
- De Bosschere, H., Wang, Z., Orlandi, P.A. 2007. First diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. hellem* in a European brown hare (*Lepuseuropaeus*) with kidney lesions. *Zoonoses Public Health* 54, 131–134.
- de la Fuente, R., Luzon, M., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Garcia, A., Cid, D., Orden, J.A., Garcia, S., Sanz, R., Gomez- Bautista, M. 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1–30-day-old diarrhoeic dairy calves in central Spain. *Vet Parasitol* 80, 179–185.
- de Souza, P.N., Bomfim, T.C., Huber, F., Abboud, L.C., Gomes, R.S. 2009. Natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. and *Eimeria leuckarti* in three groups of equines with different handlings in Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 160, 327–333.
- de Waele, V., Speybroeck, N., Berkvens, D., Mulcahy, G., Murphy, T.M. 2010. Control of cryptosporidiosis in neonatal calves: use of halofuginone lactate in two different calf rearing systems. *Prev Vet Med* 96, 143–151.

- Delafosse, A., Chartier, C., Dupuy, M.C., Dumoulin, M., Pors, I., Paraud, C. 2015. *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in western France. *Prev Vet Med* 118, 406–412.
- Dengjel, B., Zahler, M., Hermanns, W., Heinritzi, K., Spillmann, T., Thomschke, A., Löscher, T., Gothe, R., Rinder, H. 2001. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *J Clin Microbiol* 39, 4495–4499.
- Deplazes, P., Mathis, A., Weber, R. 2000. Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contrib Microbiol* 6, 236–260.
- Didier, E.S., Visvesvara, G.S., Baker, M.D., Rogers L.B., Bertucci, D.C., De Groote, M.A., Vossbrinck, C.R. 1996. A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *J Clin Microbiol* 34, 2835–2837.
- Didier, E.S. 2005. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 94, 61–67.
- Didier, E.S., Didier, P.J., Snowden, K.F., Shadduck, J.A. 2000. Microsporidiosis in mammals. *Microbiol Infect* 2, 709–720.
- Didier, E.S., Snowden, K.F., Shadduck, J.A. 1998. Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv Parasitol* 40, 283–320.
- Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K., Didier, P.J. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 126, 145–166.
- Didier, E.S., Vossbrinck, C.R., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C., Shadduck, J.A. 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111, 411–421.
- Didier, E.S., Weiss, L.M. 2006. Microsporidiosis. *Curr Opin Infect Dis* 19, 485–492.
- Didier, E.S., Weiss, L.M. 2008. Overview of microsporidia and microsporidiosis. *Protist* 5, 243–255.

- Diesenhause, M.C., Wilson, L.A., Corrent, G.F., Visvesvara, G.S., Grossniklaus, H.E., Bryan, R.T. 1993. Treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with tropical fumagillin. *Am J Ophthalmol* 115, 293–298.
- Dieterich, D.T., Lew, E.A., Kotler, D.P., Poles, M.A., Orenstein, J.M. 1994. Treatment with albendazole for intestinal disease due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with AIDS. *J Infect Dis* 169, 178–183.
- Ditrich, O., Palkovic, L., Šterba, J., Prokopič, J., Loudová, J., Giboda, M. 1991. The first finding of *Cryptosporidium* in man. *Parasitol Res* 77, 44–47.
- Dolejš, P. 2004. *Cryptosporidium* a *Giardia*: přehled vodárenské problematiky za první desetiletí po událostech Milwaukee (USA). *Vodní hospodářství* 54, 271–273.
- Domenéch-Sánchez, A., Olea, F., Berrocal, C.I. 2008. Infection related to recreational waters. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 26, 32–37.
- Dowd, S.E., Gerba, C.P., Pepper, I.L. 1998. Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl Environ Microbiol* 64, 3332–3335.
- Drosten, C., Laabs, J., Kuhn, E.M., Schottelius, J. 2005. Interspecies transmission of *Enterocytozoon bieneusi* supported by observations in laboratory animals and phylogeny. *Med Microbiol Immunol* 194, 207–209.
- Dyachenko, V., Kuhnert, Y., Schmaeschke, R., Etzold, M., Pantchev, N., Dausgchies, A. 2010. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. genotypes in European hedgehogs (*Erinaceus europaeus* L.) in Germany. *Parasitology* 137, 205–216.
- Ebeid, M., Mathis, A., Pospischil, A., Deplazes, P. 2003. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* genotype I in conventionally reared piglets and lambs. *Parasitol Res* 90, 232–235.
- Elliot, D.A., Coleman, D.J., Lane, M.A., May, R.C., Machesky, L.M., Clark, D.P. 2001. *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerisation. *Infect Immun* 69, 5940–5942.

- Epe, C., Coati, N., Schnieder, T. 2004. Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 111, 243–247.
- Farthing, M.J. 2006. Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3, 436–445.
- Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 126, 37–56.
- Fayer, R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol* 124, 90–97.
- Fayer, R., Phillips, L., Anderson, B.C., Bush, M. 1991. Chronic cryptosporidiosis in a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Zoo Wildl Med* 22, 228–232.
- Fayer, R., Santín-Duran, M. 2014. Epidemiology of microsporidia in human infections – chapter 3. *Microsporidia: pathogens of opportunity*, first edition (Eds. Weiss, L.M., Becnel, J.J.) Wiley Blackwell, 135–164.
- Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M. 2007. *Enterocytozoon bienewsi* in mature dairy cattle on farms in the eastern United States. *Parasitol Res* 102, 15–20.
- Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M. 2003. First detection of microsporidia in dairy calves in North America. *Parasitol Res* 90, 383–386.
- Fayer, A., Speer, C.A., Dubey, J.P. 1990. General biology of *Cryptosporidium*, (Eds. Dubey, J.P. Speer C.A., Fayer, R.). *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2–29.
- Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P. 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. (Ed. Fayer, R). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC press, Boca Raton 1–42.
- Fayer R., Xiao L. 2008. General biology. (Eds. Fayer, R., Xiao, L), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1–42.
- Fayer, R., Trout, J.M., Jenkins, M.C. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J Parasitol* 84, 1165–1169.
- Fayer, R., Trout, J.M., Nerad, T. 1996. Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Eukar Microbiol* 43, 64.

- Feng, Y. 2008. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp Parasitol* 124, 128–137.
- Feng, Y., Lal, A.A., Li, N., Xiao, L. 2011a. Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp Parasitol* 127, 238–242.
- Feng, Y., Yang, W., Ryan, U., Zhang, L., Kváč, M., Koudela, B., Modrý, D., Li, N., Fayer, R., Xiao, L. 2011b. Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J Clin Microbiol* 49, 34–41.
- Foo, C., Farrell, J., Boxell, A., Robertson, I., Ryan, U.M. 2007. Novel *Cryptosporidium* genotype in wild Australian mice (*Mus domesticus*). *Appl Environ Microbiol* 73, 7693–7696.
- Fournier, S., Liguory, O., Santillana-Hayat, M., Guillot, E., Sarfati, C., Dumoutier, N., Molina, J., Derouin, F. 2000. Detection of microsporidia in surface water, a one-year follow-up study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29, 95–100.
- Franzen, C. 2005. How do microsporidia invade cells? *Fol Parasitol* 52, 36–40.
- Gajadhar, A.A., Caron, J.P., Allen, J.R. 1985. Cryptosporidiosis in two foals. *Can Vet J* 26, 132–134.
- Gamboa-Dominguez, A., De Anda, J., Donis, J., Ruiz-Maza, F., Visvesvara, G.S., Diliz, H. 2003. Disseminated *Encephalitozoon cuniculi* infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Transplantation* 75, 1898–1900.
- Garber, L.P., Salman, M.D., Hurd, H.S., Keefe, T., Schlater, J.L. 1994. Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* 205, 86–91.
- Gargala, G. 2008. Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*. *Parasite* 15, 275–281.
- Gatei, W., Barrett, D., Lindo, J.F., Eldemire-Shearer, D., Cama, V., Xiao, L. 2008. Unique *Cryptosporidium* population in HIV-Infected persons, Jamaica. *Emerg Infect Dis* 14, 841–843.

- Gatei, W., Das, P., Dutta, P., Sen, A., Cama, V., Lal, A.A., Xiao, L. 2007. Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infect Genet Evol* 7, 197–205.
- Gentile, G., Venditti, M., Micozzi, A., Caprioli, A., Donelli, G., Tirindelli, C., Meloni, G., Arcese, W., Martino, P. 1991. Cryptosporidiosis in patients with hematologic malignancies. *Rev Infect Dis* 13, 842–846.
- Geurden, T., Goma, F.Y., Siwila, J., Phiri, I.G.K., Mwanza, A.M., Gabriel, S., Claerebout, E., Vercruyse, J. 2006. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. *Vet Parasitol* 138, 217–222.
- Gibson, J.A., Hill, M.V.M., Huber, M.J. 1983. Cryptosporidiosis in Arabian foals with severe combined immunodeficiency. *Aust Vet J*, 60, 378–379.
- Giles, M., Webster, K.W., Marshall, J.A., Catchpole, J., Goddard, T.M. 2001. Experimental infection of a lamb with *Cryptosporidium parvum* type 1. *Vet Rec* 149, 523–525.
- Goetz, M., Eichenlaub, S., Pape, G.R., Hoffmann, R.M. 2001. Chronic diarrhea as a result of intestinal microsporidiosis in a liver transplant recipient. *Transplantation* 71, 334–337.
- Goodwin, D., Gennari, S.M., Howe, D.K., Dubey, J.P., Zajac, A.M., Lindsay, D.S. 2006. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in horses from Brazil. *Vet Parasitol* 142, 380–382.
- 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.
- Graczyk, T.K., Cranfield, M.R., Dunning, C., Strandberg, J.D. 1998. Fatal cryptosporidiosis in a juvenile captive African Hedgehog (*Ateletrix albiventris*). *J Parasitol* 84, 178–180.
- Griffiths, J.K. 1998. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Adv Parasitol* 40, 37–85.



- Grinberg, A., Learmonth, J., Kwan, E., Pomroy, W., Lopez Villalobos, N., Gibson, I., Widmer, G. 2008. Genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* causing foal diarrhea. J Clin Microbiol 46, 2396–2398.
- Grinberg, A., Oliver, L., Learmonth, J.J., Leyland, M., Roe, W., Pomroy, W.E. 2003. Identification of *Cryptosporidium parvum* ‘cattle’ genotype from a severe outbreak of neonatal foal diarrhoea. Vet Rec 153, 628– 631.
- Grinberg, A., Pomroy, W.E., Carslake, H.B., Shi, Y., Gibson, I.R., Drayton, B.M. 2009. A study of neonatal cryptosporidiosis of foals in New Zealand. N Z Vet J 57, 284–289.
- Guo, P.F., Chen, T.T., Tsaihong, J.C., Ho, G.D., Cheng, P.C., Tseng, Y.C., Peng, S.Y. 2014. Prevalence and species identification of *Cryptosporidium* from fecal samples of horses in Taiwan. Southeast Asian J Trop Med Public Health 45, 6–12.
- Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelievre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., Cailliez, J.C., Camus, D., Deicas, 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.
- Haro, M., del Águila, C., Fenoy, S., Henriques-Gil, N. 2003. Intraspecies genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. J Clin Microbiol 41, 4166–4171.
- Haro, M., Henriquez-Gil, N., Fenoy, S., Izquierdo, F., Alonso, F., Del Aguila, C. 2006. Detection and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in pigeons. J Eukaryot Microbiol 53, 58–60.
- Haro, M., Izquierdo, F., Henriques-Gil, N., Andres, I., Alonso, F., Fenoy, S., Del Aguila, C., 2005. First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. Appl Environ Microbiol 71, 3153–3157.

- Hill, B.D., Blewett, D.A., Dawson, A.M., Wright, S. 1990. Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. Res Vet Sci 48, 76–81.
- Hocevar, S.M., Paddock, C.H.D., Spak, C.W., Rosenblatt, R., Diaz-Luna, H., Castillo, I., Luna, S., Friedman, G.C., Antony, S., Stoddard, R.A., Tiller, R.V., Peterson, T., Blau, D.M., Sriram, R.R., da Silva, A., de Almeida, M., Benedict, T., Goldsmith, C, S., Zaki, S, R., Visvesvara, G.S., Kuehnert, M.J. 2014. Microsporidiosis Acquired Through Solid Organ Transplantation: A Public Health Investigation. Ann Intern Med 160, 213–220.
- Hong, D.K., Wong, C.J., Gutierrez, K. 2007. Severe cryptosporidiosis in a seven-year-old transplant recipient: case report and review of the literature. Pediatr Transplant 11, 94–100.
- 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. Parasitology 94, 209–219.
- Hůrková, L., Hajdušek, O., Modrý, D. 2003. Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. J Wildl Dis 39, 441–444.
- Imhasly, A., Frey, C.F., Mathis, A., Straub, R., Gerber, V. 2009. Cryptosporidiose (*C. parvum*) in a foal with diarrhea. Schweiz Arch Tierheilkd 151, 21–26.
- Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S., Takada, S. 1989. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. Parasitol Res 75, 218–222.
- Jenkins, M.B., Liotta, J.L., Lucio-Forster, A., Bowman, D.D. 2010. Concentrations, viability, and distribution of *Cryptosporidium* genotypes in lagoons of swine facilities in the Southern Piedmont and in coastal plain watersheds of Georgia. Appl Environ Microbiol 76, 5757–5763.
- Jiang, J., Alderisio, K.A., Xiao, L., 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. Appl Environ Microbiol 71, 4446–4454.

- Karanis, P., Plutzer, J., Halim, N.A., Igori, K., Nagasawa, H., Ongerth, J., Ma, L. 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. *Parasitol Res* 101, 1575–1580.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Loscher, T., Rinder, H. 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop Med Int Health* 1, 373–378.
- Keeling, P.J. 2003. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies from a zygomycete origin of microsporidia. *Fung Gen Biol* 38, 298–309.
- Keeling, P.J. 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. *Annu Rev Microbiol* 56, 93–116.
- Keeling, P.J., Luker, M.A., Palmer, J.D. 2000. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol Biol Evol* 17, 23–31.
- Keidel, J., Dauschies, A. 2013. Integration of halofuginone lactate treatment and disinfection with p-chloro-m-cresol to control natural cryptosporidiosis in calves. *Vet Parasitol* 196, 321–326.
- Keoghane, E. M., Weiss, L. M. 1998. Characterisation and function of the microsporidian polar tube. *Folia Parasitol* 45, 117–127.
- Khan, W.A., Rogers, K.A., Karim, M.M., Ahmed, S., Hibberd, P.L., Calderwood, S.B., Ryan, E.T., Ward, H.D. 2004. Cryptosporidiosis among Bangladeshi children with diarrhea: a prospective, matched, case-control study of clinical features, epidemiology and systemic antibody responses. *Am J Trop Med Hyg* 74, 412–419.
- Klein, P. 2008. Preventive and therapeutic efficacy of halofuginone-lactate against *Cryptosporidium parvum* in spontaneously infected calves: acentralised, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Vet J* 177, 429–431.
- Kodjikian, L., Garweg, J. G., Ngugyen, M., Schaffner, T., Deplazese, P., Zimmerli, S. 2005. Intraocular microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in patient with idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia. *Int J Med Microbiol* 294, 529–533.

- Kotková, M., Sak, B., Květoňová, D., Kváč, 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.
- Kotler, D.P., Orenstein, J.M. 1999. Clinical syndromes associated with microsporidiosis (Eds. Wittner, M., Weiss, L.M.), The Microsporidia and Microsporidiosis. Am Soc Microbiol, Washington, DC, 258–292.
- Kotler, D.P., Orenstein, J.M. 1998. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. Adv Parasitol 40, 321–349.
- Koudela, B., Kučerová, Š., Hudcovic, T. 1999. Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. Folia Parasitol 46, 171–174.
- Koudela, B., Lom, J., Vítovec, J., Kučerová, Z., Ditrich, O., Trávníček, J. 1994. In vivo efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. J Eukaryot Microbiol 41, 49–50.
- Kváč, M., Hofmannová, L., Hlásková, L., Květoňová, D., Vítovec, J., McEvoy, J., Sak, B. 2014a. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. Vet Parasitol 201, 9–17.
- 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., Kestřánová M., Pinková M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak, B. 2013. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). Vet Parasitol 31, 218–227.

- Kváč, M., Kouba, M., Vitovec, J. 2006. Age-related and housing dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet Parasitol* 137, 202–209.
- Kváč, M., Sak, B., Květoňová, D., Ditrich, O., Hofmannová, L., Modrý, D., Vitovec, J., Xiao, L. 2008. Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Vet Parasitol* 153, 363–367.
- Kváč, M., Saková, K., Květoňová, D., Kicia, M., Wesolowska, M., McEvoy, J., Sak, B., 2014 b. Gastroenteritis caused by *Cryptosporidium* hedgehog genotype in immunocompetent man. *J Clin Microbiol* 52, 347–349.
- Kváč M., Vitovec J. 2003. Prevalence and patogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J Vet Med*, 5, 451–457.
- Langkjaer, R.B., Vigre, H., Enemark, H.L., Maddox-Hyttel, C. 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology* 134, 339–350.
- Laatamna, A.E., Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Aissi, M., Rost, M., Kváč, M. 2013. Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog genotype in Algeria. *Vet Parasitol* 197, 350–353.
- Laatamna, A.E., Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Xiao, L., Rost, M., McEvoy, J., Saadi, A.R., Aissi, M., Kváč, M. 2015. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Vet Parasitol* 208, 135–142.
- Leav, B.A., Mackay, M.R., Anyanwu, A., RM, O.C., Cevallos, A.M., Kindra, G., Rollins, N.C., Bennish, M.L., Nelson, R.G., Ward, H.D. 2002. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infection and Immunity* 70, 3881–3890.
- 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 Infect Dis* 30, 331–338.

- Lee, J.H. 2008. Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. *Appl Environ Microbiol* 74, 1664–1666.
- Lee, J.H. 2007. Prevalence and molecular characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle in Korea. *Parasitol Res* 101, 391–396.
- Lee, S.C., Weiss, L.M., Heitman, J. 2009. Generation of genetic diversity in microsporidia via sexual reproduction and horizontal gene transfer. *Commun Integr Biol* 2, 414–417.
- Levkutova, M., Hipikova, V., Faitelzon, S., Benath, G., Paulik, S., Levkut, M. 2004. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in horses in the Israel. *Ann Agric Environ Med* 11, 265–267.
- Lewis, N.L., Francis, I.C., Hawkins, G.S., Coroneo, M.T. 2003. Bilateral microsporidial keratoconjunctivitis in an immunocompetent non-contact lens wearer. *Cornea* 22, 374–376.
- Lv, C., Zhang, L., Wang, R., Jian, F., Zhang, S., Ning, C., Wang, H., Feng, C., Wang, X., Ren, X., Qi, M., Xiao, L. 2009. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in China. *Appl Environ Microbiol* 75, 7692–7699.
- Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose J.B., Davis J.P. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Eng J Med* 331, 161–167.
- Mahdi, N.K., Ali, N.H. 2002. Cryptosporidiosis among animal handlers and their livestock in Bashrah, Iraq. *East Afr Med J* 79, 550–553.
- Mair, T.S., Cohen, N. D., Pearson, G. R. 2009. Cryptosporidiosis. *Infectious diseases of the Horse*, 347–353.
- Mair, T.S., Taylor, F.G., Harbour, D.A. Pearson, G.R. 1990. Concurrent *Cryptosporidium* and coronavirus infections in an Arabian foal with combined immunodeficiency syndrome. *Vet Rec* 126, 127–130.

- Majewska, A.C., Werner, A., Sulima, P., Luty, T. 1999. Survey on equine cryptosporidiosis in Poland and the possibility of zoonotic transmission. *Ann Agric Environ Med* 6, 161–165.
- 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.
- Mayhew, I.G., Greiner, E.C. 1986 Protozoal diseases. *Vet Clin N Am: Equine Pract* 2, 439–459.
- McKenzie, D.M., Diffay, B.C. 2000. Diarrhoea associated with cryptosporidial oocyst shedding in a quarterhorse stallion. *Aust Vet J* 78, 27–28.
- Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C., Rubin, C.E. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70, 1156–1160.
- Melicherová, J., Ilgová, J., Kváč, M., Sak, B., Koudela, B., Valigurová, A. 2014. Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology* 141, 287–303.
- Meredith, A.L., Milne, E.M. 2009. Cryptosporidial infection in a captive European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Zoo Wildl Med* 40, 809–811.
- Miláček, P., Vitovec, J. 1985. Differential staining of Cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol* 32, 50.
- Molina, J.M., Tourneur, M., Sarfati, C., Chevret, S., de Gouvello, A., Gobert, J.G., Balkan, S., Derouin, F. 2002. Fumafilin treatment of intestinal microsporidiosis. *N Engl J Med* 346, 1963–1969.
- Morgan, U.M., Sturdee, A.P., Singleton, G., Gomez, M.S., Gracenta, M., Torres, J., Hamilton, S.G., Woodside, D.P., Thompson, R.C.A. 1999. The *Cryptosporidium* “mouse” genotype is conserved across geographic areas. *J Clin Microbiol* 37, 1302–1305.

- Morgan, U.M., Xiao, L., Hill, B.D., O'Donoghue, P., Limor, J., Lal, A., Thompson, R.C. 2000. Detection of the *Cryptosporidium parvum* "human" genotype in a dugong (*Dugong dugon*). *J Parasitol* 86, 1352–1354.
- Muhid, A., Robertson, I., Ng, J., Ryan, U. 2011. Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium* sp. infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor, Malaysia. *Exp Parasitol* 127, 534–538.
- Muller, M.G., Kinne, J., Schuster, R.K., Walochnik, J. 2008. Outbreak of microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bieneusi* in falcons. *Vet Parasitol* 152, 67–78.
- Murakoshi, F., Fukuda, Y., Matsubara, R., Kato, Y., Sato, R., Sasaki, T., Tada, C., Nakai, Y. 2013. Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Vet Parasitol* 196, 184–188.
- Nägeli, K. 1857. Über die neue Krankheit die Seidenraupe unde verwandete Organismen. *Bot Zeitung* 15, 760–761.
- Netherwood, T., Wood, J.L., Townsend, H.G., Mumford, J.A., Chanter, N. 1996. Foal diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom associated with *Clostridium perfringens*, rotavirus, *Strongyloides westeri* and *Cryptosporidium* spp. *Epidemiol Infect* 117, 375–383.
- Ng-Hublin J.S., Singleton G.R., Ryan U. 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rats and mice from rural communities in the Philippines. *Infect Genet Evol* 16, 5–12.
- Nime F.A., Burek J.D., Page D.L., Holscher M.A., Yardley J.H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70, 592–598.
- Olson, M.E., Thorlakson, C.L., Doselliers, L., Morck, D.W., Mc Allister, T.A. 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet Parasitol* 68, 375–381.
- Ortega Y.R., Kváč M. 2013 In: Foodborne protozoa. (Eds. Labbé, R.G., García S.), *Guide to Foodborne Pathogens*. Wiley-Blackwell, USA, pp. 300–316.



- Özkul I.A., Aydin Y. 1994. Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Vet Parasitol* 55, 129–132.
- Pantchev, N., Moller, C. 2007. Successful treatment of cryptosporidiosis in a European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) with paromomycin sulfate (Humatin (R)) – a case report and review of the literature. *Kleintierpraxis* 52, 368–373.
- Park, J.H., Kim, H.J., Guk, S.M., Shin, E.H., Kim, J.L., Rim, H.J., Lee, S.H., Chai, J.Y. 2006. A survey of cryptosporidiosis among 2,541 residents of 25 coastal islands in Jeollanam-Do (Province), Republic of Korea. *Korean J Parasitol* 44, 367–372.
- 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.
- Pavlásek, I., Ryan, U. 2007. The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Vet Parasitol* 144, 349–352.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Iversen, A.M., Stanley, P.J., McLauchlin, J. 2001a. 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.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Nichols, G.L., McLauchlin, J. 2001b. Nested poly-merase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg Infect Dis* 7, 49–56.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C., McLauchlin, J. 2000. The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiol Lett* 189, 189–194.
- Peng, M.M., Meshnick, S.R., Cunliffe, N.A., Thindwa, B.D., Hart, C.A., Broadhead, R.L., Xiao, L. 2003. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *J Eukaryot Microbiol* 50, 557–559.
- Pereira, S.J., Ramirez, N.E., Xiao, L., Ward, L.A. 2002. Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *J Infect Dis* 186, 715–718.

- Perrucci, S., Buggiani, C., Sgorbini, M., Cerchiai, I., Otranto, D., Traversa, D. 2011. *Cryptosporidium parvum* infection in a mare and her foal with foal heat diarrhoea. *Vet Parasitol* 182, 333–336.
- Peyaretaillade, E., Broussole, V., Peyret, P., Méténier, G., Gouy, M., Vivares, C.P. 1998. Microsporidia, amitochondrial protist, possess a 70-kDa heat shock protein gene 1. of mitochondrial evolutionary origin. *Mol Biol Evol* 15, 683–689.
- Pospischil, A., Stiglmaier-Herb, M.T., Hegel, G., Wiener, H. 1987. Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazells. *Vet Rec* 112, 379–380.
- Ramirez, N.E., Ward, L.A., Sreevatsat, S. 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect* 6, 773–785.
- Rašková, V., Květoňová, D., Sak, B., McEvoy, J., Edwinston, A., Stenger, B., Kváč, M. 2013. Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *J Clin Parasitol* 51, 360–362.
- Reetz, J., Rinder, H., Thomschke, A., Manke, H., Schwebs, M., Bruderek, A. 2002. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *Int J Parasitol* 32, 785–787.
- Ren, X., Jinfeng Zhao, J., Zhang, L., Ning, Ch., Jian, F., Wang, R., Lv, Ch., Wang, Q., Arrowood, M.J., Xiao, L. 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp Parasitol* 130, 274–281.
- Rinder, H., Dengjel, B., Gothe, R., Loscher, T. 2000. Microsporidiosis of man: where is the reservoir? *Mitt Osterr Ges Tropenmed Parasitol* 22, 1–6.
- Robinson, G., Elwin, K., Chalmers, R.M. 2008. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerg Infect Dis* 9, 1174–1176.
- Rosberger, D.F., Serdarevic, O.N., Erlandson, R.A., Bryan, R.T., Schwartz, D.A., Visvesvara, G.S., Keenan, P.C. 1993. Successful treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with tropical fumagillin in a patient with AIDS. *Cornae* 12, 261–265.

- Ryan, U., Papparini, A., Tong, K., Yang, R., Gibson-Kueh, S., O'Hara, A., Lymbery, A., Xiao, L. 2015. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp Parasitol* 150, 31–35.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A.A., Pavlásek, I. 2003. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 69, 4302–4307.
- 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.
- Santín, M., Dixon, B.R., Fayer, R. 2005. Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from ringed seals (*Phoca hispida*) in Northern Quebec, Canada. *J Parasitol* 91, 712–716.
- Santín, M., Fayer, R. 2011. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Res Vet Sci* 90, 363–371.
- Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R. 2004. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in post-weaned dairy calves in the eastern United States. *Parasitol Res* 93, 287–289.
- Santín, M., Vecino, J.A., Fayer, R. 2010. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bieneusi* in horses. *J Parasitol* 96, 157–161.
- Schnyder, M., Kohler, L., Hemphill, A., Deplazes, P. 2008. Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *Vet Parasitol* 160, 149–154.
- Shadduck, J.A. 1980. Effect of fumagillin on *in vitro* multiplication of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Protozool* 27, 202–208.
- Shadduck J.A., Orenstein J.M. 1993. Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch Pathol Lab Med* 117, 1215–1219.
- Shadduck, J.A., Pakes, S.P. 1971. *Encephalitozoonosis* (nosematosis) and toxoplasmosis. *Am J Pathol* 64, 657–671.
- Silverlås, C., Björkman, C., Egenvall, A. 2009. Systematic review and meta-analyses of the effects of halofuginone against calf cryptosporidiosis. *Prev Vet Med* 91, 73–84.

- Silverlås, C., Bosaeus-Reineck, H., Naslund, K., Björkman, C. 2013. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? *Int J Parasitol* 43,155–161.
- Slavin, D. 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J Comp Pathol* 65, 262–270.
- Smith, H.V., Nichols, R.A., Grimason A.M. 2005a. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol* 21, 133–142.
- Smith, H.V., Nichols, R.A., Mallon, M., Macleod, A., Tait, A., Reilly, W.J., Browning, L.M., Gray, D., Reid, S.W., Wastling, J.M. 2005b. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. *Vet Rec* 156, 710–711.
- Snowden, K., Daft, B., Nordhausen, R.W. 2001. Morphological and molecular characterization of *Encephalitozoon hellem* in hummingbirds. *Avian Pathol* 30, 251–255.
- Snowden, K.F., Didier, E.S., Orenstein, J.M., Shaddock, J.A. 1998 Animal models of human microsporidial infections. *Lab Anim Sci* 48, 589–592.
- Snyder, S.P., England, J.J., McChesney, A.E. 1978. Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. *Vet Pathol* 15, 12–17.
- Sokolova, O.I., Demyanov, A.V., Bowers, L.C., Didier E.S., Yakovlev, A.V., Skarlato, S.O., Sokolova, Y.Y. 2011. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *J Clin Microbiol* 49, 2102–2108.
- Spano, F., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D.P., Crisanti, A. 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol Lett* 150, 209–217.
- Spano, F., Putignani, L., Naitza, S., Puri, C., Wright, S., Crisanti, A. 1998. Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 147–162.
- Sparfel, J.M., Sarfati, C., Liguory, O., Caroff, B., Dumoutier, N., Gueglio, B., Billaud, E., Raffi, F., Molina, J.M., Miegville, M., Derouin, F. 1997. Detection of

- microsporidia and identification of *Enterocytozoon bieneusi* in surface water by filtration followed by specific PCR. *J Eukaryot Microbiol* 44, 78.
- Sprague, V., Becnel, J.J., Hazard, E.I. 1992. Taxonomy of phylum Microspora. *Crit Rev Microbiol* 18, 285–395.
- Sprague, V., Vávra, J. 1976. Biology of the microsporidia (Eds. Bulla, L.A., Cheng, T.C.), *Comparative pathobiology*. vol. 1. Plenum Press, New York, 1–370.
- Stantic-Pavlinic, M., Xiao, L., Glaberman, S., Lal, A.A., Orazen, T., Rataj-Verglez, A., Logar, J., Berce, I. 2003. Cryptosporidiosis associated with animal contacts. *Wien Klin Wochenschr* 115, 125–127.
- Strong, W.B., 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.
- Sturdee, A.P., Bodley-Tickell, A.T., Archer, A., Chalmers, R.M. 2003. Longterm study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet Parasitol* 116, 97–113.
- Sulaiman, I.M., Fayer, R., Lal, A.A., Trout, J.M., Schaefer, F.W., Xiao, L. 2003. 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.
- Sulaiman, I.M., Morgan, U.M., Thompson, R.C., Lal, A.A., Xiao, L. 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl. Environ. Microbiol* 66, 2385–2391.
- Sunnotel, O., Lowery, C.J., Moore, J.E., Dooley, J.S.G., Xiao, L., Millar, B.C., Rooney, P.J., Snelling, W.J. 2006. Under the microscope: *Cryptosporidium*. *Lett Appl Microbiol* 43, 7–16.
- Szabo, J.R., Shaddock, J.A. 1987. Experimental encephalitozoonosis in neonatal dogs. *Vet Pathol* 24, 99–108.

- Szeredi, L., Pospischil, A., Dencso, L., Mathis, A., Dobos-Kovacs, M. 2007. A case of equine abortion caused by *Encephalitozoon* sp. *Acta Vet Hung* 55, 525–532.
- Talabani, 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.
- Teachey, D.T., Russo, P., Orenstein, J.M., Didier, E.S., Bowers, C., Bunin, N. 2004. Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 33, 299–302.
- Thelier, M., Breton, J. 2008. *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 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. *Ophthalmology* 108, 976–978.
- Thompson, H.P., Dooley, J.S., Kenney, J., McCoy, M., Lowery, J.E., Moore, J.E., Xiao, L. 2007. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol Res* 100, 619–624.
- Thompson, R.C.A., Olson, M.E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M.S., Hijawi, N.S. 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporiosis. *Adv Parasitol* 59, 77–158.
- Torres, J., Gracenea, M., Gomez, M.S., Arrizabalaga, A., Gonzalez-Moreno, O. 2000. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Vet Parasitol* 92, 253–260.
- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Peregrine, A.S., Duffield, T.F., Leslie, K.E. 2011. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. *Vet Rec* 168, 509.
- Trotz-Williams, L.A., Martin, D.S., Gatei, W., Cama, V., Peregrine, A.S., Martin, S.W., Nydam, D.V., Jamieson, F., Xiao, L. 2006. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitol Res* 99, 346–352.

- Trotz-Williams, L.A., Martin, S.W., Martin, D.S., Duffield, T., Leslie, K.E., Nydam, D.V., Jamieson, F., Peregrine, A.S. 2005. Multi-attribute evaluation of two simple tests for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf faeces. *Vet Parasitol* 134, 15–23.
- Tyzzar, E.E. 1910. An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J Med Res* 23, 394–414.
- Tyzzar, E.E. 1907. A sporozoan found in the peptic flanda of the common mouse. *Proc Doc Exp. Biol Med* 5, 12–13.
- Tyzzar, 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., Ward, H. 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect* 4, 1047–1058.
- Valigurová, A., Hofmannová, L., Koudela, B., Vavra, J. 2007. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *J Eucaryot Microbiol* 54, 495–510.
- Van Rensburg, I.B., Volkmann, D.H., Soley, J.T., Stewart, C.G. 1991. *Encephalitozoon infection* in a still-born foal. *J S Afr Vet Assoc* 62, 130–132.
- Vávra, J., Chalupský, J. 1982. Fluorescence staining of microsporidianspores with the brightener Calcofluor White M2R. *J Protozool* 29, 503.
- Vávra, J., Larsson, J.I.R. 1999. Structure of the microsporidia. In: *The microsporidia and microsporidiosis* (Eds. Wittner, M., Weiss, L.). AMS Press, Washington D. C., 7–84.
- Veronesi, F., Passamonti, F., Caccio, S., Diaferia, M., Piergili Fioretti, D. 2010. Epidemiological survey on equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Italy and molecular characterization of isolates. *Zoonoses Public Health* 57, 510–517.
- Villacorta, I., Peeters, J.E., Vanopdenbosch, E., Ares-Mazas, E., Theys, H. 1991. Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 283–287.
- Vossbrinck, C.R., Woese, C.R. 1986. Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* 320, 257–288.

- Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Buňatová, Z., Civišová, H., Maršálek, M., Kváč, M. 2012. *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* in horses kept under different management systems in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 190, 573–577.
- Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Maršálek, M., Langrová, I., Kváč, M. 2013. Humoral immune response and spreading of *Encephalitozoon cuniculi* infection in experimentally infected ponies. *Vet Parasitol* 197, 1– 6.
- Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., McEvoy, J., Rost, M., Perek Matysiak, A., Kváč, M. 2015. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* as *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in Czech Republic and Poland. *Parasitol Res* 114, 1619 –1624.
- Wang, R., Wang, H., Sun, Y., Zhang, L., Jian, F., Qi, M., Ning, C., Xiao, L. 2011. Characteristics of *Cryptosporidium* transmission in preweaned dairy cattle in Henan, China. *J Clin Microbiol* 49, 1077–1082.
- Wasson, K., Peper. R. L. 2000. Mammalian microsporidiosis. *Vet Pathol* 37, 113–128.
- Weber, R., Bryan, R.T., Schwartz, D.A., Owen, R.L. 1994. Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 7, 426–461.
- Weber, R., Ledergerber, B., Zbinden, R., Altwegg, M., Pfyffer, G.E., Spycher, M.A., Briner, J., Kaiser, L., Opravil, M., Meyenberger, C., Flepp, M. 1999. 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.
- Widmer, G., Akiyoshi, D., Buckholt, M.A., Feng, X., Rich, S.M., Deary, K.M., Bowman, C.A., Xu, P., Wang, Y., Wang, X., Buck, G.A., Tzipori, S. 2000. Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol* 108, 187–197.
- Widmer, G., Klein, P., Bonilla, R. 2007. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology* 134, 1583–1588.
- Wright, J.H., Craighead, E.M. 1922. Infectious motor paralysis in young rabbits. *J Exp Med* 36, 135–140.



- Wu, Z., Nagano, I., Boonmars, T., Nakada, T., Takahashi, Y. 2003. Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP-single-strand conformational polymorphism analyses. *Appl Environ Microbiol* 69, 4720–4726.
- Xiao, L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp Parasitol* 124, 80–89.
- Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H., Lal, A.A. 2001a. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis* 7, 492–497.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 17, 72–97.
- Xiao, L.H., Feng, Y.Y. 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52, 309–323.
- Xiao, L., Hlavsa, M.C., Yoder, J., Ewers, C., Dearen, T., Yang, W., Nett, R., Harris, S., Brend, S.M., Harris, M., Onischuk, L., Valderrama, A.L., Cosgrove, S., Xavier, K., Hall, N., Romero, S., Young, S., Johnston, S.P., Arrowood, M., Roy, S., Beach, M.J. 2009. Subtype analysis of *Cryptosporidium* specimens from sporadic cases in four U.S. states in 2007: the wide occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and a case report of an infection with the *Cryptosporidium* horse genotype. *J Clin Microbiol* 47, 3017–3020.
- Xiao, L., Herd, R.P. 1994a. Review of equine *Cryptosporidium* infections. *Equine Vet J* 26, 9–13.
- Xiao, L., Herd, R.P. 1994b. Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Equine Vet J* 26, 14–17.
- Xiao, L., Li, L., Moura, H., Sulaiman, I., Lal, A.A., Gatti, S., Scaglia, M., Didier, E.S., Visvesvara, G. 2001b. Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. *J Clin Microbiol* 39, 2191–2196.
- Xiao, L., Ryan, U.M. 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr Opin Infect Dis* 17, 483–490.

Ziegler, P.E., Wade, S.E., Schaaf, S.L., Stern, D.A., Nadareski, C.A., Mohammed, H.O.  
2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a  
watershed landscape in southeastern New York State. *Vet Parasitol* 147, 176–184.

## 9. PŘÍLOHY

### Publikace I.

Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Buňatová, Z., Civišová, H., Maršálek, M., Kváč, M. 2012. *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* in horses kept under different management systems in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 190, 573–577.



## Short communication

## *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* in horses kept under different management systems in the Czech Republic

Pavla Wagnerová<sup>a,b</sup>, Bohumil Sak<sup>b,\*</sup>, Dana Květoňová<sup>b</sup>, Zita Buňatová<sup>a</sup>, Hana Civišová<sup>a</sup>, Miroslav Maršálek<sup>a</sup>, Martin Kváč<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 March 2012

Received in revised form 20 June 2012

Accepted 12 July 2012

## Keywords:

Horse

*Enterocytozoon bieneusi*

*Encephalitozoon cuniculi*

PCR

ITS

Natural infection

## ABSTRACT

Faecal samples were collected from 377 horses on 23 farms with varying management systems in the Czech Republic. Microsporidia were found on 16 farms and the overall prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* was 17.3% (66/377) and 6.9% (26/377), respectively. The prevalence of *E. cuniculi* in horses over 3 years of age was significantly higher (10.0%) compared to younger horses (4.0%). No significant differences in prevalence were observed among stallions, geldings, and mares for both microsporidia. Significantly higher infection rates of *E. bieneusi* and *E. cuniculi* were recorded in horses kept in stables than those on pasture. Two genotypes of *E. cuniculi* (I and II) and 15 genotypes of *E. bieneusi* including six previously described and nine novel genotypes were detected. The most common genotype detected was *E. bieneusi* genotype D identified in 51.5% (34/66) of positive horses. The identification of *E. bieneusi* genotypes D, EpbA, G and WL15, which were previously reported in pigs, humans, racoons and horses, indicates that horses could be a potential source of zoonotic infection in humans.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Microsporidia are obligate intracellular parasites that infect a wide range of vertebrate and invertebrate hosts. There are approximately 1200 species of microsporidia, but only 14 species are important opportunistic pathogens in humans (Didier and Weiss, 2006). The most common microsporidial species infecting humans are *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Encephalitozoon hellem* (Didier et al., 2004). *E. bieneusi* has been identified in several wild and domestic animals except horses for a long time (Buckholt et al.,

2002; Reetz et al., 2002; Fayer et al., 2003; Santín et al., 2004). Although microsporidia were not detected in horses and donkeys in Spain and Switzerland (Breitenmoser et al., 1999; Lores et al., 2002), horses from four geographic locations in Columbia were recently found to be positive for the presence of *E. bieneusi* (Santín et al., 2010). *E. cuniculi* has rarely been reported to cause abortion and placentitis in mares. A Lipizzan mare infected with *E. cuniculi* aborted a few days before foaling without clinical signs (Szeredi et al., 2007). *E. cuniculi* was identified in a stillborn male Clydesdale foal in South Africa (Van Rensburg et al., 1991) and late-term aborted female Quarter Horse foetus from the United States (Patterson-Kane et al., 2003).

The purpose of this study was to investigate the occurrence and prevalence of the microsporidial species *E. bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. in horses and evaluate statistical associations between infections, age, sex and farm management.

\* Corresponding author at: Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic. Tel.: +420 387775419; fax: +420 385310388.

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

## 2. Materials and methods

On two consecutive years (2010 and 2011), faecal samples were collected from 377 horses of different ages (1 day to 39 years) on 23 farms in the Czech Republic with various management systems including horses kept exclusively on pasture (pasture), exclusively in stables (stable), and a combination of pasture and stables (paddock). Two farms used two separate management systems (pasture and stable). All farms were exclusively horse farms, with the exception of farms 5, 11, and 12, which had other animals such as pigs and cattle. Samples were collected directly from the rectum or mostly immediately after defecation. A total of 94 horses from 5 farms were kept in the stable, 122 horses from 10 farms were kept on pasture and 161 horses from 10 farms were kept in paddocks (Table 1). An individual faecal sample was taken from each horse, placed into a sterile plastic container, and transported in an isotherm box to the laboratory for examination. Faecal samples were homogenized by 0.5 mm glass bead disruption and DNA was extracted according to Sak et al. (2008). Extracted DNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . A nested PCR protocol was used to amplify the internal transcribed spacer (ITS) region of the rRNA gene of *E. bieneusi*, as previously described by Buckholt et al. (2002). Two primer sets, INT580F and INT580R (Didier et al., 1995) and MSP3 and MSP4A (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996), were used to amplify the ITS region of *Encephalitozoon* spp. Positive control DNA isolated from *E. intestinalis* and *E. bieneusi* genotype D spores and negative inhibition controls were included in each run. PCR products were visualized following electrophoresis on a 2% agarose gel containing 0.2 g/ml ethidium bromide. PCR products were sequenced in both directions on an ABI 3730XL sequence analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequences were assembled, edited, and aligned using the ChromasPro (Technelysium, Pty, Ltd.), BioEdit, and Clustal X (version 2.0.6) programs and were compared with sequences in GenBank. The evolutionary history of aligned sequences was inferred using the neighbour-joining method based on the Kimura-2-parameter distance model. The number of bootstrap replicates was 1000. Trees were constructed using TREECON version 1.3b. Sequences generated in this study were deposited under GenBank ID: JQ804971–JQ804979. The associations between infections with microsporidia and potential risk factors, such as different housing conditions, age and sex were analysed using the programs Statistica, Release 5.1 Software (Statsoft, Tulsa, OK, USA, 1997) and Epi Info (TM) 3.5.3 (Centers for Disease Control and Prevention, USA). We used Chi-square and Student's *t*-test statistics to evaluate differences in continuous variables. Odds ratios were calculated to determine the significance of risk factor variables.

## 3. Results

Microsporidia were found on 16 out of the 23 farms. Of the 377 horse examined, 66 (17.3%) and 26 (6.9%) were positive for *E. bieneusi* and *E. cuniculi*, respectively (Table 1). Twelve horses were concurrently infected with *E. bieneusi* and *E. cuniculi* (data not shown). *E. bieneusi* and *E. cuniculi* were detected on 15 and 8 farms, respectively. With

one exception, *E. cuniculi* infections were detected on farms where *E. bieneusi* was also present (Table 1).

The prevalence of microsporidial genera showed no sex-dependent association; 17.1% of stallions, 10.9% geldings, and 21.4% of mares were positive for *E. bieneusi*, and 5.3% stallions, 9.3% geldings, and 7.9% mares were positive for *E. cuniculi* (data not shown). The prevalence of *E. bieneusi* in horses <3 years (15.7%) and horses >3 years (19.6%) was not significantly different. However, there was a significantly higher prevalence of *E. cuniculi* in horses >3 years (10.0%) compared to horses <3 years (4.0%,  $P=0.0213$ ). Microsporidia were detected on farms using all management strategies (Table 1). There was a significantly higher prevalence of *E. bieneusi* in stabled horses (26.6%, odds ratio = 2.10,  $P=0.0097$ ) than horses from other management strategies (14.8%) (Table 1). Similarly, *E. cuniculi* was more prevalent in stabled horses (12.8%, odds ratio = 2.85,  $P=0.0086$ ) than horses from other management strategies (4.9%).

Sequence analysis of the ITS region of *E. cuniculi* revealed two genotypes, I ( $n=13$ ) and II ( $n=13$ ). Genotype I was only found on two farms (Table 1). Fifteen *E. bieneusi* genotypes were detected (Table 1). Genotypes D, WL15, G, EpbA, Horse 1, and Horse 2 were reported previously in various hosts, including horses. Nine new genotypes (Horse 3–11) were detected (Table 1). As shown in Fig. 1, phylogeny segregated the sequences into several major groups and an outlier group, all of which were supported by a bootstrap value greater than 50%. Six of the new genotypes, Horse 6–11, clustered with genotypes D, PIGEBITS 6, or Peru 17 reported in pigs and humans. The ITS sequence identified as genotype Horse 5 matched most closely (97.9–98.3% sequence similarity) with a group of genotypes reported from muskrats and raccoons (WL14 and WL15). Genotype Horse 4 was related to the previously reported horse-specific genotype Horse 1 (99.6% similarity). The comparison of ITS sequences of genotype Horse 3 showed that the closest match (83.4% similarity) was with genotype PtEb VIII isolated from cat.

The distribution of *E. bieneusi* genotypes on farms is presented in Table 1. Genotype D, which was detected in 34 of 66 horses, was the most frequently detected genotype. Horse 1 and Horse 2, which were detected in 7 and 8 animals, respectively, were the most frequently occurring host-specific genotypes. Other genotypes were detected either in a few horses (G, Horse 3, Horse 11) or in a single horse (WL15, EpbA, Horse 4–10) (Fig. 1).

## 4. Discussion

Microsporidia represent one of the most prevalent groups of intracellular parasites, with an extensive zoological distribution, including most animal species. Four *E. cuniculi* genotypes have been identified using biochemical, immunological, and molecular approaches (Talabani et al., 2010). Over 100 *E. bieneusi* genotypes have been identified to date based on ITS region variability, including 34 in humans, 11 in both humans and animals, 12 in cattle, 11 in pigs, and other host-adapted genotypes in specific animal groups (Santín and Fayer, 2011). Results of the present study show that microsporidia could be a common

**Table 1**  
Overview of genotypes found in different farms and positive horses according to age.

Farms	No. of horses	Age	
		<3 year	>3 year
<b>Stable</b>			
1	9	1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 7	–
2	8	–	1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 1
3	16	–	1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 3
4	15	–	2 × <i>E. bieneusi</i> D, 1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 10, 2 × <i>E. bieneusi</i> Horse 11, 3 × <i>E. cuniculi</i> II
5	46	3 × <i>E. bieneusi</i> D, 1 × <i>E. bieneusi</i> WL15, 1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 4, 1 × <i>E. cuniculi</i> I	7 × <i>E. bieneusi</i> D, 3 × <i>E. bieneusi</i> Horse 1, 1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 5, 1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 8, 8 × <i>E. cuniculi</i> I
Subtotal	94	7	30
<b>Pasture</b>			
2	7	–	–
5	23	6 × <i>E. bieneusi</i> D, 2 × <i>E. bieneusi</i> Horse 1	1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 1, 3 × <i>E. bieneusi</i> G, 4 × <i>E. bieneusi</i> D, 2 × <i>E. cuniculi</i> I
6	18	–	1 × <i>E. cuniculi</i> II
7	10	–	–
8	16	1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 2	2 × <i>E. bieneusi</i> Horse 2
9	8	–	–
10	17	1 × <i>E. cuniculi</i> II	1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 3, 2 × <i>E. cuniculi</i> II
11	4	–	1 × <i>E. bieneusi</i> EpbA
12	10	1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 2, 1 × <i>E. bieneusi</i> EpbA	–
13	9	–	–
Subtotal	122	12	17
<b>Paddock</b>			
14	14	2 × <i>E. bieneusi</i> Horse 2	2 × <i>E. bieneusi</i> Horse 2
15	9	–	–
16	30	1 × <i>E. bieneusi</i> D, 1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 9, 2 × <i>E. cuniculi</i> II	–
17	37	2 × <i>E. bieneusi</i> D, 3 × <i>E. cuniculi</i> II	–
18	5	–	–
19	3	–	2 × <i>E. bieneusi</i> D, 2 × <i>E. cuniculi</i> I
20	34	5 × <i>E. bieneusi</i> D, 1 × <i>E. cuniculi</i> II	–
21	13	2 × <i>E. bieneusi</i> D, 1 × <i>E. bieneusi</i> Horse 6	–
22	10	–	–
23	6	–	–
Subtotal	161	20	6
Total	377	39	53

**Stable:** each horse was kept individually in a separate box without access to pasture. **Pasture:** horses were grazed in a group in an extensive pasture all the year round. **Paddock:** each horse was kept individually in a separate box overnight and in groups (3–10 animals each) in paddocks over day.

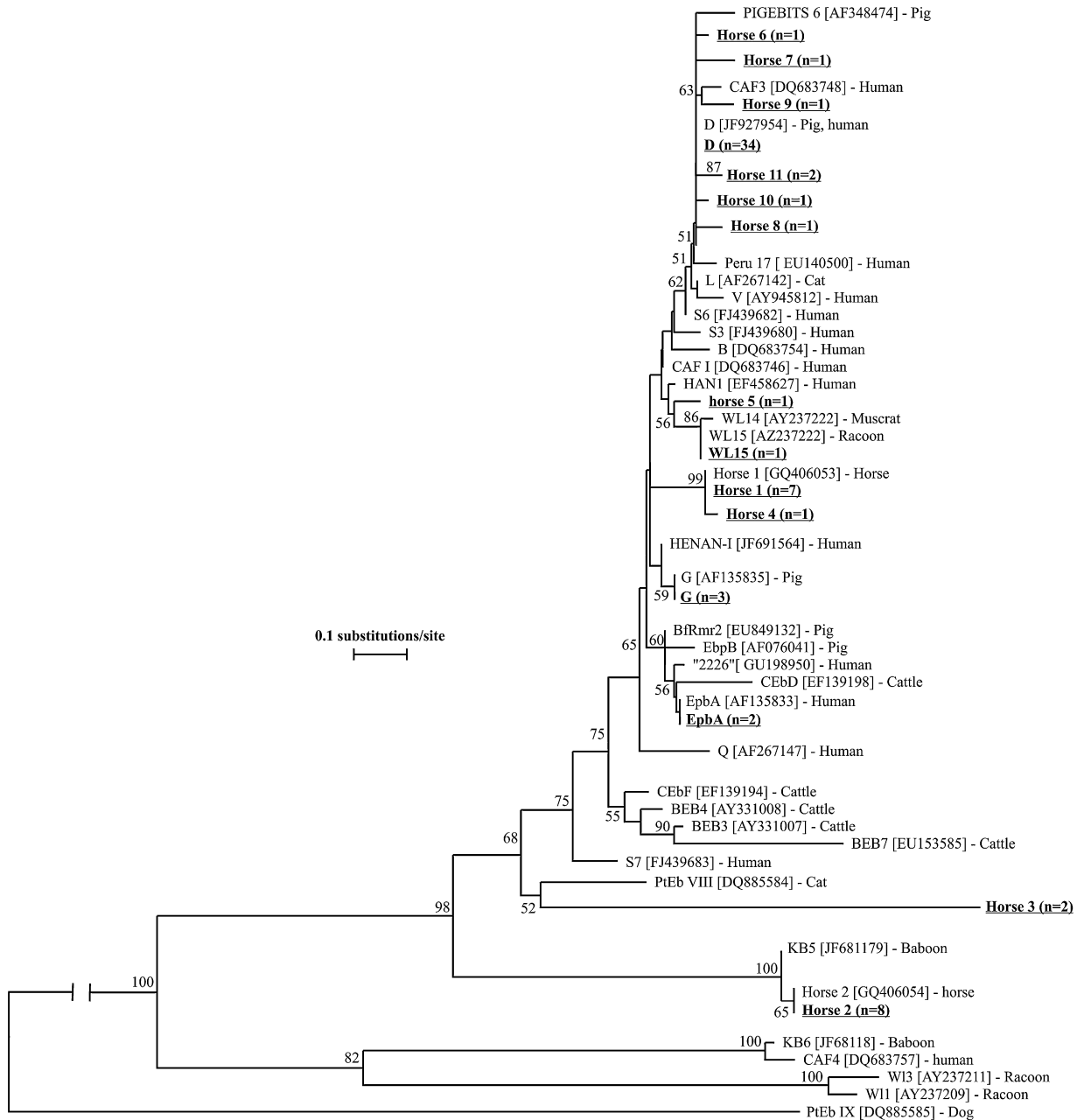
parasite in horses, since they were identified on 16 out of 23 farms regardless of management strategy; however, stabled horses were more frequently infected than pasture or paddock-kept horses. The higher prevalence among these horses could be explained by a higher parasitic pressure in stables caused by an elevated number of new incomers compared to horses kept on pasture, where the individuals in the herd stay mostly the same.

Although the proposed hypothesis about predominant parasitism in males (Klein, 2004) was previously confirmed in males in dogs, cats, mice and fur-bearing wild mammals infected with microsporidia (Sulaiman et al., 2003b; Santín et al., 2006, 2008; Sak et al., 2011), no statistical differences in the prevalence of *Encephalitozoon* spp. and *E. bieneusi* among stallions, geldings and mares were observed in the present study.

Compared to the results of Santín et al. (2010), where the prevalence of *E. bieneusi* was higher in horses younger than 1 year of age than in older horses, no age associated differences of *E. bieneusi* prevalence were observed in

present study. Moreover, the prevalence of *E. cuniculi* was significantly higher in horses older than 3 years. Although no clinical signs were observed in microsporidia-positive horses in the present study, *E. cuniculi* is reported to be a potential causative agent of reproductive problems in horses, including placentitis, abortion, or stillbirth (Van Rensburg et al., 1991; Patterson-Kane et al., 2003).

*Enterocytozoon bieneusi* genotypes Horse 2 and Horse 3 are probably host-specific, since they are located separately in the phylogenetic tree. Genotype Horse 2 (detected in 8 horses on 3 farms) occurred more frequently than Genotype Horse 1 (detected in 4 horses on 2 farms) in the present study. This finding is in contrast to a previous study, which found a higher prevalence of genotype Horse 1 (62%) than Horse 2 (19%) in South American horses (Santín et al., 2010). Given that genotypes Horse 6–11 are cluster with non-specific genotype D in a neighbour-joining tree, it is possible that these genotypes are similarly non host-specific and zoonotic. Genotype D, the most frequently detected genotype in this study, is a widespread genotype,



**Fig. 1.** Neighbour-joining tree based on nucleotide sequences of whole ITS region of *Enterocytozoon bieneusi* isolates, including those detected in our study (highlighted, underlined). Values on branches are percent bootstrapping using 1000 replicates. The bootstrap proportions greater than 50% are shown at each branch. Nucleotide sequences generated from this study were deposited in the GenBank under Accession numbers JQ804971–JQ804979 (Horse 3–Horse 11).

which on the basis of standardized nomenclature belongs to group 1 (Thellier and Breton, 2008). Group 1 is the largest of five groups, and genotypes within this group have been isolated from a wide diversity of hosts worldwide, including humans, pigs, cattle, beavers, foxes, muskrats, raccoons, falcons, dogs and macaques (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; Müller et al., 2008; Sak et al., 2008). This group also includes less

common genotypes, EpbA, G and WL15 (Peru 14) (Thellier and Breton, 2008). Moreover, genotypes Horse 1, Horse 4 and Horse 5 detected in present study cluster with WL15, which is a group 1 member.

The previous detection of genotypes G and EpbA in pigs in Germany (Rinder et al., 2000; Dengjel et al., 2001) could explain our finding of these genotypes in horses on farms 5, 11 and 12, where other farm animals such as pigs and cattle were kept. Genotype WL15 was previously



detected in humans in Peru (Cama et al., 2007), and a fox, beaver, muskrat, and raccoon in the USA (Sulaiman et al., 2003b); however, we found this genotype in a 4-month-old stabled foal on one farm, which differs from the other farms in this study in having a higher proportion of horses of different ages. Incoming horses were imported from various countries including Poland, Netherlands and Slovakia, which could explain the higher occurrence of various genotypes.

The source of *E. cuniculi* infection remain unknown, since *E. cuniculi* genotypes are not host specific and have been identified in variety of animal hosts such as rodents, lagomorphs, carnivores, human and nonhuman primates, and birds (Canning and Hollister, 1987; Reetz, 1993; Kašičková et al., 2009). However, since we found *E. cuniculi* genotype I predominantly in stabled horses and *E. cuniculi* genotype II predominantly in horses on pasture, it is possible that these genotypes have different sources.

This study confirms that horses are parasitized by various *E. cuniculi* genotypes and both host-specific and zoonotic *E. bienersi* genotypes. Thus, horses could be considered to be a potential source of infection in humans.

## Acknowledgements

This study was supported by projects of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 6007665806) and by the project of the Grant Agency of University of South Bohemia (022/2010/Z). The authors thank all farmers involved in the project for providing data and biology material for our research. The authors wish to thank to Dr. John McEvoy for his critical reading and language correction of the manuscript.

## References

- Breitenmoser, A.C., Mathis, A., Bürgi, E., Weber, R., Deplazes, P., 1999. High prevalence of *Enterocytozoon bienersi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. *Parasitology* 118, 447–453.
- Buckholt, M.A., Lee, J.H., Tzipori, S., 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bienersi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2595–2599.
- Cama, V.A., Pearson, J., Cabrera, L., Pacheco, L., Gilman, R., Meyer, S., Ortega, Y., Xiao, L., 2007. Transmission of *Enterocytozoon bienersi* between a child and guinea pigs. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2708–2710.
- Canning, E.U., Hollister, W.S., 1987. Microsporidia of mammals – widespread pathogens or opportunistic curiosities? *Parasitol. Today* 3, 267–273.
- Chalifoux, L.V., Carville, A., Pauley, D., Thompson, B., Lackner, A.A., Mansfield, K.G., 2000. *Enterocytozoon bienersi* as a cause of proliferative serositis in simian immunodeficiency virus-infected immunodeficient macaques (*Macaca mulatta*). *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124, 1480–1484.
- Dengjel, B., Zahler, M., Hermanns, W., Heinritz, K., Spillmann, T., Thomschke, A., Loscher, T., Gothe, R., Rinder, H., 2001. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bienersi*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4495–4499.
- Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K., Didier, P.J., 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources of modes of transmission. *Vet. Parasitol.* 126, 145–166.
- Didier, E.S., Vossbrinck, C.R., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C., Shaddock, J.A., 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111, 411–421.
- Didier, E.S., Weiss, L.M., 2006. Microsporidiosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 485–492.
- Esporn, A., Morio, F., Miegville, 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., Santín, M., Trout, J.M., 2003. First detection of microsporidia in dairy calves in North America. *Parasitol. Res.* 90, 383–386.
- 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.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Löscher, T., Rinder, H., 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health* 1, 373–378.
- Klein, S.L., 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol.* 26, 247–264.
- Lobo, M.L., Xiao, L., Cama, V., Stevens, T., Antunes, F., Matos, O., 2006. Genotypes of *Enterocytozoon bienersi* in mammals in Portugal. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, 61–64.
- Lores, B., del Aguila, C., Arias, C., 2002. *Enterocytozoon bienersi* (microsporidia) in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 941–945.
- Müller, M.G., Kinne, J., Schuster, R.K., Walochnik, J., 2008. Outbreak of microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bienersi* in falcons. *Vet. Parasitol.* 152, 67–78.
- 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.
- Reetz, J., 1993. Natürliche Mikrosporidien (*Encephalitozoon cuniculi*) infektionen bei Hühnern. *Tierärztl. Prax.* 21, 429–435.
- Reetz, J., Rinder, H., Thomschke, A., Manke, H., Schwesb, M., Bruderek, A., 2002. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bienersi* in non-mammalian hosts (chickens). *Int. J. Parasitol.* 32, 785–787.
- Rinder, H., Dengjel, B., Gothe, R., Loscher, T., 2000. Microsporidiosis of man: where is the reservoir? *Mitt. Oesterr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* 22, 1–6.
- Sak, B., Kváč, M., Hanzlíková, D., Cama, V., 2008. First report of *Enterocytozoon bienersi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 153, 220–224.
- Sak, B., Kváč, M., Květoňová, D., Albrecht, T., Piálek, J., 2011. The first report on natural *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon* spp. infections in wild East-European House Mice (*Mus musculus musculus*) and West-European House Mice (*M. m. domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic–Germany border. *Vet. Parasitol.* 178, 246–250.
- Santín, M., Cortes Vecino, J.A., Fayer, R., 2008. *Enterocytozoon bienersi* in dogs in Bogota, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 215–217.
- Santín, M., Fayer, R., 2011. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bienersi* in domesticated and wild animals. *Res. Vet. Sci.* 90, 363–371.
- Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2004. Prevalence of *Enterocytozoon bienersi* in post-weaned dairy calves in the eastern United States. *Parasitol. Res.* 93, 287–289.
- Santín, M., Trout, J.M., Cortes Vecino, J.A., Dubey, J.P., Fayer, R., 2006. Cryptosporidium *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in cats from Bogota (Columbia) and genotyping of isolates. *Vet. Parasitol.* 141, 334–339.
- Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2005. *Enterocytozoon bienersi* genotypes in dairy cattle in the eastern United States. *Parasitol. Res.* 97, 535–538.
- Santín, M., Vecino, J.C.A., Fayer, R., 2010. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bienersi* in horses. *J. Parasitol.* 96, 157–161.
- 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 bienersi* in HIV infected patients in Lima, Peru. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50, 591–596.
- Sulaiman, I.F., Fayer, R., Lal, A.A., Trout, J.M., Schaefer 3rd, F.W., Xiao, L., 2003b. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbour host-adapted *Enterocytozoon* spp as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bienersi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4495–4501.
- Szeredi, L., Pospischil, A., Dencso, L., Mathis, A., Dobos-Kovács, M., 2007. A case of equine abortion caused by *Encephalitozoon* sp. *Acta Vet. Hung.* 55, 525–532.
- Talabani, 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.
- Thellier, M., Breton, J., 2008. *Enterocytozoon bienersi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15, 349–358.
- Van Rensburg, I.B., Volkmann, D.H., Soley, J.T., Stewart, C.G., 1991. Encephalitozoon infection in a still-born foal. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 62, 130–132.



## **Publikace II.**

Wagnerová, P., Sak, B., **Květoňová, D.**, Maršálek, M., Langrová, I., Kváč, M. 2013. Humoral immune response and spreading of *Encephalitozoon cuniculi* infection in experimentally infected ponies. *Vet Parasitol* 197, 1–6.



## Humoral immune response and spreading of *Encephalitozoon cuniculi* infection in experimentally infected ponies



Pavla Wagnerová<sup>a,b</sup>, Bohumil Sak<sup>b,\*</sup>, Dana Květoňová<sup>b</sup>, Miroslav Maršálek<sup>a</sup>,  
Iva Langrová<sup>c</sup>, Martin Kváč<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>c</sup> Faculty of Agrobiological Sciences, Czech University of Life Sciences in Prague, Kamycka 129, 165 21 Prague 6-Suchbát, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 March 2013

Received in revised form 18 April 2013

Accepted 7 May 2013

#### Keywords:

Ponies

*Encephalitozoon cuniculi* genotype II

PCR

Antibodies

Experimental infection

### ABSTRACT

A total of 9 (8 stallions and 1 mare) 1 year old ponies were used for the experimental infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II ( $10^7$  spores per animal). Subsequently, individual horses were slaughtered 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, and 63 days post infection. Immediately after slaughter, tissues samples of stomach, duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon, spleen, liver, kidney, bladder, heart, lungs, and brain were sampled. In addition, urine, feces and blood specimens were collected. Enzyme-linked immunosorbent assay was used for determination of humoral immune response and nested PCR targeting 16S rDNA, whole ITS, and 5.8S rDNA was used for detection of *E. cuniculi* in collected organs, blood, feces and urine. No clinical signs of microsporidiosis including diarrhea or colic, neurological signs and fever were observed in any horses during whole experiment. Acute microsporidiosis in ponies was characterized by the dissemination of microsporidia into almost all organs and significant increase of concentration of specific antibodies in blood was observed from 28 to 42 DPI. After this acute stage microsporidia disappeared from most organs with the exception of the kidney, which was positive up to 63 DPI when the experiment was terminated. No pathological changes were observed in any organs with exception of one mare's brain, where *E. cuniculi*-positive cavity measuring 5 cm × 3 cm in diameter formed in the *lobus piriformis*.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Microsporidia are obligate intracellular protozoan parasites that infect a wide range of hosts, including vertebrates and invertebrates (Canning and Lom, 1986). Microsporidia are considered to be opportunistic pathogens, because

they are primarily the cause of disease when the host's immunity is reduced and so the parasite can easily over-spread (Shadduck et al., 1979). Out of more than 1400 described microsporidia species from at least 170 genera, only 14 species have been reported as opportunistic pathogens in mammals (Wittner and Weiss, 1999; Didier and Weiss, 2006). Domestic animals including horses are most often infected with four microsporidia namely *Enterocytozoon bieneusi*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis* and *E. hellem* (Wasson and Peper, 2000; Buckholt et al., 2002; Reetz et al., 2002; Fayer et al., 2003; Santín et al., 2004; Mathis et al., 2005; Franzen, 2008). Although the zoonotic

\* Corresponding author at: Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic. Tel.: +420 387775419; fax: +420 385310388.

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

character of *Encephalitozoon* spp. and *E. bienersi* was confirmed in the past (De Grotte et al., 1995; Mathis et al., 2005) and microsporidia are responsible for various pathological changes including infection affecting the nervous system, respiratory and digestive tract, causing inflammation of the liver, peritoneum, lung, bladder and kidney (Weber et al., 1994; Mertens et al., 1997; Didier et al., 1998), it was generally erroneously assumed, that immunocompetent hosts are able to clean infection by the means of T-cell mediated immunity (Braunfuchsová et al., 2001; Sak et al., 2006; Lawlor et al., 2010). However, recent studies showed that *E. cuniculi* causes chronic infection in both immunocompetent and immunodeficient humans, wild and domestic animals with potentially fatal course (Weber et al., 1997; Künzel and Joachim, 2010; Sak et al., 2010; Ditrich et al., 2011). The latest data suggest, that immunologically competent hosts that are naturally infected with *E. cuniculi* may not express any clinical signs, infection becomes latent and could be relapsed following immunosuppression (Kotková et al., 2013).

*E. cuniculi*, which is one of the major agents of microsporidiosis in immunocompetent individuals, is most frequent microsporidium found in horses (Santín et al., 2010; Wagnerová et al., 2012). In addition, *E. cuniculi* was reported to cause abortion and placentitis in mares; a Lipizzan mare aborted a few days before foaling without any clinical signs (Szeredi et al., 2007). This microsporidian was also demonstrated in a stillborn male of Clydesdale foal in South Africa (Van Rensburg et al., 1991) and late-term aborted female fetus of Quarter Horse from the United States (Patterson-Kane et al., 2003). Currently, there is very limited information about course of infection during the latent phase and factors triggering relapse of infection (Kotková et al., 2013). All around the world, horses play a role in economics and microsporidia could be agents of diseases with unidentified cause. The purpose of this study was to evaluate the dynamics and spreading of experimental infections caused by *E. cuniculi* in different organs and tissues in the ponies breed minishetland and to compare the progression of the infection with anti-*E. cuniculi* antibody concentration.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethics statement

All of the experimental procedures were conducted in accordance with Czech legislation (section 29 of Act No. 246/1992 Coll., on protection of animals against cruelty, as amended by Act No. 77/2004 Coll.). We hereby declare that animal handling complies with the relevant European and international guidelines on animal welfare, namely Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and the guidelines and recommendations of the Federation of Laboratory Animal Science Associations. The study was approved by the University of South Bohemia, faculty on Agriculture in České Budějovice of the Czech Republic and Institutional and National Committees (protocols no. 070/2010).

### 2.2. Inoculum

Spores of *E. cuniculi* strain EC II originally isolated from a dexamethasone-treated laboratory mouse (Koudela et al., 1994) and grown *in vitro* in Green monkey kidney cells (VERO, line E6) maintained in RPMI-1640 medium (SIGMA) supplemented with 2.5% heat-inactivated fetal bovine serum were used for experiments. Spores were isolated and purified from cells by centrifugation over 50% Percoll (SIGMA) at 1100 × g for 30 min and washed three times in deionized water before storing in deionized water supplemented with antibiotics (SIGMA, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2.5 µg/ml amphotericin B) at 4 °C. Immediately before use the spores were washed in deionized water.

### 2.3. Experimental animals

A total of 9 (8 stallions and 1 mare) 1 year old ponies (minishetland) were used for the experimental infection in this study. Ponies were housed in the pathogen free stable, had no access to pasture during the experiment and were fed only hay and water *ad libitum*. All animals were tested daily for the presence specific microsporidial DNA in feces and urine using molecular methods for 2 weeks prior infection (Section 2.5). In addition, sera of all horses were weekly tested for presence of specific anti *E. cuniculi* antibodies using ELISA test before infection (Section 2.7). Groups of 8-week old SCID mice (AnLab, Czech Republic) were used as control animals for verification of infectivity of used inoculum.

### 2.4. Infectivity assays

All horses and SCID mice were infected with a dose of  $10^7$  *E. cuniculi* spores in 20 ml and 200 µl distilled water *via* a gastric tube, respectively. Subsequently, horses were slaughtered in a slaughterhouse 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 63 days post infection. Blood sample was taken into evacuated tubes from jugular vein of each horse before slaughtering. Immediately after slaughter, tissues samples of stomach, duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon, spleen, liver, kidney, bladder, heart, lungs, and brain were sampled. In addition, urine and feces specimens were collected. Spreading of *E. cuniculi* during the course of infection was evaluated on the basis of presence of specific microsporidial DNA in blood, tissue, fecal and urine samples using molecular methods and using histology examination of multiple samples taken from various locations of every tissue. If at least one of these multiplications were positive, the tissue was considered positive. Enzyme-linked immunosorbent assay was used for determination of humoral immune response. Infectivity of used inoculum was assessed on the basis of SCID mice succumb as previously described Sak et al. (2006).

### 2.5. DNA isolation

A total of 200 mg of fecal, 200 µl blood or 200 mg tissue sample were homogenized by bead disruption using a FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals, CA, USA) using

0.5 mm glass beads (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) at the speed of 5.5 m/s for 1 min. Total DNA was extracted using commercial column based isolation kits QIAamp® DNA Stool Mini Kit and DNeasy® Blood & Tissue Kit, respectively (both QIAGEN, Hilden, Germany). Acquired DNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.6. PCR amplification

Nested PCR protocol amplifying partial sequence of 16S rRNA, whole ITS (internal transcribed spacer), and partial sequence of 5.8S rRNA using modified microsporidia-specific primers described by De Bosschere et al. (2007) and Katzwinkel-Wladarsch et al. (1996) was used. The upstream primers M2F (CGG AGA GGA AGC CTT AGA GA) and MFNest (GAG AGA TGG CTA CTA CGT CCA AGG) were targeted to the 3' region of the SSU coding segment of *E. cuniculi*. The downstream primers M2R (ATA GTG ACG GGC GGT GTG T) and MSP1R (ACA GGG ACM CAT TCA) were targeted to the 5' region of the coding segment of *E. cuniculi*. For the primary PCR step, the PCR mixture contained 1× PCR buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each dNTPs, 1 U Taq, 1 μl BSA (10 μg), and 200 nM each primer. For the secondary PCR step, the PCR mixture was identical except that BSA was excluded. For both PCR steps a total of 35 cycles, each consisting of 94 °C for 45 s, 58 °C for 45 s, and 72 °C for 60 s, were performed. Initial incubation at 94 °C for 3 min., final extension at 72 °C for 7 min., and final soak at 4 °C were included. PCR products were visualized on a 1% agarose gel containing 0.2 μg/ml ethidium bromide. One to three randomly selected positive samples from each horse were sequenced directly in both directions using an ABI 3130 sequencer analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the identity of obtained sequences was examined by a BLAST search ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

## 2.7. Histology

Tissues samples were fixed in 10% buffered formalin and by the usual paraffin method. Five-micron sections were routinely stained with hematoxylin and eosin (HE), Brown and Brenn Gram stain (Brown and Brenn, 1931), Weber's modification of chromotrop (Weber et al., 1992) and Calcofluor M2R (Vávra and Chalupský, 1982).

## 2.8. Enzyme-linked immunosorbent assay

Sera were separated from the clotted blood samples by centrifugation at 2500 g for 10 min. Sera were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until testing. Elisa test used as the diagnostic method to determine specific anti *E. cuniculi* antibodies was performed according to the method of Hollister and Canning (1987). Briefly, *E. cuniculi* spores were incubated with serially diluted tested sera (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 and 1:512) along with negative (1:64) and positive (1:256) control serum specimens originating from naïve and naturally infected horses, and then with 1:10,000 diluted peroxidase labeled rabbit antihorse IgG (Anti Horse IgG Whole molecule, SIGMA). Serum specimens with titers >128 were considered positive on the basis of positive/negative control serum titration (data not shown). The color reaction was developed with 0.1 M acetate substrate solution (pH 5.5) supplemented with 2.5 mM o-phenyldiamine (OPD) and 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction was then stopped with 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## 2.9. Statistical analyses

The statistical evaluation of increase of titer and number of affected organs in individual animals was utilized using student's *t*-test (Statistica 1, Release 5.1 Software, Statsoft, Tulsa, OK, USA, 1997). The correlation between occurrence of microsporidia in organs and antibody concentration was evaluated using Pearson's product-moment correlation in R 9.2.0 programming environment (R Development Core Team, 2007).

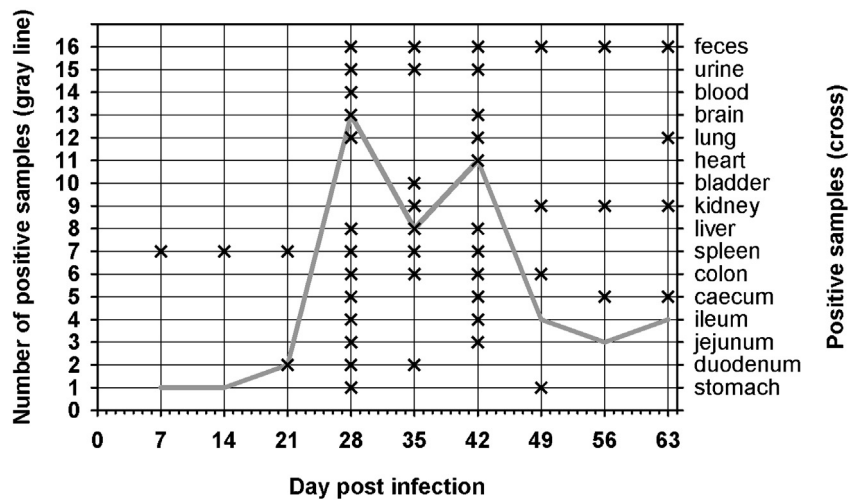
## 3. Results

Used spores of *E. cuniculi* were fully infectious; they caused a fatal disease in SCID mice within 4 weeks. None of the ponies shed any *E. cuniculi* spore in feces or urine prior infection. In addition, neither *E. cuniculi* specific DNA nor anti-*E. cuniculi* antibodies were detected in blood of any pony prior infection (Table 1 and Fig. 1). No clinical signs of microsporidiosis including diarrhea nor colic, neurological signs and fever were observed in any horses during whole experiment. The first 3 weeks of infection has been characterized by spreading of *E. cuniculi* to spleen. Concurrently, neither specific DNA in feces and tissues of gastrointestinal tract nor increase of specific antibodies were detected

**Table 1**  
Seropositivity of *Encephalitozoon cuniculi* in experimentally infected ponies.

Horses		Sacrificing (DPI)	Maximum titer of IgG in blood	
No.	Sex		Prior infection	Post infection
1	Male	7	≤32	64
2	Male	14	≤32	64
3	Male	21	64	128
4	Female	28	64	256*
5	Male	35	64	128
6	Male	42	64	256*
7	Male	49	≤32	128
8	Male	56	≤32	128
9	Male	63	64	128

\* Statistically significant increase of antibody concentration.



**Fig. 1.** Course of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II infection, including pattern of spores shedding and dissemination of infection to selected organs and tissues.

(Table 1 and Fig. 1). Acute microsporidiosis caused by *E. cuniculi* in ponies characterized by the dissemination of microsporidia into almost all organs were observed from 28 to 42 DPI. The numbers of affected organs were significantly increased (Fig. 1;  $p < 0.05$ ). The infection has been firstly detected in the most part of small and large intestine, and all horses started to shed spores in fecal and urine samples. The acute stage was connected with significant increase of concentration of specific antibodies in blood (Table 1) in two ponies (nos. 4 and 6), which were euthanized in acute phase of infection ( $p < 0.05$ ). The pony no. 5 had also increased volume of antibodies, but the increase was not statistically supported. Moreover, there was strong statistical support between antibody concentration increase and number of affected organs in individual horse. While horse nos. 4 and 6 had 13 and 11 positive samples out of 16 examined, respectively, horse no. 5 had 8 positive samples. After this acute stage microsporidia disappeared from most organs with the exception of the kidney and lung, which was positive up to 63 DPI when the experiment was terminated (Fig. 1). Above that, microsporidia infection was repeatedly detected in various part of intestine and fecal samples were positive up to 63 DPI. Macroscopic nor histology examination of organs of all slaughtered ponies did not show any pathological changes related to microsporidial infection except pony no. 4. In brain of this mare we observed a cavity (5 cm × 3 cm) in the *lobus piriformis* left sided rear. Although PCR analyses of cavity content revealed presence of *E. cuniculi*, the histology examination did not reveal any foci of infection. Sequences of secondary PCR product obtained from both cavity content and randomly selected organs were identical with sequence of original *E. cuniculi* used for infection.

#### 4. Discussion

Although microsporidia are environmentally resistant opportunistic parasites representing a potentially important threat for both immunodeficient and

immunocompetent individuals, limited or any data concerning the course of microsporidiosis in naturally and experimentally infected immunocompetent hosts including horses has been reported. *E. cuniculi*, the best studied species of microsporidia, causes disease when the host's immunity is impaired. The most documented cases of clinical infections have been recorded in patients with severe immunodeficiency mostly caused by AIDS (Mertens et al., 1997; Tosoni et al., 2002; Weber et al., 1997) or other damage to the immune system (Orenstein et al., 2005). In experimental infections, severe immunodeficient (SCID) mice were used as a suitable model to study the pathogenesis and potential chemotherapeutics with antimicrobial effect (Koudela et al., 1993; Kotková et al., 2013). Microsporidiosis in these hosts with dysfunctional immune system has rapid course with fatal consequence (Braunfuchsová et al., 2001; Sak et al., 2006; Salát et al., 2006). However, recent epidemiological studies showed, that microsporidia occur also in hosts without evident immunological deficit (Sak et al., 2011a,b,c; Wagnerová et al., 2012) and can cause life threatening disease in these individuals (Ditrich et al., 2011).

In our study we used clinically healthy ponies as the experimental models for infection with *E. cuniculi*. The infection dynamics was fully consistent with the results of Kotková et al. (2013) obtained in murine model, showing a progressive course of infection at the beginning characterized by the dissemination of microsporidia into almost all organs within 35 days p.i. and subsequent disappearing from most organs (Kotková et al., 2013). The present study revealed a lower onset of the acute stage in ponies (28 DPI) compared to 14 DPI recorded in BALB/c mice. Moreover, pony's fecal samples were positive from 28 DPI to 63 DPI but murine ones were positive only 5 to 7 DPI. In chronic stage the infection persisted in lung, kidney and caecum in ponies, whereas the spleen was the only whole term affected organ in the case of mice (Kotková et al., 2013).

Microsporidian *E. cuniculi* is found in horses (Santín et al., 2010; Wagnerová et al., 2012), but very little is



known about the course of infection. Since antibodies against microsporidia remain detectable for a long period of time, the basic prevalence among individual host population could be determined using serological methods such as immunofluorescent antibody staining, complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), western immunoblot assays (Garcia, 2002) and indirect immunofluorescence antibody assay (IFA). However, without the sera titration and reference to repeated sampling of individual animal, we are not able to discriminate between residual antibody levels or ongoing acute infection. Since the antibody concentration was highest during acute phase of infection suggesting intense spore multiplication, the change in titer height can provide us the rough estimation of the progression of microsporidiosis. This hypothesis is strongly supported by results of Levkutova et al. (2004), who performed the seroprevalence-based study in horses in Izrael. They revealed, that majority of horses with various clinical signs were seropositive and most of them had the titer of anti-*E. cuniculi* antibodies 1: 512.

It is well documented, that *E. cuniculi* infects wide spectrum of host cell types with the predilection to brain and kidneys leading to various pathologies affecting the nervous system, respiratory and digestive tracts. Many neurological signs were observed in rabbits and some other animals, similar changes were also seen in horses infected with *E. cuniculi* in Izrael (Levkutova et al., 2004). Microsporidia, most probably *E. cuniculi*, were detected in the placenta, brain, liver, kidneys, myocardium and lungs of aborted fetuses from two Holstein–Friesian heifers (Reetz, 1995). The clinical signs seen in seropositive horses in Izrael were colic, neurological signs and fever (Levkutova et al., 2004). Only the study by Van Rensburg et al. (1991) described morphological lesions due to *E. cuniculi* in horses. This report deals with an isolated case of a still born foal, showing renal lesions in the form of diffuse intestinal lymph plasmatic infiltrate and perivascular cuffing. Post necropsy we detected *E. cuniculi*-positive lesions in brain of one mare at day 28 p.i. This mare had also maximum titer of antibodies to *E. cuniculi*. Similarly, brain cavity caused by *E. cuniculi* genotype 1 together with *Streptococcus intermedius* was observed in a patient without major immunocompromise and with diabetes (Ditrich et al., 2011). Unlike the patient who suffered with hemiparesis and epilepsy in relation to microsporidiosis, any neurological and pathological symptoms in experimentally infected ponies with brains lesion were observed, probably due to short time of infection.

In conclusion, our study showed acute infection in clinically healthy ponies and progressive dissemination of the *E. cuniculi* infection to different organs. *E. cuniculi* may be the source of the hidden disease with unknown etiology, which may or may not clinically manifest. It is noteworthy, that *E. cuniculi* is able to overcome hematopoietic barrier and infects brain of immunocompetent individuals. Sport horses with high performance (racing, showjumping, dressage, military and endurance) have great economic importance for their breeders and microsporidia infections can negatively affect their health, performance and fertility. Future studies are important to evaluate the effect of *E. cuniculi* on the health and performance of human and

animals and assess what kind of hidden diseases they can cause.

## Acknowledgements

This study was supported by projects of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 6007665806) and by the project of the Grant Agency of University of South Bohemia (022/2010/Z and 011/2013/Z) and by Research Project Z60220518 of the Institute of Parasitology, ASCR.

## References

- Braunfuchsová, P., Salát, J., Kopecký, J., 2001. CD8+ T lymphocytes protect SCID mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Int. J. Parasitol.* 15, 681–686.
- Brown, J.H., Brenn, L., 1931. A method for the differential and gram negative bacteria in tissue sections. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 48, 69.
- Buckholt, M.A., Lee, J.H., Tzipori, S., 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2595–2599.
- Canning, E., Lom, J., 1986. *The Microsporidia of Vertebrates*. Academic Press, New York, NY.
- De Bosschere, H., Wang, Z., Orlandi, P.A., 2007. First diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. hellem* in a European brown hare (*Lepus europaeus*) with kidney lesions. *Zoonoses Public Health* 54, 131–134.
- De Grotte, M.A., Visvesvara, G., Wilson, M.L., Pieniazek, N.J., Slemenda, S.B., da Silva, A.J., Leitch, G.J., Bryan, R.T., Reves, R., 1995. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *J. Infect. Dis.* 171, 1375–1378.
- 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., 2006. Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 485–492.
- Ditrich, O., Chrdle, A., Sak, B., Chmelík, V., Kubálek, J., Dyková, I., Kváč, M., 2011. *Encephalitozoon cuniculi* genotype 1 as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2769–2771.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., 2003. First detection of microsporidia in dairy calves in North America. *Parasitol. Res.* 90, 383–386.
- Franzen, C., 2008. Microsporidia: a review of 150 years of research. *Open Parasitol. J.* 2, 1–34.
- Garcia, L.S., 2002. Laboratory identification of the microsporidia. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1892–1901.
- 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. *Parasitology* 94, 209–219.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Löscher, T., Rinder, H., 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health* 1, 373–378.
- Kotková, M., Sak, B., Květoňová, D., Kváč, M., 2013. Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: using murine model demonstrated the ineffectiveness of immune system and the treatment with albendazole. *PLoS ONE* 8, e60941.
- Koudela, B., Lom, J., Vítovec, J., Kucerová, Z., Ditrich, O., Trávníček, J., 1994. In vivo efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41, 49–50.
- Koudela, B., Vítovec, J., Kučerová, Z., Ditrich, O., Trávníček, J., 1993. The severe combined immunodeficient mouse as model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia Parasitol.* 40, 279–286.
- Künzel, F., Joachim, A., 2010. *Encephalitozoonosis* in rabbits. *Parasitol. Res.* 106, 299–309.
- Lawlor, E.M., Moretto, M.M., Khan, I.A., 2010. Optimal CD8 T-cell response against *Encephalitozoon cuniculi* is mediated by Toll-like receptor 4 upregulation by dendritic cells. *Infect. Immun.* 78, 3097–3102.
- Levkutova, M., Hipíkova, V., Fajtelzon, S., Benath, G., Paulík, Š., Levkut, M., 2004. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in horses in Israel. *Ann. Agric. Environ. Med.* 11, 265–267.
- Mathis, A., Weber, R., Deplazes, P., 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 423–445.
- Mertens, R.B., Didier, E.S., Fishbein, M.C., Bertucci, D.C., Rogers, L.B., Orenstein, J.M., 1997. *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis: infection

- of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. *Mod. Pathol.* 10, 68–77.
- Orenstein, J.M., Russo, P., Didier, E.S., Bowers, C., Bunin, N., Teachey, D.T., 2005. Fatal pulmonary microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* following allogeneic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. *Ultrastruct. Pathol.* 29, 269–276.
- 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.
- R Development Core Team, 2007. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>
- Reetz, J., 1995. Mikrosporidien als ursache von aborten beim rind. *Tierärztl. Umschau.* 50, 550–554.
- Reetz, J., Rinder, H., Thomschke, A., Manke, H., Schwebs, M., Bruderek, A., 2002. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *Int. J. Parasitol.* 32, 785–787.
- Sak, B., Kašičková, D., Kváč, M., Květoňová, D., Ditrich, O., 2010. Microsporidia in exotic birds: intermittent spore excretion of *Encephalitozoon* spp. in naturally infected budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet. Parasitol.* 168, 196–200.
- Sak, B., Brady, D., Pelikánová, M., Květoňová, D., Rost, M., Kostka, M., Tolarová, V., Hůzová, Z., Kváč, M., 2011a. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1064–1070.
- Sak, B., Kváč, M., Kučerová, Z., Květoňová, D., Saková, K., 2011b. Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals – a longitudinal study. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 5, e1162.
- Sak, B., Kváč, M., Petrželková, K., Květoňová, D., Pomajbíková, K., Mulama, M., Kiyang, J., Modrý, D., 2011c. Diversity of microsporidia (Fungi: Microsporidia) among captive great apes in European zoos and African sanctuaries: evidence for zoonotic transmission? *Folia Parasitol.* 58, 81–86.
- Sak, B., Salát, J., Horká, H., Saková, K., Ditrich, O., 2006. Antibodies enhance the protective effect of CD4+ T lymphocytes in SCID mice perorally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasite Immunol.* 28, 95–99.
- Salát, J., Horká, H., Sak, B., Kopecký, J., 2006. Pure CD4+ T lymphocytes fail to protect perorally infected SCID mice from lethal microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol. Res.* 99, 682–686.
- Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2004. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in post-weaned dairy calves in the eastern United States. *Parasitol. Res.* 93, 287–289.
- Santín, M., Vecino, J.C.A., Fayer, R., 2010. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bieneusi* in horses. *J. Parasitol.* 96, 157–161.
- Shadduck, J.A., Watson, W.T., Pakes, S.P., Cali, A., 1979. Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. *J. Parasitol.* 65, 123–129.
- Szeredi, L., Pospischil, A., Dencso, L., Mathis, A., Dobos-Kovács, M., 2007. A case of equine abortion caused by *Encephalitozoon* sp. *Act. Vet. Hung.* 55, 525–532.
- Tosoni, A., et al., 2002. Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* III (dog type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study. *Mod. Pathol.* 15, 577–583.
- Van Rensburg, I.B., Volkmann, D.H., Soley, J.T., Stewart, C.G., 1991. Encephalitozoon infection in a still-born foal. *J. South Afr. Vet. Assoc.* 62, 130–132.
- Vávra, J., Chalupský, J., 1982. Fluorescence staining of microsporidian spores with the brightener Calcofluor White M2R. *J. Protozool.* 29, 503.
- Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Buňatová, Z., Civišová, H., Maršálek, M., Kváč, M., 2012. *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* in horses kept under different management systems in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 190, 573–577.
- Wasson, K., Peper, R.L., 2000. Mammalian microsporidiosis. *Vet. Pathol.* 37, 113–128.
- Weber, R., Bryan, R.T., Owen, R.L., Wilcox, C.M., Gorelkin, L., Visvesvara, G.S., 1992. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *New Engl. J. Med.* 326, 161–166.
- 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., Flepp, M., Mathis, A., Baumann, R., Sauer, B., Kuster, H., Lüthy, R., 1997. Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficient virus infection. *New Engl. J. Med.* 336, 474–478.
- Wittner, M., Weiss, L.M., 1999. *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society for Microbiology, Washington, DC.

### **Publikace III.**

Laatamna, A.E., **Wagnerová, P.**, Sak, B., Květoňová, D., Aissi, M., Rost, M., Kváč, M.  
2013. Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog  
genotype in Algeria. Vet Parasitol 197, 350–353.





## Short communication

Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog genotype in Algeria

Abd Elkarim Laathamna<sup>a</sup>, Pavla Wagnerová<sup>b</sup>, Bohumil Sak<sup>c</sup>, Dana Květoňová<sup>c</sup>,  
Miriem Aissi<sup>a</sup>, Michael Rost<sup>d</sup>, Martin Kváč<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Higher National School of Veterinary, BP 161 Hacène Badi, EL Harrach, Algiers, Algeria

<sup>b</sup> Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>d</sup> Faculty of Economics, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 December 2012

Received in revised form 25 April 2013

Accepted 26 April 2013

## Keywords:

Horses

*Cryptosporidium* hedgehog genotype

PCR

SSU

GP60

## ABSTRACT

Faecal samples from two horse farms in Algeria keeping Arabian, Thoroughbred, and Barb horses were examined for the presence of *Cryptosporidium* in 2010–2011. A total of 138 faecal samples (16 from a farm keeping 50 animals and 122 from a farm with 267 horses) were screened for *Cryptosporidium* spp. infection using molecular tools. DNA was extracted from all samples. Nested PCR was performed to amplify fragments of the SSU rDNA and gp60 genes to determine the presence of *Cryptosporidium* species and genotypes. Sequence analyses of SSU and gp60 genes revealed four animals positive for the presence of subtype XIIIa A22R9 of the *Cryptosporidium* hedgehog genotype. The infections were not associated with diarrhoea. This study reports, for the first time, the occurrence of *Cryptosporidium* in Algeria and the first occurrence of the hedgehog genotype in horses. These findings support the potential role of infected horses in sylvatic–domestic transmission of *Cryptosporidium*.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Protozoa of the genus *Cryptosporidium* are apicomplexan parasites inhabiting the digestive tract and/or respiratory systems of birds, fish, reptiles, and mammals, including humans (Fayer, 2010). Although equine cryptosporidiosis was first reported in the USA in 1978 in six Arabian foals with inherited combined immunodeficiency (Snyder et al., 1978), the prevalence, genotypes and zoonotic potential of *Cryptosporidium* spp. affecting horses remains poorly understood. This is in contrast to general

understanding of cryptosporidiosis in ruminants, pigs, and humans. Natural horse cryptosporidiosis has been reported in the USA (e.g. Burton et al., 2010); Canada (e.g. Gajadhar et al., 1985); Brazil (de Souza et al., 2009); New Zealand (e.g. Grinberg et al., 2009); Europe, including Poland (e.g. Majewska et al., 1999), Italy (Veronesi et al., 2010), Czech Republic (e.g. Ryan et al., 2003), Germany (Epe et al., 2004), UK (e.g. Sturdee et al., 2003), and Switzerland (Imhasly et al., 2009); and the Middle East (Mahdi and Ali, 2002). However, only 8 out of 30 reports of horse cryptosporidiosis were supported by molecular data (Burton et al., 2010; Grinberg et al., 2003, 2008, 2009; Chalmers et al., 2005; Imhasly et al., 2009; Ryan et al., 2003; Veronesi et al., 2010).

Horses appear susceptible to at least two cryptosporidia: *Cryptosporidium* horse genotype, which was detected by Ryan et al. (2003) in Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*), and *Cryptosporidium parvum*, which is a more frequent cause of horse cryptosporidial infection, and

\* Corresponding author at: Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Branišovská 31, České Budějovice 370 05, Czech Republic. Tel.: +420 387775421; fax: +420 385310388.

E-mail address: [kvac@paru.cas.cz](mailto:kvac@paru.cas.cz) (M. Kváč).

is occasionally associated with diarrhoea (e.g. Chalmers et al., 2005; Grinberg et al., 2008, 2009; Imhasly et al., 2009; Veronesi et al., 2010). Thus, more thorough investigations are needed to better understand horse cryptosporidiosis and fully assess its zoonotic potential.

The purpose of this study was to investigate the distribution of *Cryptosporidium* species/genotypes in horses from Algeria using molecular tools based on the genus-specific amplification of the small subunit ribosomal RNA gene, and to assess the distribution and diversity of potentially zoonotic subtypes by sequence analyses of a gene encoding a 60-kDa glycoprotein.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Origin of samples

The research was performed over a two-year period (2010–2011) on two horse farms in Algeria, which keep different breeds of horses (Pure Arabian, Thoroughbred and Barb), and represent two different management systems (small private farm (A) and large commercial farm (B)). The farms were selected randomly without previous knowledge of horse parasitization. No other farm animals were kept on the studied farms. The first farm (farm A) was an equestrian centre located in the Algiers that bred approximately 50 horses. Horses were maintained in individual boxes under standard hygienic conditions. The second farm (farm B) was located in the province of Tiaret and kept 267 horses. Broodmares were kept in stables or on pasture, depending on the season. During the summer, mares and foals spent the night on pasture. Breeding stallions were stabled regardless of season.

### 2.2. Sample collection and coprological examination

More than 30% of animals were sampled on each farm to evaluate prevalence. Faecal samples were collected directly from the rectum or immediately after defecation by horses. Each sample was placed into an individual sterile plastic container and transported in an isotherm box to the laboratory. Repeated analyses of the same animals were not included in the survey to prevent estimation of cumulative prevalence.

### 2.3. Gene amplification and sequencing

To identify the *Cryptosporidium* sp. or genotype present, genomic DNA was extracted using the QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) from all samples (200 mg from each specimen) as described previously (Sak et al., 2008). Nested PCR was used to amplify a partial sequence of the small subunit rRNA (SSU) and *Cryptosporidium* 60-kDa glycoprotein (gp60) genes (Alves et al., 2003; Jiang et al., 2005). All samples were analyzed in duplicate. Negative and positive controls (DNA of *Cryptosporidium suis* for SSU and *Cryptosporidium hominis* for gp60) were included with each PCR amplification. The PCR amplicons were electrophoresed in 2% agarose gels with 0.2 mg/ml ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. The secondary PCR products were

**Table 1**

Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in mares, stallions and foals on selected farms in Algeria.

Farm	Category	No. of screened samples	No. of positive samples (%)
A	Mare	9	0
	Stallion	7	0
	Subtotal	16	0
B	Mare	51	3 (5.9)
	Stallion	18	1 (5.5)
	Foal	53	0
	Subtotal	122	4 (3.3)
Total		138	4 (2.9)

sequenced in both directions using ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and an ABI 3730XL sequence analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### 2.4. Phylogenetic analyses

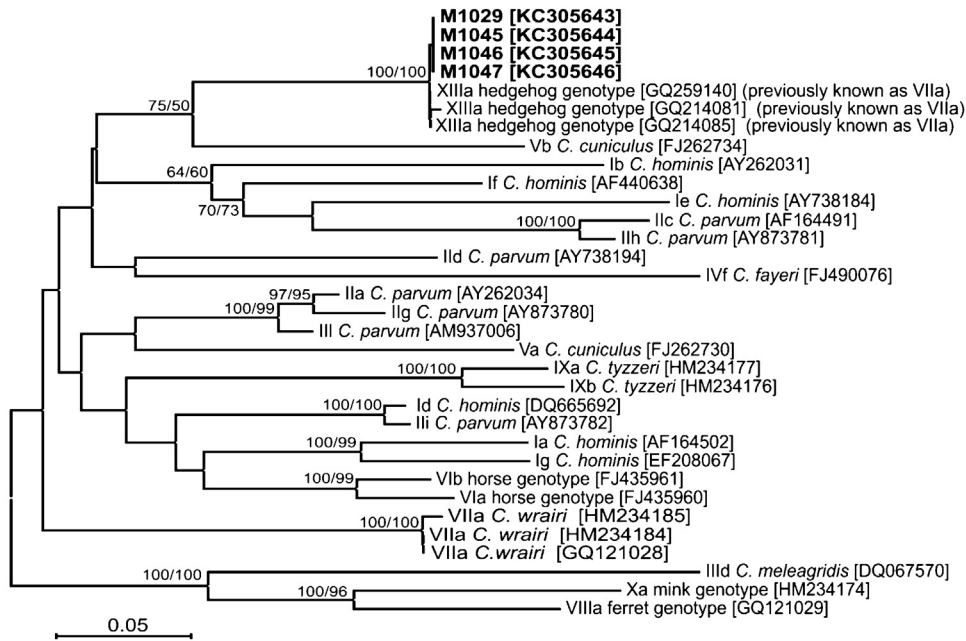
The identity of obtained sequences was examined by a BLAST search ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Alignment adjustments were made manually to remove artificial gaps using BioEdit. Phylogenetic analyses were performed using the software MEGA5. Neighbour joining (NJ) and maximum likelihood (ML) trees were constructed. All ambiguous positions were removed from each sequence pair. The reliability of branches in trees was assessed using bootstrap analysis with 1000 pseudo-replicates, with values above 50% reported. Partial SSU and gp60 sequences recovered from the horses have been submitted to GenBank under the accession numbers KC305643–KC305650.

### 2.5. Statistical analyses

A two-sample test for equality of proportions without Yate's continuity correction was used to assess relationships between *Cryptosporidium* species/genotype and parameters such as age, sex, and farming practices. All computations were performed with R. 15.1.

## 3. Results

An individual faecal sample was taken from 16 horses from the farm A and 122 horses from the farm B. *Cryptosporidium* was not detected in faecal samples from horses on farm A; whereas, 4 of 122 horses from farm B were *Cryptosporidium* positive (Table 1). Analysis of partial sequences of the SSU rRNA gene showed the presence of *Cryptosporidium* hedgehog genotype in all positive horses. SSU sequences formed one cluster in both neighbour-joining and maximum likelihood analyses. Sequences within a cluster shared 100% identity and differed by 1–6 substitution from SSU sequences previously reported from hedgehogs (99.2–99.8% similarity among GQ214082, GQ214078, GQ259137, and GQ259141; data not shown). Neighbour-joining and maximum likelihood trees constructed from gp60 sequences from this study and sequences published in GenBank revealed the presence of *Cryptosporidium* hedgehog genotype belonging to the XIIIa family. In all sequences, 22 serine-encoding TCA nucleotide repeats were followed by 9 repeats of the



**Fig. 1.** Phylogenetic relationships between *Cryptosporidium* sp. obtained in this study (highlighted) and other *Cryptosporidium* spp. Maximum likelihood tree (likelihood =  $-17475.61$ ) with Kimura 2-parameter model. Numbers at the nodes represent bootstrap values (NJ/ML) for the nodes gaining more than 50% support. Scale bar is given in the tree.

ACATCA consensus sequence, identifying the subtype as A22R9 (Fig. 1). One transition (G > A) resulting in an amino acid change in the non-repeat region (G > S) was detected in one of the obtained sequences. *Cryptosporidium* prevalence did not vary significantly with age ( $\chi^2 = 2.5686$ ;  $df = 1$ ;  $p$ -value = 0.1090), sex ( $\chi^2 = 0.0057$ ;  $df = 1$ ;  $p$ -value = 0.9398) or farming practices ( $\chi^2 = 0.5402$ ;  $df = 1$ ;  $p$ -value = 0.4623). No infected horses showed signs of diarrhoea at the time of sampling. Also no diarrhoeal diseases were observed in animals at least 2 weeks prior to sampling.

#### 4. Discussion

The overall prevalence at the animal level was low (3%). This is in agreement with other studies of horses, where *Cryptosporidium* oocyst prevalence varied from 1% to 31%. In contrast to the present report of *Cryptosporidium* in adult horses, previous studies have found foals to be more frequently infected (range 1–31%) than adults (1–12%) (e.g. de Souza et al., 2009; Mahdi and Ali, 2002; Majewska et al., 1999; Veronesi et al., 2010; Xiao and Herd, 1994). Also, in contrast to previous studies of cattle and pigs (Kváč et al., 2006; Němejc et al., 2013), there was no association between age, management system, or sex and *Cryptosporidium* infection.

The course of cryptosporidial infection in horses could be influenced, in part, by the *Cryptosporidium* species or genotypes causing the infection. While Grinberg et al. (2009) and Perrucci et al. (2011) specifically linked *C. parvum* with diarrhoea in horses, other studies did not specify the *Cryptosporidium* species or genotype and therefore association between *Cryptosporidium* infection and diarrhoea remains unclear. Similar to the present study,

which found no association between *Cryptosporidium* hedgehog genotype and diarrhoea in horses, Xiao and Herd (1994), Veronesi et al. (2010), and Olson et al. (1997) found no association between oocyst shedding and diarrhoea in horses. Although Dyachenko et al. (2010) reported relatively frequent occurrence of *Cryptosporidium* hedgehog genotype and *C. parvum* mainly in juvenile hedgehogs suffering from diarrhoea, they did not distinguish causative agents of clinical cryptosporidiosis in their study.

Phylogenetic analysis of SSU and gp60 sequences from the present study showed that horses were infected with the *Cryptosporidium* hedgehog genotype. The nomenclature previously described by Sulaiman et al. (2005) was used to describe subtype families and subtypes of gp60 gene sequences. Sequences clustered with the subtype family originally reported from European hedgehogs (*Eri-naceus europaeus*) (GQ259140, GQ214085, and GQ214081), which was named subtype family VII (Dyachenko et al., 2010). However, in a contemporary publication, gp60 sequences from *Cryptosporidium wrairi* were also named subtype family VII (Lv et al., 2009). It is unclear which publication has priority; therefore, it is proposed to continue using the subtype family designation VII for *C. wrairi* (valid species) and to introduce a novel family XIII for the *Cryptosporidium* hedgehog genotype. gp60 sequences from horses belonged to subtype family XIIIa. All the detected hedgehog genotype isolates had nine copies of the sequence ACATCA immediately following 22 TCA repeats. This subtype has not been detected previously in hedgehogs or other hosts (Dyachenko et al., 2010).

The host specificity of *Cryptosporidium* in horses is unclear. Although *Cryptosporidium* horse genotype was identified in a Przewalski's wild horse foal in the Prague Zoo

and was initially considered as an equine-specific genotype (Ryan et al., 2003), this genotype was detected recently in humans (e.g. Robinson et al., 2008) and a calf from Northern Ireland (Thompson et al., 2007). Moreover, both experimental and molecular epidemiology studies revealed the susceptibility of horses to zoonotic *C. parvum* (Bjorneby et al., 1991; Chalmers et al., 2005; Grinberg et al., 2009; Imhasly et al., 2009; Veronesi et al., 2010). To our best knowledge, this is the first report of horse cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog genotype. The zoonotic potential of the hedgehog genotype is unknown; nevertheless, occurrence of this genotype in horses indicates that host specificity is broader than previously thought. Also, the number of *Cryptosporidium* species/genotypes infecting horses should be expanded to three (*C. parvum*, horse genotype, and hedgehog genotype). Future studies should employ molecular tools to better understand the epidemiology of *Cryptosporidium* in horses.

### Acknowledgements

The authors would like to thank the farmers for their participation. This study was funded by projects from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 6007665806), the Grant Agency of University of South Bohemia (022/2010/Z and 011/2013/Z). The authors thank Dr. John McEvoy for English language corrections of a draft of the manuscript.

### References

- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O., Antunes, F., 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2744–2747.
- Bjorneby, J.M., Leach, D.R., Perryman, L.E., 1991. Persistent cryptosporidiosis in horses with severe combined immunodeficiency. *Infect. Immun.* 59, 3823–3826.
- Burton, A.J., Nydam, D.V., Dearen, T.K., Mitchell, K., Bowman, D.D., Xiao, L., 2010. The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. *Vet. Parasitol.* 174, 139–144.
- Chalmers, R.M., Thomas, A.L., Butler, B.A., Morel, M.C., 2005. Identification of *Cryptosporidium parvum* genotype 2 in domestic horses. *Vet. Rec.* 156, 49–50.
- de Souza, P.N., Bomfim, T.C., Huber, F., Abboud, L.C., Gomes, R.S., 2009. Natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. and *Eimeria leuckarti* in three groups of equines with different handlings in Rio de Janeiro. *Braz. Vet. Parasitol.* 160, 327–333.
- Dyachenko, V., Kuhnert, Y., Schmaeschke, R., Etzold, M., Pantchev, N., Dauschies, A., 2010. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. genotypes in European hedgehogs (*Erinaceus europaeus* L.) in Germany. *Parasitology* 137, 205–216.
- Epe, C., Coati, N., Schnieder, T., 2004. Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 111, 243–247.
- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124, 90–97.
- Gajadhar, A.A., Caron, J.P., Allen, J.R., 1985. Cryptosporidiosis in two foals. *Can. Vet. J.* 26, 132–134.
- Grinberg, A., Oliver, L., Learmonth, J.J., Leyland, M., Roe, W., Pomroy, W.E., 2003. Identification of *Cryptosporidium parvum* 'cattle' genotype from a severe outbreak of neonatal foal diarrhoea. *Vet. Rec.* 153, 628–631.
- Grinberg, A., Learmonth, J., Kwan, E., Pomroy, W., Lopez Villalobos, N., Gibson, I., Widmer, G., 2008. Genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* causing foal diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2396–2398.
- Grinberg, A., Pomroy, W.E., Carslake, H.B., Shi, Y., Gibson, I.R., Drayton, B.M., 2009. A study of neonatal cryptosporidiosis of foals in New Zealand. *NZ Vet. J.* 57, 284–289.
- Imhasly, A., Frey, C.F., Mathis, A., Straub, R., Gerber, V., 2009. Cryptosporidiosis (*C. parvum*) in a foal with diarrhea. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 151, 21–26.
- Jiang, J., Alderisio, K.A., Xiao, L., 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4446–4454.
- Kvác, M., Kouba, M., Vitovec, J., 2006. Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia. *Czech Republic Vet. Parasitol.* 137, 202–229.
- Lv, C., Zhang, L., Wang, R., Jian, F., Zhang, S., Ning, C., Wang, H., Feng, C., Wang, X., Ren, X., Qi, M., Xiao, L., 2009. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7692–7699.
- Mahdi, N.K., Ali, N.H., 2002. Cryptosporidiosis among animal handlers and their livestock in Basrah. *Iraq. East. Afr. Med. J.* 79, 550–553.
- Majewska, A.C., Werner, A., Sulima, P., Luty, T., 1999. Survey on equine cryptosporidiosis in Poland and the possibility of zoonotic transmission. *Ann. Agric. Environ. Med.* 6, 161–165.
- Němejč, K., Sak, B., Květoňová, D., Kernerová, N., Rost, M., Cama, V.A., Kvác, M., 2013. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitol. Res.* 112, 1143–1154.
- Olson, M.E., Thorlakson, C.L., Deselliers, L., Morck, D.W., McAllister, T.A., 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet. Parasitol.* 68, 375–381.
- Perrucci, S., Buggiani, C., Sgorbini, M., Cerchiai, I., Otranto, D., Traversa, D., 2011. *Cryptosporidium parvum* infection in a mare and her foal with foal heat diarrhoea. *Vet. Parasitol.* 182, 333–336.
- Robinson, G., Elwin, K., Chalmers, R.M., 2008. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1174–1176.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A.A., Pavlíšek, I., 2003. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4302–4307.
- Sak, B., Kvác, 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.
- Snyder, S.P., England, J.J., McChesney, A.E., 1978. Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. *Vet. Pathol.* 15, 12–17.
- Sturdee, A.P., Bodley-Tickell, A.T., Archer, A., Chalmers, R.M., 2003. Longterm study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet. Parasitol.* 116, 97–113.
- Sulaiman, I.M., Hira, P.R., Zhou, L., Al-Ali, F.M., Al-Shelahi, F.A., Shweiki, H.M., Iqbal, J., Khalid, N., Xiao, L., 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2805–2809.
- Thompson, H.P., Dooley, J.S., Kenney, J., McCoy, M., Lowery, J.E., Moore, J.E., Xiao, L., 2007. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol. Res.* 100, 619–624.
- Veronesi, F., Passamonti, F., Caccio, S., Diaferia, M., Piergili Fioretti, D., 2010. Epidemiological survey on equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Italy and molecular characterization of isolates. *Zoonoses Public Health* 57, 510–517.
- Xiao, L., Herd, R.P., 1994. Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Equine Vet. J.* 26, 14–17.

## **Publikace IV.**

**Wagnerová, P.**, Sak, B., Květoňová, D., McEvoy, J., Rost, M., Perec Matysiak, A., Kváč, M. 2015. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in Czech Republic and Poland. *Parasitol Res* 114, 1619–1624.



# Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland

Pavla Wagnerová · Bohumil Sak · John McEvoy ·  
Michael Rost · Agnieszka Percec Matysiak · Jana Ježková ·  
Martin Kváč

Received: 4 December 2014 / Accepted: 22 January 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** Faecal samples were collected from 352 horses on 23 farms operating under six different management systems in the Czech Republic and Poland during 2011 and 2012. Farms were selected without previous knowledge of parasitological status. All faecal samples were screened for *Cryptosporidium* spp. presence using microscopy, following aniline-carbol-methyl violet staining and PCR analysis of the small-subunit (SSU) rRNA and the 60-kDa glycoprotein (gp60) genes. *Cryptosporidium muris*-positive samples were additionally genotyped at four minisatellite markers: MS1 (encoding a hypothetical protein), MS2 (encoding a 90-kDa heat shock

protein), MS3 (encoding a hypothetical protein) and MS16 (encoding a leucine-rich repeat family protein). *Cryptosporidium* spp. was detected by PCR in 12/352 (3.4 %) samples from 4 out of 13 farms. None of the samples tested by microscopy was positive. There was no relationship between *Cryptosporidium* prevalence and age, sex, diarrhoea or management system; however, *Cryptosporidium* was found only on farms where horses were kept on pasture during the day and in a stable overnight. Sequence analyses of SSU and gp60 genes revealed the presence of *C. muris* RN66 ( $n=9$ ), *Cryptosporidium parvum* IIaA15G2R1 ( $n=1$ ), *Cryptosporidium tyzzeri* IXbA22R9 ( $n=1$ ), and *Cryptosporidium* horse genotype VIaA15G4 ( $n=1$ ). The *C. muris* subtypes were identified as MS1-M1, MS2-M4, novel MS2-M7 and MS16-M1 by multilocus sequence of three minisatellite loci. The MS3 locus was not amplified from any isolate. This is the first report of *C. tyzzeri* and *C. muris* subtypes from horses.

P. Wagnerová · M. Kváč  
Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České  
Budějovice, Studentská 13, 370 05 České  
Budějovice, Czech Republic

P. Wagnerová · B. Sak · M. Kváč (✉)  
Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences  
of the Czech Republic, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České  
Budějovice, Czech Republic  
e-mail: kvac@paru.cas.cz

J. McEvoy  
Department of Veterinary and Microbiological Sciences, North  
Dakota State University, Fargo, ND, USA

M. Rost  
Faculty of Economics, University of South Bohemia in České  
Budějovice, České Budějovice, Czech Republic

A. Percec Matysiak  
Department of Parasitology, Institute of Genetics and Microbiology,  
Wrocław University, Wrocław, Poland

J. Ježková  
Faculty of Science, University of South Bohemia in České  
Budějovice, Studentská 13, 370 05 České  
Budějovice, Czech Republic

**Keywords** Horse · *Cryptosporidium* · SSU · gp60 · MLST

## Introduction

*Cryptosporidium* is among the most common parasites of domestic and wild animals and humans. Interest in *Cryptosporidium* has heightened in the veterinary field, not only because of the potential for zoonotic transmission, but also because of difficulties controlling economic losses in production animals (Ramirez et al. 2004). A large body of work has been published on *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in domestic and captive animals (Kváč et al. 2014a). Although cryptosporidiosis was initially considered to occur

rarely in horses and was associated with immunodeficiency (Snyder et al. 1978), more recent studies have shown that horses are frequently infected with *Cryptosporidium* (Olson et al. 1997; Xiao and Herd 1994). Natural equine cryptosporidiosis has been reported in many countries worldwide, including America (Cole et al. 1998; de Souza et al. 2009; Xiao and Herd 1994), Canada (Gajadhar et al. 1985; Olson et al. 1997), New Zealand (Grinberg et al. 2003, 2009), Africa (Laatamna et al. 2013) and a number of European countries (Majewska et al. 2004; Ryan et al. 2003; Sturdee et al. 2003; Veronesi et al. 2010). Horses appear susceptible to at least three *Cryptosporidium* spp.: *Cryptosporidium* horse genotype, *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium erinacei* (previously known as hedgehog genotype) (Grinberg et al. 2003; Laatamna et al. 2013; Ryan et al. 2003). All *Cryptosporidium* spp. detected in horses to date are also infectious for humans (Kváč et al. 2014b; Robinson et al. 2008; Xiao et al. 2009). The aim of this study was to determine the diversity of *Cryptosporidium* spp. in horses under various conditions in the Czech Republic and Poland and to determine any associations between infection occurrence and age, sex, housing systems and consistency of faeces.

## Material and methods

During 2011 and 2012, faecal specimens were collected from 352 horses of different ages (5 days to 32 years) on 23 horse farms throughout the Czech Republic (CR;  $n=20$ ) and Poland (P;  $n=3$ ). The farms were screened without previous knowledge of parasitological status. The management systems in operation on the farms, which were exclusively horse farms were as follows: (i) year-round grazing with shelters (CR farm #1–4), (ii) year-round grazing with overnight housing in stables during winter (CR #5–7), (iii) year-round housing in stables on concrete floors (CR #8–10), (iv) year-round housing in the stables on the deep straw bedding (CR #11), (v) daytime grazing and overnight housing in stables on deep straw bedding (CR #12–16) and (vi) daytime grazing and overnight housing in stables on concrete floors (CR #17–20; P #21–23). Each sample was individually placed in a plastic dish without fixation, stored in at 4 °C and analysed within 48 h for the presence of *Cryptosporidium* using the aniline-carbol-methyl violet staining method (Miláček and Vítovec 1985). The faecal consistency (loose if it took the form of the container and solid if it maintained its original shape) was noted at the time of sampling. Repeated analyses of the same animals were excluded from the survey to avoid estimating cumulative prevalence.

Total DNA was extracted from 200 mg of faecal samples from each specimen by bead disruption for 60 s at 5.5 m/s using 0.5 mm glass beads in a FastPrep®24 Instrument (MP Biomedicals, CA, USA) using QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

The extracted DNA was kept frozen at –20 °C until used for genotyping. Nested PCR protocols amplifying a fragment of the small-subunit (SSU) rRNA, the 60-kDa glycoprotein (gp60) and four minisatellite markers, including the MS1 (encoding a hypothetical protein), MS2 (encoding a 90-kDa heat shock protein), MS3 (encoding a hypothetical protein) and MS16 (encoding a leucine-rich repeat family protein) genes of *Cryptosporidium* were performed in duplicate as previously described by Alves et al. (2003); Jiang et al. (2005); and Feng et al. (2011). Negative (PCR water) and positive controls (samples containing DNA of *Cryptosporidium suis* for SSU, *Cryptosporidium hominis* for gp60, *Cryptosporidium andersoni* for MS genes) were included with each PCR amplification. PCR products were visualized following electrophoresis on a 1 % agarose gel containing 0.2 g/ml ethidium bromide. All sequences were confirmed by sequencing amplicons from two independent DNA extractions. PCR products were sequenced in both directions on an ABI 3730XL sequence analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequences were assembled, manually edited and aligned using the ChromasPro 1.7.4 (Technelysium, Pty, Ltd.), BioEdit v7.0.5.3 (Hall 1999 and MAFFT version 7 online server with automatic selection of alignment mode (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), and were compared with sequences in GenBank. Phylogenetic trees were inferred by the neighbour-joining method, with pairwise deletions, from distances estimated using the Kimura 2-parameter distance model (MEGA5) (Tamura et al. 2011). Bootstrap support for branching was based on 1000 pseudoreplicates. Phylograms were edited for style using CorelDrawX5. Sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers KJ469983, KJ469985–KJ469989 and KP176787–KP176793.

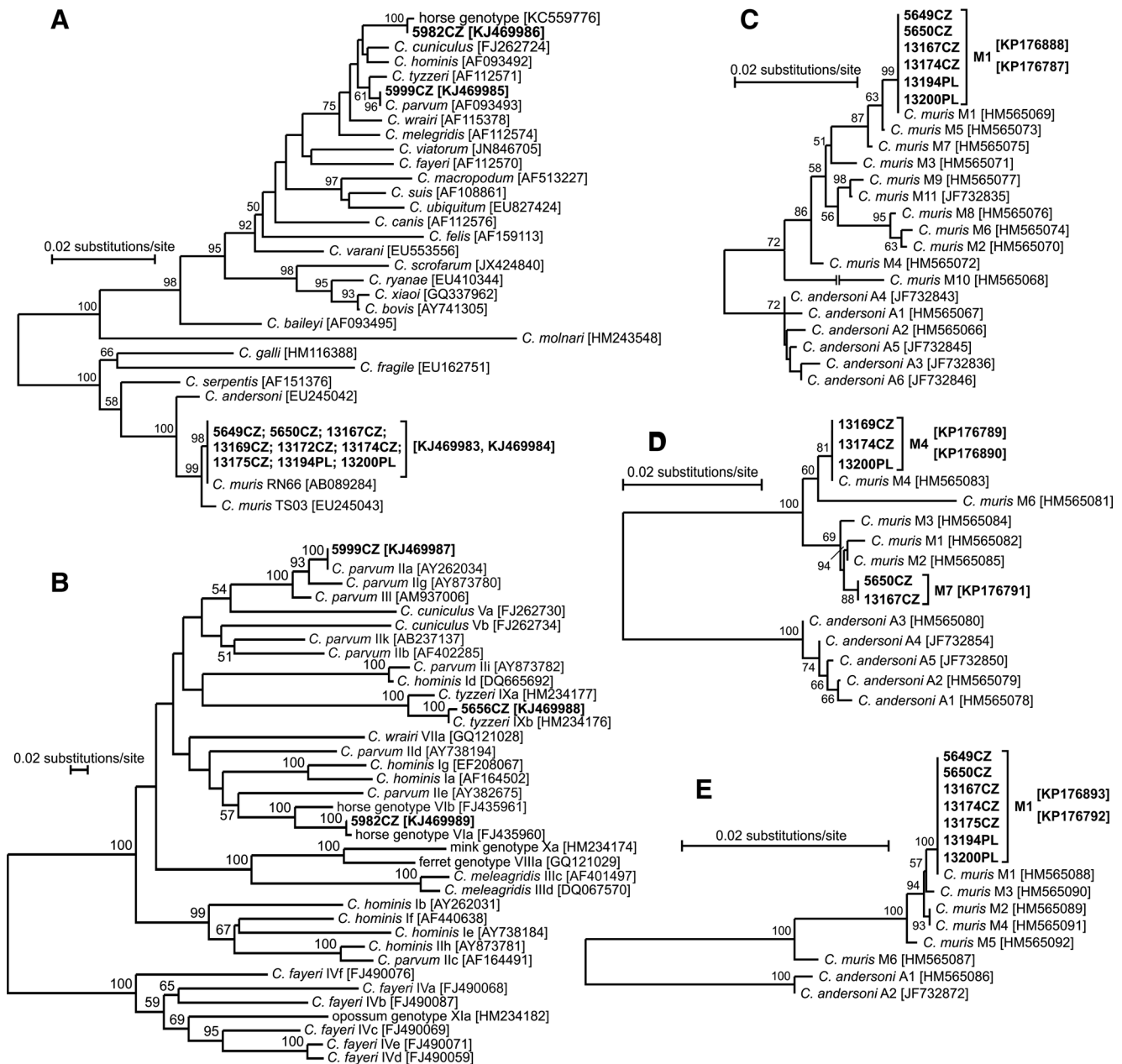
Relationships between *Cryptosporidium* spp. presence and the age or sex of the animal or farm management practices were determined using a classical chi-squared test of independence without Yates' continuity correction. Statistical analyses were performed using R (version 2.15.0), a software environment for statistical computing.

## Results

*Cryptosporidium* spp. was detected in 12/352 (3.4 %) samples tested by PCR and none of the samples was tested by microscopy. Positive samples were from 4/23 (17.4 %) of farms. Statistical analyses did not show any association between sex or age of the animal and *Cryptosporidium* prevalence (data not shown). *Cryptosporidium* was detected only on farms operating under management systems combining pasture grazing and housing in stables. None of horses showed signs of diarrhoea at the time of sampling or during the

2 weeks prior to sampling. Analysis of partial sequences of the SSU gene showed the presence of *C. parvum* ( $n=1$ ), *Cryptosporidium* horse genotype ( $n=1$ ) and *C. muris* ( $n=9$ ) (Fig. 1a). Neighbour-joining trees constructed using on gp60 sequences obtained in this study and sequences published in GenBank revealed the presence of *C. parvum* ( $n=1$ ), *C. tyzzeri* ( $n=1$ ) and *Cryptosporidium* horse genotype ( $n=1$ ) belonging

to family IIa, IXb and VIa, respectively. Based on the established gp60 nomenclature (Sulaiman et al. 2005), the *Cryptosporidium* subtypes were named IIaA15G2R1 (*C. parvum*), IXbA22R9 (*C. tyzzeri*) and VIaA15G4 (horse genotype) (Fig. 1b). *Cryptosporidium parvum* and horse genotype were identified in two young stallions on the same farm (#15). At the four minisatellite loci (MS1, MS2, MS3



**Fig. 1** Phylogenetic relationships between *Cryptosporidium* spp. found in present study (**highlighted**) and other *Cryptosporidium* spp. as inferred by a neighbour-joining analysis of a SSU (820 base positions in the final dataset), **b** gp60 (692 base positions in the final dataset), **c** MS1 (encoding a hypothetical protein; 436 base positions in the final dataset), **d** MS2 (encoding a 90-kDa heat-shock protein; 406 base positions in the final dataset) and **e** MS16 (encoding a leucine-rich repeat family protein; 549

base positions in the final dataset) genes. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates). Numbers at the nodes represent bootstrap values for the nodes gaining more than 50 % support. A scale bar is included in each tree. Interrupted branch has been shortened fivefold. CZ Czech Republic, PL Poland



and MS16), six, five, zero and seven *C. muris*-positive isolates were sequenced, respectively (Table 1). A total of four out nine *C. muris* isolates were subtyped at three loci.

## Discussion

Results of this study are consistent with the reported low worldwide prevalence of *Cryptosporidium* infection in horses (e.g. de Souza et al. 2009; Majewska et al. 2004; Olson et al. 1997; Veronesi et al. 2010; Xiao and Herd 1994). Unlike pigs or cattle, we found no association between management system or sex and *Cryptosporidium* infection (Maddox-Hyttel et al. 2006; Mohammed et al. 1999). However, this may be due to the very low prevalence of *Cryptosporidium* in horse populations. Most studies, including the present one, have found no association between *Cryptosporidium* infection and clinical signs in horses and foals, suggesting that cryptosporidiosis is frequently sub-clinical in healthy horses (e.g. McKenzie and Diffay 2000; Majewska et al. 2004; Veronesi et al. 2010; Xiao and Herd 1994). However, Grinberg et al. (2009), Perrucci et al. (2011) and Díaz et al. (2012) reported an association between infection by *C. parvum* and diarrhoea primarily in foals. The *C. parvum* subtypes, IIa A15G2R1 and IIaA18G3R1, associated with clinical cryptosporidiosis in foals (Díaz et al. 2012; Grinberg et al. 2008) also cause diarrhoea in humans and livestock (Glaberman et al. 2002; Trotz-Williams et al. 2006; Wielinga et al. 2008). Absence of clinical disease in horses infected with IIa A15G2R1 in this study could be due to the age of infected horses (older than 3 years). In addition, the failure to detect *C. parvum* oocysts by microscopy suggests that the infection intensity was low. It is possible that asymptotically infected adult

horses are sources of *C. parvum* causing cryptosporidiosis in foals.

The *Cryptosporidium* horse genotype detected was identical to an isolate found in a foal in Italy (VIaA15G4; Caffara et al. 2013) and belonged to the same subtype family as a horse genotype previously found in Prezewalski's and domestic horses (Burton et al. 2010; Ryan et al. 2003). In contrast, two human isolates from England (Robinson et al. 2008) and New Mexico (Xiao et al. 2009) belonged to the *Cryptosporidium* horse genotype VIb family, which has never been found in horses. Consistent with previous studies, we found a low frequency of *Cryptosporidium* horse genotype occurrence (e.g. Grinberg et al. 2003, 2008, 2009; Veronesi et al. 2010). Unexpectedly, we also found rodent-specific *C. muris* and *C. tyzzeri* in horses in this study. Both rodent-specific *Cryptosporidium* species have been found previously in non-specific hosts, including humans and domestic animals such as pigs, cattle and camels (Kvác et al. 2014a). It is not known whether the presence of *C. muris* and *C. tyzzeri* DNA in horse faeces was due to an active infection or mechanical passage of oocysts through the digestive tract. Previous studies suggested that the presence of *C. muris* and *C. tyzzeri* in faecal samples of snakes, lizards, raptors and pigs was due to the ingestion of mice or contamination from the environment. The association of these rodent species with horses kept in stables with straw bedding supports the hypothesis of passive transport. However, the *C. tyzzeri* subtype (IXbA22R9) was previously found only in *Mus musculus domesticus*, and all positive horses were bred within an area where mice (*Mus musculus musculus*) were infected with IXa family only (Kvác et al. 2013). The presence of *C. tyzzeri* IXb in horses kept in an area of IXa distribution could be explained by an ongoing infection in incoming horses, as the farm

**Table 1** Specimens detected in the study and their species/subtype identity at the SSU, gp60 and four minisatellite MS loci

Specimen ID	#farm	Country	SSU	gp60	MLST minisatellite				
					MS1	MS2	MS3	MS16	
5949CZ	#16	Czech Republic	<i>C. muris</i>	–	M1	–	–	M1	
5650CZ			<i>C. muris</i>	–	M1	M7	–	M1	
5656CZ	#21		–	IXbA22R9	–	–	–	–	
5982CZ			Horse genotype	VIaA15G4	–	–	–	–	
5999CZ			<i>C. parvum</i>	IIaA15G2R1	–	–	–	–	
9687CZ			<i>C. muris</i>	–	–	–	–	–	
13167CZ			<i>C. muris</i>	–	M1	M7	–	M1	
13169CZ			<i>C. muris</i>	–	–	M4	–	–	
13174CZ			<i>C. muris</i>	–	M1	M4	–	M1	
13175CZ			<i>C. muris</i>	–	–	–	–	M1	
13194PL	#22		Poland	<i>C. muris</i>	–	M1	–	–	M1
13200PL				<i>C. muris</i>	–	M1	M4	–	M1

served as breeding centre for young horses, which could be more susceptible to infection.

MLST subtyping provided a data on the occurrence of *C. muris* subtypes on the monitored farms. The *C. muris* subtypes obtained from horses in the Czech Republic and Poland included variants of MS1-M1, previously found in a camel, Tawny frogmouth, laboratory mouse and human; MS2-M4, found in an ostrich, Siberian chipmunk, hamster, mara, laboratory mouse and human; and MS16-M1, found in a siberian chipmunk, hamster, mara, cat, domestic and laboratory mouse (Feng et al. 2011; Wang et al. 2012). While isolates originating from horses kept in Poland had the same subtypes at MS1, MS2 and MS16 loci as isolates from Czech Republic, novel variant at the MS2 locus, named M7, were found in horses in the Czech Republic. Although it is likely that various subtypes of *C. muris* could cause infections in various hosts, the susceptibility of horses to *C. muris* and *C. tyzzeri* remains unclear. Understanding of the epidemiology of *Cryptosporidium* infections in horses is gradually improving with an increasing number of studies supported by molecular analyses, but there remains much to discover.

**Acknowledgments** The authors would like to thank the farmers for their participation. This study was funded by the Grant of the Czech Science Foundation (15-01090S) and project of the agency of University of South Bohemia (011/2013/Z).

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F (2003) Subgenotype analyses of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol* 41:2744–2747
- Burton AJ, Nydam DV, Dearen TK, Mitchell K, Bowman DD, Xiao L (2010) The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. *Vet Parasitol* 24:139–144
- Caffara M, Piva S, Pallaver F, Iacono E, Galuppi R (2013) Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from foals in Italy. *Vet J* 198:531–533
- Cole DJ, Cohen ND, Snowden K, Smith R (1998) Prevalence of and risk factors for fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in horses. *J Am Vet Med Assoc* 213:1296–1302
- de Souza PN, Bomfim TC, Huber F, Abboud LC, Gomes RS (2009) Natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. and *Eimeria leuckarti* in three groups of equines with different handlings in Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 160:327–333
- Díaz P, Castagnetti C, Marchesi B, Soilán M, López CM, Díez-Baños P, Morrondo P, Poglayen G (2012) Investigation of the zoonotic potential of *Cryptosporidium* in a diarrhoeic foal. In: *Mappe Parassitologiche XXVII Congresso Nazionale Società Italiana di Parassitologia (Alghero)*, p 251
- Feng Y, Yang W, Ryan U, Zhang L, Kváč M, Koudela B, Modrý D, Li N, Fayer R, Xiao L (2011) Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J Clin Microbiol* 49:34–41
- Gajadhar AA, Caron JP, Allen JR (1985) Cryptosporidiosis in two foals. *Can Vet J* 26:132–134
- Glaberman S, Moore JE, Lowery CJ, Chalmers RM, Sulaiman I, Elwin K, Rooney PJ, Millar BC, Dooley JS, Lal AA, Xiao L (2002) Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg Infect Dis* 8:631–633
- Grinberg A, Oliver L, Learmonth JJ, Leyland M, Roe W, Pomroy WE (2003) Identification of *Cryptosporidium parvum* ‘cattle’ genotype from a severe outbreak of neonatal foal diarrhoea. *Vet Rec* 153:628–631
- Grinberg A, Learmonth J, Kwan E, Pomroy W, Lopez Villalobos N, Gibson I, Widmer G (2008) Genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* causing foal diarrhoea. *J Clin Microbiol* 46:2396–2398
- Grinberg A, Pomroy WE, Carslake HB, Shi Y, Gibson IR, Drayto BM (2009) A study of neonatal cryptosporidiosis of foals in New Zealand. *N Z Vet J* 57:284–289
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
- Jiang J, Alderisio KA, Xiao L (2005) Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl Environ Microbiol* 71:4446–4454
- Kváč M, McEvoy J, Loudová M, Stenger B, Sak B, Květoňová D, Ditrich O, Rašková V, Moriarty E, Rost M, Macholán M, Piálek J (2013) Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *Int J Parasitol* 43:805–817
- Kváč M, McEvoy J, Stenger B, Clark M (2014a) Cryptosporidiosis in other vertebrates. In: Cacciò SM, Widmer G (eds) *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer, Wien, pp 237–326
- Kváč M, Saková K, Květoňová D, Kicia M, Wesolowska M, McEvoy J, Sak B (2014b) Gastroenteritis caused by the *Cryptosporidium* hedgehog genotype in an immunocompetent man. *J Clin Microbiol* 52:347–349
- Laatamna AE, Wagnerová P, Sak B, Květoňová D, Aissi M, Rost M, Kváč M (2013) Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog genotype in Algeria. *Vet Parasitol* 197:350–353
- Maddox-Hyttel CH, Langkjær RB, Enemark HL, Vigre H (2006) *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs—occurrence and management associated risk factors. *Vet Parasitol* 10:48–59
- Majewska AC, Solarczyk P, Tamang L, Graczyk TK (2004) Equine *Cryptosporidium parvum* infections in western Poland. *Parasitol Res* 93:274–278
- McKenzie DM, Diffay BC (2000) Diarrhoea associated with cryptosporidial oocyst shedding in a Quarterhorse stallion. *Aust Vet J* 78:27–28
- Miláček P, Vitovec J (1985) Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol* 32:50
- Mohammed HO, Wade SE, Schaaf S (1999) Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet Parasitol* 83:1–13
- Olson ME, Thorlakson CL, Deselliers L, Morck DW, McAllister TA (1997) *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet Parasitol* 68:375–381
- Perrucci S, Buggiani C, Sgorbini M, Cerchiai I, Otranto D, Traversa D (2011) *Cryptosporidium parvum* infection in a mare and her foal with foal heat diarrhoea. *Vet Parasitol* 182:333–336

- Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S (2004) A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect* 6:773–785
- Robinson G, Elwin K, Chalmers RM (2008) Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhoea. *Emerg Infect Dis* 9:1174–1176
- Ryan U, Xiao L, Read C, Zhou L, Lal AA, Pavlásek I (2003) Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 69:4302–4307
- Snyder SP, England JJ, McChesney AE (1978) Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. *Vet Pathol* 15:12–17
- Sturdee AP, Bodley-Tickell AT, Archer A, Chalmers RM (2003) Longterm study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet Parasitol* 116:97–113
- Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, Iqbal J, Khalid N, Xiao L (2005) Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol* 43:2805–2809
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 10:2731–2739
- Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, Martin SW, Nydam DV, Jamieson F, Xiao L (2006) Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitol Res* 99:346–352
- Veronesi F, Passamonti F, Caccio S, Diaferia M, Piergili Fioretti D (2010) Epidemiological survey on equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Italy and molecular characterization of isolates. *Zoonoses Public Health* 57:510–517
- Wang R, Jian F, Zhang L, Ning C, Liu A, Zhao J, Feng Y, Qi M, Wang H, Lv C, Zhao G, Xiao L (2012) Multilocus sequence subtyping and genetic structure of *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *PLoS One* 7:e43782
- Wielinga PR, de Vries A, van der Goot TH, Mank T, Mars MH, Kortbeek LM, van der Giessen JW (2008) Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in the Netherlands. *Int J Parasitol* 38:809–817
- Xiao L, Herd RP (1994) Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Equine Vet J* 26:14–17
- Xiao L, Hlavsa MC, Yoder J, Ewers C, Dearen T, Yang W, Nett R, Harris S, Brend SM, Harris M, Onischuk L, Valderrama AL, Cosgrove S, Xavier K, Hall N, Romero S, Young S, Johnston SP, Arrowood M, Roy S, Beach MJ (2009) Subtype analysis of *Cryptosporidium* specimens from sporadic cases in Colorado, Idaho, New Mexico, and Iowa in 2007: widespread occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and case history of an infection with the *Cryptosporidium* horse genotype. *J Clin Microbiol* 47:3017–3020

## **Publikace V.**

Laatamna, A.E., **Wagnerová, P.**, Sak, B., Květoňová, D., Xiao, L., Rost, M., McEvoy, J., Saadi, A.R., Aissi, M., Kváč, M. 2015. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Vet Parasitol* 208, 135–142.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Veterinary Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)

## Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse



Abd Elkarim Laatamna<sup>a,g</sup>, Pavla Wagnerová<sup>b,c</sup>, Bohumil Sak<sup>c</sup>,  
Dana Květoňová<sup>c</sup>, Lihua Xiao<sup>d</sup>, Michael Rost<sup>e</sup>, John McEvoy<sup>f</sup>,  
Ahmed Rachid Saadi<sup>g</sup>, Meriem Aissi<sup>g</sup>, Martin Kváč<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Natural Sciences and Life, University of Djelfa, Moudjbara, BP 3117, Djelfa, Algeria

<sup>b</sup> Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>c</sup> Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Parasitology, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>d</sup> Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA

<sup>e</sup> Faculty of Economics, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>f</sup> Department of Veterinary and Microbiological Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND, USA

<sup>g</sup> Higher National School of Veterinary, BP 161 Hacène Badi, EL Harrach, Algiers, Algeria

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 June 2014

Received in revised form 6 January 2015

Accepted 8 January 2015

#### Keywords:

Horses

Donkeys

*Cryptosporidium* spp.

*Encephalitozoon* spp.

*Enterocytozoon bienersi*

Molecular prevalence

### ABSTRACT

A total of 219 and 124 individual fecal samples of horses and donkeys, respectively, were screened for the presence of *Cryptosporidium* spp., *Encephalitozoon* spp., and *Enterocytozoon bienersi* DNA by genus-specific nested PCR. Isolates were genotyped by sequence analysis of SSU rRNA, GP60, TRAP-C1, COWP, and HSP70 loci in *Cryptosporidium*, and the ITS region in microsporidia. *Cryptosporidium* spp. was detected on 3/18 horse farms and 1/15 farms where donkeys were kept. Overall, five (2.3%) horse and two (1.6%) donkey specimens were PCR positive for *Cryptosporidium*. Genotyping at SSU and GP60 loci revealed that three isolates from horses and donkeys were *C. parvum* subtype family IIaA16G1R1, one isolate from a horse was *C. muris* RN66, and one isolate from a donkey was *C. muris* TS03. An isolate from a horse shared 99.4% and 99.3% similarity with *Cryptosporidium hominis* and *C. cuniculus*, respectively, at the SSU locus. This isolate shared 100% identity with *C. hominis* at the TRAP-C1, COWP, and HSP70 loci, and it was from the novel gp60 subtype family IkA15G1.

Microsporidia were found on 6/18 horse and 2/15 donkey farms. *E. bienersi* was identified in 6.8% (15/219) and 1.6% (2/124), and *Encephalitozoon cuniculi* was identified in 1.8% (4/219) and 1.6% (2/124), of horses and donkeys, respectively. Three genotypes of *E. cuniculi* (I, II and III) were detected in horses, and *E. cuniculi* genotype II was detected in donkeys. Four genotypes of *E. bienersi* (horse1, horse 2, CZ3, D) were described in horses. An additional five horses and two donkeys were positive for *E. bienersi*, but the isolated were not genotyped. Neither *Cryptosporidium* nor microsporidia prevalence were affected by sex, age, type of breeding, or whether the host was a horse or a donkey.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author at: Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic. Tel.: +420 387775419; fax: +420 385310388.

E-mail address: [kvac@paru.cas.cz](mailto:kvac@paru.cas.cz) (M. Kváč).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.007>

0304-4017/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.



## 1. Introduction

Both horses and donkeys are used worldwide for work, food, and social activities. Both wild and domestic equines are exposed to a complex mixture of multicellular and unicellular parasites. Although most of these parasites are equine-specific, horses and donkeys can be infected by host-nonspecific and zoonotic parasites including *Cryptosporidium* and several microsporidia (Grinberg et al., 2003; Kouam et al., 2010; Santín et al., 2010).

Approximately 1200 species of microsporidia are known, and they infect all major animal groups. Most of these ubiquitous obligate intracellular parasites infect invertebrates and fish, but 14 species in eight genera infect mammals (Didier et al., 1995; Didier and Weiss, 2006). Although equine microsporidiosis is known to cause abortion (Patterson-Kane et al., 2003; Szeredi et al., 2007; van Rensburg et al., 1991), microsporidia in horses remains on the periphery of scientific interest. Three recent reports have described the prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* and the course of infection of *E. cuniculi* in horses from Colombia and the Czech Republic (Santín et al., 2010; Wagnerová et al., 2012, 2013).

Protozoans of the genus *Cryptosporidium* are parasites inhabiting the digestive tract and/or respiratory systems of birds, fish, reptiles, and mammals, including equines (Mtambo et al., 1997; Ryan et al., 2003). Twenty five species and more than 40 genotypes of *Cryptosporidium* have been described to date (Ryan and Xiao, 2014), and only three of these – *C. parvum*, *C. erinacei* (previously known as *Cryptosporidium* hedgehog genotype) and *Cryptosporidium* horse genotype – are known to infect horses (Chalmers et al., 2005; Laatumna et al., 2013; Ryan et al., 2003). However, only eight of the 30 studies of horse cryptosporidiosis reported the species/genotype present (Burton et al., 2010; Grinberg et al., 2008, 2003, 2009; Chalmers et al., 2005; Imhasly et al., 2009; Ryan et al., 2003; Veronesi et al., 2010), so the actual number of *Cryptosporidium* taxa infecting horses may be greater.

A number of *Cryptosporidium* spp. (*C. parvum*, *C. erinacei* and *Cryptosporidium* horse genotype) and microsporidia (*Encephalitozoon intestinalis*, *E. cuniculi* genotypes I and II, and *E. bieneusi* – genotypes D, EbpA, G and WL15) detected in horses and donkeys to date have been shown to cause human infection (Didier et al., 2000; Mathis et al., 2005; Nichols et al., 2014). Therefore, there is a need to better understand the zoonotic potential of horse microsporidiosis and cryptosporidiosis. This study examines the prevalence of *Cryptosporidium* and microsporidia in wild and domestic horses and donkeys from Algeria.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Origin of samples and animals

The research was performed from November 2011 to May 2013 on 4 horse farms in an urban area and 20 small private farms of horses and donkeys in rural areas located in 4 provinces in Algeria. The farms were selected without previous knowledge of parasitological status, with the exception of one farm (no. 1), where

four cases of *Cryptosporidium erinacei* infection (previously known as *Cryptosporidium* hedgehog genotype) were previously reported (Laatumna et al., 2013). Farm 1, situated in province of Tiaret in west Algeria, is a national center of horse breeding that keeps up to 280 horses and serves as a supplier of horses to other farms located in the different provinces of Algeria. The management system at Farm 1 depended on the season: breeding stallions, mares, and foals spent most of the time on the pasture, except during winter, when they were housed in stables. Equestrian centers 2, 3 and 4, focus exclusively on horse breeding, are located in the capital Algiers, and breed approximately 50, 70, and 90 horses, respectively. Horses are used for horseback riding, horseracing, and show jumping and are maintained in individual boxes. Twenty farms in rural areas included 12 private farms in Bourdj Bou Arréridj (B.B.A) province and eight in Setif province. These rural areas are regions of high plateaus that are almost exclusively agricultural, and horses live in close association with cattle, other ruminants, and domestic birds. Donkeys live unrestricted in these areas and are used for transport and work. Both horses and donkeys are on pasture during the entire year, except during winter, when they are primarily housed in stables.

### 2.2. Sample collection

Fecal samples from horses and donkeys were collected directly from the rectum or from the ground immediately after defecation. Specifically, all horse fecal samples from farms 1–3 ( $n=94$ ), 40 out of 55 horse samples from farm 4, and three donkey samples from farm 15 were collected directly from rectum (Table 1). Each sample was individually placed into a sterile plastic container without fixatives, and transported in an isotherm box to the laboratory. No repeated analyses of the same animals were included in the survey to prevent cumulative prevalence.

### 2.3. DNA isolation and molecular analyses

Total DNA was extracted from 200 mg of feces by bead disruption for 60 s at 5.5 m/s using 0.5 mm glass beads in a FastPrep®24 Instrument (MP Biomedicals, CA, USA) followed by isolation/purification using a commercially available kit in accordance with the manufacturer's instructions (QIAamp® DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Purified DNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to being used for PCR. Due to the predicted low number of oocysts (<100) in examined samples, a nested PCR was required (Smith, 2008). The nested PCR approach was used to amplify a region of the small subunit of rRNA gene (SSU; ~830 bp; Jiang et al., 2005; Xiao et al., 1999) and 60 kDa glycoprotein (GP60; ~830 bp; Alves et al., 2003) in all samples. In addition, nested PCR amplifying a region of *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein (COWP; ~550 bp; Pedraza-Diaz et al., 2001; Spano et al., 1997), Thrombospondin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1; ~780 bp; Spano et al., 1998) and Heat Shock Protein (HSP70; ~1950 bp; Sulaiman et al., 2000) were used in case of detection of a novel isolate of *Cryptosporidium*. Negative and positive controls

**Table 1**  
A survey of *Cryptosporidium* spp. and microsporidia in fecal samples of horses and donkeys.

Province	No. of farm	Animal	No. of examined samples	<i>Cryptosporidium</i>		Microsporidia		
				No. of positive samples	Species (strain/family)	No. of positive samples	<i>E. bieneusi</i>	<i>E. cuniculi</i>
Tiaret	1	Horse	62	3	1 × <i>C. parvum</i> (IIaA16G1R1) 1 × <i>C. hominis</i> (IIaA15G1) 1 × <i>C. muris</i> (RN66)	9	6 × horse1 1 × horse2 1*	1 × <i>E. cuniculi</i> I
Algiers	2	Horse	15	–	–	–	–	–
	3	Horse	17	–	–	1	1*	–
	4	Horse	55	–	–	2	1*	1 × <i>E. cuniculi</i> I
	5	Horse	2	–	–	1	–	1 × <i>E. cuniculi</i> II
	6	Horse	6	–	–	1	1*	–
	7	Horse	5	–	–	–	–	–
	8	Donkey	3	–	–	–	–	–
	9	Donkey	3	–	–	–	–	–
	10	Donkey	5	–	–	–	–	–
	11	Horse	8	–	–	3	1* 1 × CZ3	1 × <i>E. cuniculi</i> III
BourdjbouArréridj		Donkey	29	–	–	1	–	1 × <i>E. cuniculi</i> II
	12	Horse	6	–	–	1	1 × D	–
		Donkey	3	–	–	–	–	–
	13	Horse	7	1	1 × <i>C. parvum</i> (IIaA16G1R1)	–	–	–
		Donkey	28	2	1 × <i>C. muris</i> (TS03) 1 × <i>C. parvum</i> (IIaA16G1R1)	1	1*	–
	14	Horse	3	–	–	–	–	–
		Donkey	3	–	–	–	–	–
	15	Horse	2	–	–	–	–	–
		Donkey	4	–	–	–	–	–
	16	Horse	2	1	1 × <i>C. parvum</i> (IIaA16G1R1)	–	–	–
	Donkey	13	–	–	1	1*	–	
17	Horse	5	–	–	–	–	–	
18	Horse	7	–	–	–	–	–	
19	Donkey	3	–	–	–	–	–	
20	Donkey	23	–	–	1	–	1 × <i>E. cuniculi</i> II	
Setif	21	Donkey	1	–	–	–	–	–
	22	Horse	11	–	–	1	1 × CZ3	–
		Donkey	1	–	–	–	–	–
	23	Horse	3	–	–	–	–	–
		Donkey	1	–	–	–	–	–
	24	Horse	3	–	–	–	–	–
	Donkey	4	–	–	–	–	–	
Total		Horse	219	5		19	15	4
		Donkey	124	2		4	2	2
		All	343	7		23	17	6

\* Unsuccessful re-sequencing at ITS locus.

(DNA of *C. tyzzeri* family IXa) were included in each PCR amplification. To identify microsporidia, a nested PCR protocol was used to amplify the internal transcribed spacer (ITS) region of the rRNA gene of *E. bieneusi*, as previously described Buckholt et al. (2002). Two primer sets, INT580F and INT580R (Didier et al., 1995) for primary and MSP3

and MSP4A (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996) for secondary PCR reaction, were used to amplify the ITS region of *Encephalitozoon* spp. Positive control DNA isolated from *E. intestinalis* and *E. bieneusi* genotype D spores and negative controls were included in each run. Both primary and secondary PCR reactions were carried out in a volume of

20  $\mu$ l; the primary reaction contained 2  $\mu$ l of genomic DNA (or water as a negative control) and the secondary reaction contained 2  $\mu$ l of the primary reaction as template. PCR amplicons were electrophoresed in 1% agarose gels and visualized with 0.2 mg/ml ethidium bromide under ultraviolet light. Purified secondary products were sequenced in both directions with an ABI 3130 genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City) using the secondary PCR primers and the BigDye1TerminatorV3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City) in 10  $\mu$ l reactions. DNA extraction and the amplification and sequencing of each locus were repeated twice for each positive sample.

#### 2.4. Phylogenetic analyses

The nucleotide sequences of each gene obtained in this study were manually edited using the program ChromasPro 1.7.5 (Technelysium, Pty, Ltd.), and aligned with previously published sequences using the MAFFT version 7 online server using the Q-INS-i algorithm for SSU sequences, L-INS-i algorithm for GP60 sequences, and the FFT-NS-1 algorithm for COWP, TRAP-C1 and HSP70 sequences (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato and Standley, 2013). Alignment adjustments were made manually to remove artificial gaps using BioEdit 7.0.5.3. Phylogenetic relationships of aligned sequences was inferred using Neighbor-Joining (NJ) methods (Saitou and Nei, 1987) based on the Kimura 2-parameter (K2P) distances model (Kimura, 1980) with pairwise deletions. Phylogenetic analyses were performed using MEGA5 (Tamura et al., 2011). The reliability of branches in trees was assessed using the bootstrap analysis with 1000 pseudoreplicates. Bootstrap values above 50% were reported. Phylograms were constructed using MEGA5 and visually edited for style using CorelDrawX5 (without changing the tree topography). Sequences generated in this study were deposited in GenBank under the accession numbers KJ941130–KJ941151.

#### 2.5. Statistical analyses

A two-sample z-test for proportions (independent groups) was used to assess relationships between parasite detection (*Cryptosporidium* species/genotype or microsporidia) and animal attributes (age, sex, and species) or management practices. Odds ratios were used to determine the significance of potential risk factor variables. The predictor variables were gender, age, housing, and host species. These were considered separately, not simultaneously. All computations were performed with R 2.15.1.

### 3. Results

A total of 343 individual fecal samples from 219 horses and 124 donkeys on 18 and 15 farms, respectively, were examined using molecular tools for the presence of *Cryptosporidium* and microsporidia (*Encephalitozoon* spp. and *E. bienersi*) specific DNA (Table 1). No samples collected

from the ground were positive for *Cryptosporidium* or microsporidia.

#### 3.1. *Cryptosporidium* in horses and donkeys

Overall, *Cryptosporidium* was detected on 3 of 18 examined horse farms and on one farm in a rural area where donkeys were kept. The prevalence of *Cryptosporidium* DNA in fecal samples on all farms and the distribution by age category and housing system is described in Table 2. Targeting the SSU gene, *Cryptosporidium* was detected in five horses (2.3%) and two donkeys (1.6%). Partial SSU sequences shared 100% identity with sequences of the following species in GenBank: 4  $\times$  *C. parvum* (GenBank accession number: AF093493), 1  $\times$  *C. muris* TS03 (EU245043) and 1  $\times$  *C. muris* RN66 (EU245045). Additionally, novel SSU sequence from a horse (isolate 12328) shared 99.4% and 99.3% similarity, respectively, with *Cryptosporidium hominis* and *C. cuniculi* (Table 1, Fig. 1A). Sequences of COWP, TRAP-C1, and HSP70 genes from isolate 12328 shared 100% identity with *C. hominis* (Fig. 1B–E). All *C. parvum* gp60 sequences were subtype A16G1R1 in the family IIa. The *C. hominis* gp60 subtype, A15G1, belonged to a new subtype family, Ik, which clustered with the *C. hominis* monkey genotype family Ii and *C. cuniculi* family Vb (Fig. 1D). All genotypes are based on sequences from three independent DNA extractions from positive samples. *Cryptosporidium* prevalence did not vary significantly with age, sex, or farming practices of equines (all resulted in non-significant odds ratios;  $P > 0.05$ ). There were no differences in *Cryptosporidium* detection between horses and donkeys in rural areas. No *Cryptosporidium* positive horses or donkeys showed signs of diarrhea at the time of sampling.

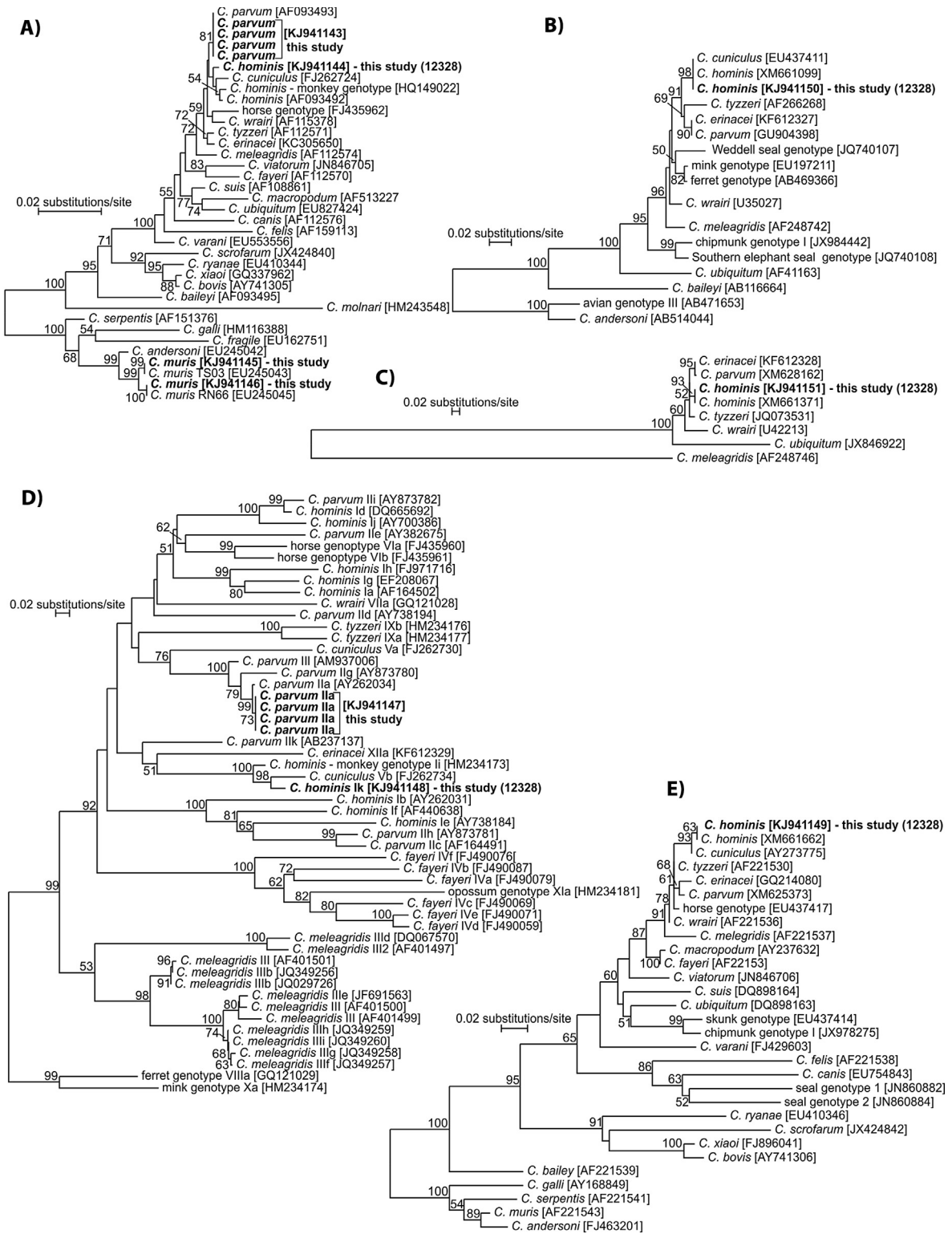
#### 3.2. *Entrocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon cuniculi* in horses and donkeys

Nineteen (8.7%) of 219 horses were positive for microsporidia. Of these, 15 (6.8%) were positive for *E. bienersi* and four (1.8%) were positive for *Encephalitozoon* spp. Two (1.6%) out of 124 donkeys were positive either for *E. bienersi* or *Encephalitozoon* spp. Sequence analysis of the ITS region of *Encephalitozoon* spp. revealed the presence of three genotypes of *E. cuniculi*, I ( $n = 2$ ), II ( $n = 3$ ), and III ( $n = 1$ ) (Table 1; GenBank accession numbers: KJ941140–KJ941142). All three *E. cuniculi* genotypes were found in horses but only genotype II was found in donkeys (Table 1). Genotypes of *E. cuniculi* are based on ITS sequences from three independent DNA extractions from positive samples.

Ten genotypes were identified from 17 *E. bienersi* positive samples: eight in horses and two in donkeys (Table 1). Genotypes are based on sequences from three independent DNA extractions from positive samples. Sequencing was not reproducible in the remaining seven *E. bienersi* positive samples, so isolates from these samples are identified only as *E. bienersi*.

Horses were positive for *E. bienersi* genotype horse 1, horse 2, D and CZ3, previously found also in horses. In addition, five horses and two donkeys were positive for *E. bienersi* (Table 1). The prevalence of microsporidial DNA in





**Fig. 1.** Neighbor-joining trees depicting phylogenetic relationships among *Cryptosporidium* spp. and genotypes, including those detected in present study (highlighted), inferred from a partial fragment of (A) small subunit of ribosomal gene (743 base positions in the final dataset), (B) COWP (384 base positions in the final dataset), (C) TRAP-C1 (523 base positions in the final dataset), (D) GP60 (859 base positions in the final dataset) and (E) HSP70 (277 base positions in the final dataset) genes. The Kimura 2-parameter (K2P) model was used in all trees. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates). Numbers at the nodes represent bootstrap values for the nodes gaining more than 50% support. Scale bar included in each tree.

**Table 2**  
Distribution of *Cryptosporidium* spp. and microsporidia in horses and donkeys by housing management, age and sex.

Animal	Variable	<i>Cryptosporidium</i>		Microsporidia
		n	No. of positive animals (%)	No. of positive animals (%)
Horses	Gender			
	Male	98	3 (3.7)	8 (8.2)
	Female	121	2 (1.7)	11 (9.1)
	Age			
	>3 yr	147	2 (1.4)	10 (6.8)
	6 mth–3 yr	26	1 (3.8)	2 (7.7)
	<6 mth	46	2 (4.3)	7 (15.2)
Housing	Commercial	149	3 (2.0)	12 (8.1)
	Rural areas	70	2 (2.9)	7 (10.0)
Donkeys	Gender			
	Male	11	0 (0.0)	0 (0.0)
	Female	113	2 (1.8)	4 (3.5)
	Age			
	>3 yr	114	2 (1.8)	4 (3.5)
	6 mth–3 yr	2	0 (0.0)	0 (0.0)
	<6 mth	8	0	0

fecal samples on all farms and the distribution by age category and housing system is described in Table 2. Although *E. bieneusi* was 2.5-times more likely to occur in horses than donkeys, the difference was not statistically different. In addition, the prevalence of microsporidial genera in horses and donkeys showed no sex, age, or management dependent association (all resulted in non-significant odds ratios;  $P > 0.05$ ).

#### 4. Discussion

The prevalence of *Cryptosporidium* and microsporidial in horses and donkeys in Algeria was low in this study. Low occurrence of microsporidia is in agreement with previous studies performed in Colombia and Czech Republic (Santín et al., 2010; Wagnerová et al., 2012). The low prevalence of *Cryptosporidium* is in agreement with most previous studies (e.g. Cole et al., 1998; De Souza et al., 2009; Epe et al., 2004; Laatumna et al., 2013; Majewska et al., 2004, 1999; Sturdee et al., 2003). In contrast, some studies have reported prevalence rates between 10–31% (Caffara et al., 2013; Grinberg et al., 2009; Netherwood et al., 1996; Xiao and Herd, 1994). However, relative to cattle and pigs, where prevalence often exceeds 50–60%, and cumulative prevalence approaches 100% (e.g. Sak et al., 2008; Santín et al., 2008), horses are rarely infected with *Cryptosporidium* and microsporidia. While most previous studies have shown a higher prevalence of *Cryptosporidium*, primarily *C. parvum*, in foals worldwide (see Burton et al., 2010), any variability in presence of *Cryptosporidium* spp. between age categories was not observed in this study. Similarly, this study found that *Cryptosporidium* prevalence did not differ between males and females. Santín et al. (2010) found a significantly higher prevalence of *E. bieneusi* in horses younger than 1 year of age; however, similar to Wagnerová et al. (2012), any dependence of microsporidial presence on age of equines was not detected in the present study. In addition, microsporidia prevalence did not differ between the sexes in the present study, which is consistent with previous findings in horses (Santín et al., 2010).

*Cryptosporidium parvum* is the only *Cryptosporidium* spp. reported to cause diarrheal disease in horses: similar to cattle, disease is associated with younger animals (Caffara et al., 2013; Grinberg et al., 2009; Perrucci et al., 2011). None of the species identified in this study, including *C. parvum*, was associated with diarrheal disease in horses or donkeys. The association between microsporidia infection and diarrhea in horses remains unclear. No signs of diarrhea were reported in microsporidia positive horses in the present and previous studies (Santín et al., 2010; Wagnerová et al., 2012). Microsporidia, primarily *E. cuniculi*, has been reported to cause reproductive problems in horses, including placentitis, abortion, and stillbirth (Patterson-Kane et al., 2003; van Rensburg et al., 1991).

This is the first report of *C. muris* DNA detected in horse feces. Although this species has been found in wide spectrum of vertebrate hosts including mammals, birds, and reptiles (Kváč et al., 2014), it is considered to be relatively specific for some rodents and camels and its presence in hosts such as pigs, snakes, and raptors is due to mechanical transport (Kváč et al., 2012). By targeting DNA in the present study, it was not possible to differentiate active infections from passive carriage. Further research will be required to determine the extent to which horses can be actively infected with *C. muris*.

*Cryptosporidium parvum* belonging to gp60 family IIa, subtypes A15G2R1 and A18G3R1, have been reported previously in horses (Díaz et al., 2012; Grinberg et al., 2008). *Cryptosporidium parvum* isolates from horses and donkeys in the present study were identified as IIaA16G1R1 subtype at gp60 locus. Although this subtype is common in domestic ruminants and humans worldwide (Herges et al., 2012; Robertson et al., 2014), this is the first report on its occurrence in horses and donkeys.

Considering the high specificity of *C. hominis* for humans, detecting this species in horses (isolate 12328) in the present study was unexpected. Based on SSU data, it is possible that isolate 12328, which shares 99.4% similarity with *C. hominis* and 99.3% similarity with *C. cuniculus*, represents a distinct species/genotype. There is precedent

for closely related *Cryptosporidium* SSU genotypes being recognized as separate species: *C. andersoni* and *C. muris* share 99.1% similarity, and *C. bovis* and *C. xiaoi* share 99.5% similarity at the SSU locus. However, the findings that isolate 12328 did not differ from *C. hominis* at the HSP70, COWP, and TRAP-C1 loci supports the conclusion that it is *C. hominis*. Other *Cryptosporidium* spp. varies intra-specifically at the SSU locus, probably due to the presence of divergent gene paralogs; for example, *C. ubiquitum* SSU sequences share 96.3–99.8% similarity, although COWP, HSP70, and actin sequences of this species are identical. At the gp60 locus, isolate 12328 formed a novel subtype family, Ik, which clustered with *C. cuniculus* family Vb and *C. hominis* monkey genotype family Ii. Isolate 12328 could represent a recently horse-adapted lineage of *C. hominis* that has not yet diverged sufficiently to be recognized as a separate species. It is worth noting that rabbit-adapted *C. cuniculus* and human-adapted *C. hominis* are only marginally more divergent at the HSP70 locus, and share 100% similarity at the COWP locus.

A phylogenetic analysis of all ITS sequences, performed on a multiple alignment that included representatives of *E. bienersi* genotypes accessible in GenBank, revealed occurrences of *E. bienersi* genotypes previously reported in horses (D, CZ3, Horse 1 and 2). With the exception genotype horse 2, all genotypes detected in this study belonged to group 1, which comprises numerous genotypes from diverse hosts worldwide, including human and non-human primates, and domestic, captive, and wild animals (Thellier and Breton, 2008). Genotypes horse 1 and 2 have been detected only in horses (Santín et al., 2006; Wagnerová et al., 2012). In contrast, genotype CZ3 also has been described from mice and humans in Germany and Czech Republic, respectively, and genotype D, which is one of the most widespread genotypes, has been reported in at least 15 hosts, including human, gorilla, cynomolgus monkey, cattle, alpaca, domestic pig, wild boar, cat, fox, dog, beaver, muskrat, raccoon, falcon, and pigeons worldwide (Sak et al., 2011; Santín and Fayer, 2011).

Genotype horse 1 (detected in 6 horses) occurred more frequently than genotype horse 2 (detected in 1 horse on the same farm) in the present study. This is consistent with the findings of a study of South American horses, where genotypes horse 1 and horse 2 were found in 62% and 19% of horses, respectively (Santín et al., 2010). In contrast, Wagnerová et al. (2012) detected genotype horse 2 at twice the frequency of genotype horse 1 in the Czech Republic.

Analysis of the ITS region of *Encephalitozoon* spp. showed the presence of all three *E. cuniculi* genotypes in horses; whereas only genotype II was found in donkeys. While *E. cuniculi* genotype I was found on suburban farms focused exclusively on horse breeding, genotypes II and III were detected in rural areas. Wagnerová et al. (2012) also found differences in the distribution of *E. cuniculi* genotypes in horses: genotype I predominated in stabled horses and genotype II predominated in horses on pasture. *Encephalitozoon cuniculi* genotypes infect a wide range of mammals, including rodents, rabbits, carnivores, swine, human and nonhuman primates, and birds (Mathis et al., 2005); therefore, differences in genotype distribution may be associated with different sources of infection.

## 5. Conclusion

The finding of *C. hominis* and *C. muris* in horses increases the number of *Cryptosporidium* spp. reported in horses from three to five. Although the relationship between *Cryptosporidium* and microsporidia of horses and disease remains unclear, this study has shown that horses and donkeys have the potential to transmit human-pathogenic parasites. However, given the low prevalence of all parasitic taxa, this risk appears to be low.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Hadouch Zohra (responsible veterinarian in the farm of Tiaret), Samari Housam (private veterinarian in the province of BBA), Bادهم Nadir (private veterinarian in the rural area Ouled Braheme) for their participation on material sampling. This study was funded by the Grant of the Czech Science Foundation (15-01090S) and project of the Grant Agency of University of South Bohemia (O11/2013/Z). The opinions expressed by authors contributing to this journal do not necessarily reflect the opinions of the Centers for Disease Control and Prevention or the institutions with which the authors are affiliated.

## References

- Alves, M., Xiao, L.H., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O., Antunes, F., 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2744–2747.
- Buckholt, M.A., Lee, J.H., Tzipori, S., 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bienersi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2595–2599.
- Burton, A.J., Nydam, D.V., Dearen, T.K., Mitchell, K., Bowman, D.D., Xiao, L., 2010. The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. *Vet. Parasitol.* 174, 139–144.
- Caffara, M., Piva, S., Pallaver, F., Iacono, E., Galuppi, R., 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from foals in Italy. *Vet. J.* 198, 531–533.
- Chalmers, R.M., Thomas, A.L., Butler, B.A., Morel, M.C., 2005. Identification of *Cryptosporidium parvum* genotype 2 in domestic horses. *Vet. Rec.* 156, 49–50.
- Cole, D.J., Cohen, N.D., Snowden, K., Smith, R., 1998. Prevalence of and risk factors for fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 1296–1302.
- De Souza, P.N., Bomfim, T.C., Huber, F., Abboud, L.C., Gomes, R.S., 2009. Natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. and *Eimeria leuckarti* in three groups of equines with different handlings in Rio de Janeiro. *Braz. Vet. Parasitol.* 160, 327–333.
- Díaz, P., Castagnetti, C., Marchesi, B., Soilán, M., López, C.M., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Poglajen, G., 2012. Investigation of the zoonotic potential of *Cryptosporidium* in a diarrhoeic foal. In: *Mappe Parasitologiche XXVII Congresso Nazionale Società Italiana di Parasitologia (Alghero)*, p. 251.
- Didier, E.S., Didier, P.J., Snowden, K.F., Shaddock, J.A., 2000. Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infect./Inst. Pasteur* 2, 709–720.
- Didier, E.S., Vossbrinck, C.R., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C., Shaddock, J.A., 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111 (Pt 4), 411–421.
- Didier, E.S., Weiss, L.M., 2006. Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 485–492.
- Epe, C., Coati, N., Schnieder, T., 2004. Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 111, 243–247.
- Grinberg, A., Learmonth, J., Kwan, E., Pomroy, W., Lopez Villalobos, N., Gibson, I., Widmer, G., 2008. Genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* causing foal diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2396–2398.

- Grinberg, A., Oliver, L., Learmonth, J.J., Leyland, M., Roe, W., Pomroy, W.E., 2003. Identification of *Cryptosporidium parvum* 'cattle' genotype from a severe outbreak of neonatal foal diarrhoea. *Vet. Rec.* 153, 628–631.
- Grinberg, A., Pomroy, W.E., Carslake, H.B., Shi, Y., Gibson, I.R., Drayton, B.M., 2009. A study of neonatal cryptosporidiosis of foals in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 57, 284–289.
- Herges, G.R., Widmer, G., Clark, M.E., Khan, E., Giddings, C.W., Brewer, M., McEvoy, J.M., 2012. Evidence that *Cryptosporidium parvum* populations are panmictic and unstructured in the Upper Midwest of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8096–8101.
- Imhasly, A., Frey, C.F., Mathis, A., Straub, R., Gerber, V., 2009. Cryptosporidiosis (*C. parvum*) in a foal with diarrhoea. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 151, 21–26.
- Jiang, J., Alderisio, K.A., Xiao, L., 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4446–4454.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Loscher, T., Rinder, H., 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health* 1, 373–378.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Kouam, M.K., Diakou, A., Kanzoura, V., Papadopoulos, E., Gajadhar, A.A., Theodoropoulos, G., 2010. A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. *Vet. Parasitol.* 170, 170–175.
- 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., McEvoy, J., Stenger, B., Clark, M., 2014. Cryptosporidiosis in other vertebrates. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, pp. 237–326.
- Laatumna, A.E., Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Aissi, M., Rost, M., Kváč, M., 2013. Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog genotype in Algeria. *Vet. Parasitol.* 197, 350–353.
- Majewska, A.C., Solarczyk, P., Tamang, L., Graczyk, T.K., 2004. Equine *Cryptosporidium parvum* infections in western Poland. *Parasitol. Res.* 93, 274–278.
- Majewska, A.C., Werner, A., Sulima, P., Luty, T., 1999. Survey on equine cryptosporidiosis in Poland and the possibility of zoonotic transmission. *Ann. Agric. Environ. Med.* 6, 161–165.
- Mathis, A., Weber, R., Deplazes, P., 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 423–445.
- Mtambo, M.M., Sebatwale, J.B., Kambarege, D.M., Muhairwa, A.P., Maeda, G.E., Kusiluka, L.J., Kazwala, R.R., 1997. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in cattle and wildlife in Morogoro region, Tanzania. *Prev. Vet. Med.* 31, 185–190.
- Netherwood, T., Wood, J.L.N., Townsend, H.G.G., Mumford, J.A., Chanter, N., 1996. Foal diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom associated with *Clostridium perfringens*, rotavirus, *Strongyloides westeri* and *Cryptosporidium* spp. *Epidemiol. Infect.* 117, 375–383.
- Nichols, G.L., Chalmers, R.M., Hadfield, S.J., 2014. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, pp. 237–326.
- Patterson-Kane, J.C., Caplazi, P., Rurangirwa, F., Tramontin, R.R., Wolfson, K., 2003. *Encephalitozoon cuniculi* placentitis and abortion in a quarterhorse mare. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 57–59.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Nichols, G.L., McLaughlin, J., 2001. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 49–56.
- Perrucci, S., Buggiani, C., Sgorbini, M., Cerchiai, I., Otranto, D., Traversa, D., 2011. *Cryptosporidium parvum* infection in a mare and her foal with foal heat diarrhoea. *Vet. Parasitol.* 182, 333–336.
- Robertson, L.J., Björkman, C., Axén, C., Fayer, R., 2014. Cryptosporidiosis in farmed animals. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, pp. 149–236.
- Ryan, U., Xiao, L., 2014. Taxonomy and molecular taxonomy. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, pp. 3–42.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A.A., Pavlásek, I., 2003. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4302–4307.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sak, B., Brady, D., Pelikánová, M., Květoňová, D., Rost, M., Kostka, M., Tolarová, V., Hůzová, Z., Kváč, M., 2011. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1064–1070.
- 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.
- Santín, M., Fayer, R., 2011. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Res. Vet. Sci.* 90, 363–371.
- Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet. Parasitol.* 155, 15–23.
- 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.
- Santín, M., Vecino, J.A., Fayer, R., 2010. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bieneusi* in horses. *J. Parasitol.* 96, 157–161.
- Smith, H., 2008. Diagnostics. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 173–208.
- Spano, F., Putignani, L., McLaughlin, J., Casemore, D.P., Crisanti, A., 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 150, 209–217.
- Spano, F., Putignani, L., Naitza, S., Puri, C., Wright, S., Crisanti, A., 1998. Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 147–162.
- Sturdee, A.P., Bodley-Tickell, A.T., Archer, A., Chalmers, R.M., 2003. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet. Parasitol.* 116, 97–113.
- Sulaiman, I.M., Morgan, U.M., Thompson, R.C., Lal, A.A., Xiao, L., 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2385–2391.
- Szeredi, L., Pospischil, A., Dencso, L., Mathis, A., Dobos-Kovacs, M., 2007. A case of equine abortion caused by *Encephalitozoon* sp. *Acta Vet. Hung.* 55, 525–532.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Thellier, M., Breton, J., 2008. *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15, 349–358.
- van Rensburg, I.B., Volkmann, D.H., Soley, J.T., Stewart, C.G., 1991. *Encephalitozoon* infection in a still-born foal. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 62, 130–132.
- Veronesi, F., Passamonti, F., Caccio, S., Diaferia, M., Piergili Fioretti, D., 2010. Epidemiological survey on equine cryptosporidium and giardia infections in Italy and molecular characterization of isolates. *Zoonoses Public Health* 57, 510–517.
- Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Buňatová, Z., Civišová, H., Maršálek, M., Kváč, M., 2012. *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* in horses kept under different management systems in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 190, 573–577.
- Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Maršálek, M., Langrová, I., Kváč, M., 2013. Humoral immune response and spreading of *Encephalitozoon cuniculi* infection in experimentally infected ponies. *Vet. Parasitol.* 197, 1–6.
- Xiao, L., Herd, R.P., 1994. Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Equine Vet. J.* 26, 14–17.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C., Fayer, R., Lal, A.A., 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3386–3391.

## **Publikace VI.**

Occurrence of *Cryptosporidium* and microsporidia in free-roaming Mustangs and Chincoteque pony in Oregon, North Dakota, and Virginia (USA)

**Title:** *Cryptosporidium parvum* and *Enterocytozoon bieneusi* in American Mustangs and Chincoteague ponies

**Names of authors**

Pavla Wagnerová <sup>a,b</sup>, Bohumil Sak <sup>b</sup>, John McEvoy <sup>c</sup>, Michael Rost <sup>d</sup>, Dawn Sherwood <sup>e</sup>, Kevin Holcomb <sup>f</sup>, Martin Kváč <sup>a,b\*</sup>

**Author affiliations**

<sup>a</sup> Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Parasitology, Biology Centre of Czech Academy of Science, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Veterinary and Microbiological Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA

<sup>d</sup> Faculty of Economics, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

<sup>e</sup> Department of Animal and Rangeland Sciences, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA

<sup>f</sup> Chincoteague National Wildlife Refuge, Chincoteague Island, Virginia, USA

**Address of corresponding author**

\* Author for correspondence: Martin Kváč, Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Branišovská 31, České Budějovice, 370 05, Czech Republic

Phone: +420 387775419; Fax: +420 385310388; E-mail address: kvac@paru.cas.cz (M. Kváč).

## **Keywords**

feral horses; *Cryptosporidium*; SSU; gp60; microsporidia; ITS

## **Abstract**

The prevalence of *Cryptosporidium* and microsporidia in feral horses, which have minimal contact with livestock and humans, is not currently known. We report the findings of a study on *Cryptosporidium* and microsporidia in 34 Mustangs and 50 Chincoteague ponies in the USA. Fecal samples were screened for presence of *Cryptosporidium* spp. by analysis of the small-subunit rRNA (SSU) and 60-kDa glycoprotein (gp60) genes, and *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. by analysis of the ribosomal internal transcribed spacer region (ITS). *Cryptosporidium* spp. and *E. bieneusi* were detected in 28/84 (33.3%) and 7/84 (8.3%) samples, respectively. Sequence analysis of SSU and ITS revealed the presence of *C. parvum* (n=20) and *E. bieneusi* genotype horse 1 (n=7), respectively. Subtyping of *C. parvum* isolates at the gp60 locus showed the presence of subtype IIaA17G2R1 in Mustangs and subtypes IIaA13G2R1 and IIaA15G2R1 in Chincoteague ponies. *Enterocytozoon bieneusi* genotype horse 1 was detected in Mustangs (n=2) and Chincoteague ponies (n=5). No *Cryptosporidium* or *E. bieneusi* positive animals had diarrhea. Feral Mustangs and Chincoteague ponies host the same *Cryptosporidium* and microsporidia species found horses that are closely managed by humans.

## **Introduction**

The extant horse species are *Equus ferus caballus* (domestic horse) and *Equus ferus przewalskii* (Przewalski's horse or wild horse). Most domestic horses are closely managed by humans and are used for work and recreation, but some horses of domestic ancestry became feral through escape and release from human settlements and they subsequently adopted behaviors more similar to wild horses. These feral horses are minimally managed by humans.



*Cryptosporidium* parasitizes cells of the gastrointestinal epithelium, causing a diarrheal disease that can be chronic and fatal in immunocompromised individuals. *Cryptosporidium* horse genotype was originally identified in a Przewalski's horse at a zoo in the Czech Republic (Ryan et al., 2003) and subsequently in domestic horses in the Czech Republic (Wagnerová et al., 2015), USA (Burton et al., 2010), and Italy (Caffara et al., 2013). Domestic horses also host *C. parvum*, a major zoonotic species, and rarely *C. hominis*, *C. muris*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei*, and *C. felis* (Guo et al., 2014; Laatamna et al., 2013; 2015; Wagnerová et al., 2015). Although there have been more than 30 reports worldwide describing the natural occurrence of *Cryptosporidium* spp. in domestic horses (Burton et al., 2010; Imhasly et al., 2009; Laatamna et al., 2013; Laatamna et al., 2015; Majewska et al., 2004; Majewska et al., 1999; Wagnerová et al., 2015; Xiao and Herd, 1994), there is no record of the occurrence of this parasite in feral horses.

Microsporidia are obligate intracellular parasites that infect a wide range of invertebrate and vertebrate hosts (Didier and Weiss, 2006). There are more than 1,200 microsporidian species and several are important parasites of vertebrates, including *Encephalitozoon hellem* in birds, *E. intestinalis* in humans, and the broadly-specific *E. cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* (Cacciò and Pozio, 2001; Camero et al., 1999). Although microsporidia are known to cause abortion in horses (Patterson-Kane et al., 2003; Szeredi et al., 2007; van Rensburg et al., 1991), there have been few studies describing the prevalence of these parasites in horses (Laatamna et al., 2015; Santín et al., 2010; Wagnerová et al., 2012; 2013).

The objective of this study was to determine the prevalence and diversity of *Cryptosporidium* spp. and microsporidia in feral Mustangs and Chincoteague ponies the USA.

## **Material and methods**

### **Origin of samples and sampling**



The research was performed at two locations in the USA. Thirty-four Mustangs were sampled from Oregon. Fifty Chincoteague ponies were sampled from Chincoteague National Wildlife Refuge in Virginia.

Each fecal sample was collected from the ground after defecation, placed into a separate plastic container, and transported to the laboratory for examination. The fecal consistency was noted at the time of sampling.

### **Parasite genotyping**

Total DNA was extracted from 0.2 g faecal samples by phenol-chloroform extraction and purified using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) as previously described (Feltus et al., 2006; Peng et al., 2003).

Nested PCR protocols were used to amplify fragments of the *Cryptosporidium* small-subunit (SSU) rRNA (Jiang et al., 2005) and 60-kDa glycoprotein (gp60) genes (Alves et al., 2003). Only samples that were positive for SSU were screened for the gp60 gene. All samples were analyzed in duplicate. A nested PCR protocol was used to amplify the internal transcribed spacer (ITS) region of the rRNA gene of *E. bieneusi*, as previously described (Buckholt et al., 2002). Negative (water instead of DNA) and positive (DNA of *C. muris* for SSU, *C. hominis* for gp60 and *E. bieneusi* genotype D for ITS) controls were used in each reaction.

PCR products were visualized following electrophoresis on a 2% agarose gel containing 0.2 g/ml ethidium bromide. Sequencing was performed on an ABI 3730XL sequence analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequences were assembled by using ChromasPro 1.7.6. ([www.technelysium.com.au/ChromasPro.html](http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html)), edited by using BioEdit 7.04 ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)), and aligned using MAFFT version 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) online server with automatic selection of alignment

mode. The optimal nucleotide substitution model was selected and phylogenetic trees were inferred by the Neighbor-Joining (NJ) method using MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/>) (Tamura et al., 2011). Bootstrap support for branching was based on 1000 replications. Phylograms were edited for style using CorelDrawX7 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Canada). Sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers KT148950-KT148960.

### **Statistical analyses**

We used the chi-squared test of independence to test relationship between the variables. In some cases we used Generalized Fisher exact test due to small cell counts in analyzed contingency tables. All computations were performed by programming environment R 3.0.2. (<http://www.r-project.org/>).

### **Results**

Seven out of eight-four (8.3%) samples from horses in Oregon and Virginia were positive for *E. bieneusi* DNA, and isolates from five positive samples were successfully genotyped.

Phylogenetic analysis revealed the presence of *E. bieneusi* genotype horse 1 in all samples (Table 1).

Twenty-eight out of eight-four (33.3%) samples were positive for *Cryptosporidium* spp. DNA (Table 1), and isolates from 20 and 13 positive samples were successfully sequenced at the SSU and gp60 genes, respectively. Phylogenetic analysis revealed the presence of three *Cryptosporidium parvum* subtypes from the gp60 family IIa. Subtype IIaA17G2R1 was found in Mustangs from Oregon, and subtypes IIaA13G2R1 and IIaA15G2R1 were found in Chincoteague ponies (Figure 1). *Cryptosporidium* was detected in Chincoteague ponies more

frequently than Mustangs (p-value =  $3.847 \times 10^{-5}$ ). None of the positive horses showed signs of diarrhea at the time of sampling.

## **Discussion**

The present study is the first on *Cryptosporidium* and microsporidia in feral horses. North American feral horses have a domesticated ancestry, but they behave like wild horses in that they live in small bands and have minimal contact with humans. It was therefore unexpected to find that feral Mustangs and Chincoteague ponies had a high prevalence of *C. parvum*, a zoonotic pathogen of humans and neonatal ruminants. Previous studies on *Cryptosporidium* in domesticated horses that are closely managed by humans have shown a prevalence of *C. parvum* ranging from 1 to 24%. Although *C. parvum* has been reported in adult horses (Laatamna et al., 2015; Majewska et al., 2004; Veronesi et al., 2010; Wagnerová et al., 2015), it most frequently infects foals (Caffara et al., 2013; Grinberg et al., 2009; Perrucci et al., 2011; Veronesi et al., 2010). The high prevalence in Chincoteague ponies could be explained by the limited area occupied by the animals in Chincoteague National Wildlife Refuge, thereby increasing the environmental burden and infection through contaminated water (Herges et al., 2012).

The *C. parvum* gp60 subtypes from Mustangs and Chincoteague ponies have previously been found in humans and livestock worldwide (Caffara et al., 2013; Herges et al., 2012; Wielinga et al., 2008; Xiao et al., 2007), but only IIaA15G2R1 has been reported previously in horses (Wagnerová et al., 2015).

Although *C. parvum* is the only *Cryptosporidium* spp. reported to cause diarrheal disease in horses (Caffara et al., 2013; Grinberg et al., 2009; Perrucci et al., 2011), fecal samples from horses in the present study showed no signs of diarrhea, and the horses may be asymptomatic carries of *C. parvum* infection (Laatamna et al., 2015; Wagnerová et al., 2015).

The absence of *Encephalitozoon* spp. from horses in the present study is in contrast to previous studies on microsporidia in farmed horses (Laatamna et al., 2015; Wagnerová et al., 2012). The prevalence of *E. bienersi* in the present study, ranging from 5 to 11%, is similar to the burden observed in horses that are closely managed by humans (Laatamna et al., 2015; Wagnerová et al., 2012; 2013). The detection of *E. bienersi* genotype horse 1 in both Chincoteague ponies and Mustangs is consistent with reports on horses from Algeria, Colombia, the Czech Republic, and Poland (Laatamna et al., 2015; Santín et al., 2010; Wagnerová et al., 2012). Although *E. bienersi* genotype horse 1 belongs to group 1 (zoonotic or those without host specificity) on the basis of standardized nomenclature (Thellier and Breton, 2008), it has only ever been detected in horses and therefore appears to be horse specific.

## **Conclusions**

In conclusion, despite having minimal contact with humans, feral Mustangs and Chincoteague ponies host *Cryptosporidium* and microsporidia species that are similar to those found in closely managed horses and they could be a source of zoonotic disease.

## **Acknowledgement**

This study was funded by the Grant of the Czech Science Foundation (15-01090S), project of the Grant Agency of University of South Bohemia (011/2013/Z), and United States Department of Agriculture National Research Initiative (Project # 2008-35102-19260).

## **References**

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

- Buckholt, M. A., Lee, J. H., Tzipori, S., 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2595-2599.
- Burton, A. J., Nydam, D. V., Dearen, T. K., Mitchell, K., Bowman, D. D., Xiao, L., 2010. The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. *Vet. Parasitol.* 174, 139-144.
- Cacciò, S., Pozio, E., 2001. Molecular identification of food-borne and water-borne protozoa. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 32 Suppl 2, 156-158.
- Caffara, M., Piva, S., Pallaver, F., Iacono, E., Galuppi, R., 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from foals in Italy. *Vet. J.* 198, 531-533.
- Camero, L., Arrowood, M., Shulaw, W., Lal, A. A., Xiao, L., 1999. Characterization of new monoclonal antibodies against *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 58S-59S.
- Didier, E. S., Weiss, L. M., 2006. Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 485-492.
- 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.
- Grinberg, A., Pomroy, W. E., Carslake, H. B., Shi, Y., Gibson, I. R., Drayton, B. M., 2009. A study of neonatal cryptosporidiosis of foals in New Zealand. *N Z Vet J* 57, 284-289.
- Guo, P. F., Chen, T. T., Tsaihong, J. C., Ho, G. D., Cheng, P. C., Tseng, Y. C., Peng, S. Y., 2014. Prevalence and species identification of *Cryptosporidium* from fecal samples of horses in Taiwan. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 45, 6-12.

- Herges, G. R., Widmer, G., Clark, M. E., Khan, E., Giddings, C. W., Brewer, M., McEvoy, J. M., 2012. Evidence that *Cryptosporidium parvum* populations are panmictic and unstructured in the Upper Midwest of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8096-8101.
- Imhasly, A., Frey, C. F., Mathis, A., Straub, R., Gerber, V., 2009. [Cryptosporidiose (*C. parvum*) in a foal with diarrhea]. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 151, 21-26.
- Jiang, J., Alderisio, K. A., Xiao, L., 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4446-4454.
- Laatamna, A. E., Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Aissi, M., Rost, M., Kváč, M., 2013. Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog genotype in Algeria. *Vet. Parasitol.* 197, 350-353.
- Laatamna, A. E., Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Xiao, L., Rost, M., McEvoy, J., Saadi, A. R., Aissi, M., Kváč, M., 2015. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Vet. Parasitol.* 208, 135-142.
- Majewska, A. C., Solarczyk, P., Tamang, L., Graczyk, T. K., 2004. Equine *Cryptosporidium parvum* infections in western Poland. *Parasitol. Res.* 93, 274-278.
- Majewska, A. C., Werner, A., Sulima, P., Luty, T., 1999. Survey on equine cryptosporidiosis in Poland and the possibility of zoonotic transmission. *Ann Agric Environ Med* 6, 161-165.
- 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.

- Peng, M. M., Wilson, M. L., Holland, R. E., Meshnick, S. R., Lal, A. A., Xiao, L., 2003. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. *Parasitol. Res.* 90, 175-180.
- Perrucci, S., Buggiani, C., Sgorbini, M., Cerchiai, I., Otranto, D., Traversa, D., 2011. *Cryptosporidium parvum* infection in a mare and her foal with foal heat diarrhoea. *Vet. Parasitol.* 182, 333-336.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A. A., Pavlásek, I., 2003. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 430264307.
- Santín, M., Vecino, J. A., Fayer, R., 2010. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bieneusi* in horses. *J. Parasitol.* 96, 157-161.
- Szeredi, L., Pospischil, A., Dencso, L., Mathis, A., Dobos-Kovacs, M., 2007. Case of equine abortion caused by *Encephalitozoon* sp. *Acta Vet. Hung.* 55, 525-532.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 273162739.
- Thellier, M., Breton, J., 2008. *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15, 349-358.
- van Rensburg, I. B., Volkmann, D. H., Soley, J. T., Stewart, C. G., 1991. *Encephalitozoon* infection in a still-born foal. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 62, 130-132.
- Veronesi, F., Passamonti, F., Caccio, S., Diaferia, M., Piergili Fioretti, D., 2010. Epidemiological survey on equine cryptosporidium and giardia infections in Italy and molecular characterization of isolates. *Zoonoses Public Health* 57, 510-517.

Wagnerová, P., Sak, B., Kvatonová, D., Buatová, Z., Civišová, H., Marálek, M., Kváča, M., 2012. *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* in horses kept under different management systems in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 190, 573-577.

Wagnerová, P., Sak, B., Kvatonová, D., Marálek, M., Langrová, I., Kváča, M., 2013. Humoral immune response and spreading of *Encephalitozoon cuniculi* infection in experimentally

Wagnerová, P., Sak, B., McEvoy, J., Rost, M., Perec Matysiak, A., Jeřková, J., Kváča, M., 2015. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland. *Parasitol. Res.* 114, 1619-1624.

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

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

Xiao, L., Zhou, L., Santin, M., Yang, W., Fayer, R., 2007. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitol. Res.* 100, 701-706.

**Table 1.** List of *Cryptosporidium* and *E. bieneusi* positive specimens detected in the study in feral horses and their species/subtype identity at the SSU, gp60, and ITS loci, respectively.

Location	Breed of horses	Age	# of horses	# of positive		
				<i>Cryptosporidium</i>		<i>E. bieneusi</i>
				SSU	GP60	ITS
Oregon	Mustang	A	34	3× <i>C. parvum</i>	3× IIaA17G2R1	2× horse 1
Virginia	Chincoteague	A	47	17× <i>C. parvum</i> 7× <i>Cryptosporidium</i> sp.	2× IIaA13G2R1 8× IIaA15G2R1	5× horse 1
		J	3	1× <i>Cryptosporidium</i> sp.	-	-

**A** ó adult; **J** ó foal (younger than 6 months)



