

Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích



Kryptosporidiové infekce prasat

Bakalářská práce

Vypracovala: **Iva Fornbaumová**

Vedoucí práce: **Ing. Martin Kváč, Ph.D.**

České Budějovice 2008

Fornbaumová I., 2008: Kryptosporidiové infekce prasat [Cryptosporidial infections of pigs]. 34 p., University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Biological Sciences, Czech Republic.

Annotation:

Recent genetic and biological characterization studies have identified 2 distinct apparently host-adapted genotypes of *Cryptosporidium* in pigs, that is, *Cryptosporidium suis* and the *Cryptosporidium* pig genotype II. The infection of both the above mentioned *Cryptosporidium* appears to occur a much less severe disease in pigs than it does *Cryptosporidium parvum*. Sporadic cases of *C. suis* in human have been reported, but the risk of infection for human is uncertain.

Prohlašuji, že jsem uvedenou bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30. dubna 2008

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli Ing. Martinovi Kváčovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře Lékařské a veterinární parazitologie za vytvoření přátelské atmosféry. Rovněž chci poděkovat za podporu své rodině.

Obsah

1. CÍLE PRÁCE	4
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	4
2.1. Rod <i>Cryptosporidium</i>	4
2.1.2. Systematické zařazení	4
2.1.3. Vývojový cyklus	6
2.1.4. Vzájemný vztah host – parazit.....	7
2.1.5. Epidemiologie.....	8
2.1.5.1. Zdroje infekce	9
2.1.5.2. Terapie.....	10
2.2. Druhy a genotypy kryptosporidií infikujících prasata.....	11
2.2.1. Fylogenetická analýza prasečích kryptosporidií.....	12
2.2.2. Morfologie exogenních stádií kryptosporidií infikujících prasata.....	14
2.2.3. Vývojový cyklus a lokalizace kryptosporidií u prasat	14
2.2.4. Patogenita a klinické příznaky.....	15
2.2.4.1. <i>Cryptosporidium parvum</i>	15
2.2.4.2. <i>Cryptosporidium suis</i>	16
2.2.4.3. <i>Cryptosporidium</i> pig genotype II.....	17
2.2.4.4. <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	17
2.2.4.5. <i>Cryptosporidium hominis</i>	17
2.2.4.6. <i>Cryptosporidium muris</i>	18
2.2.5. Prevalence.....	18
3. NÁVRHY DALŠÍHO VÝZKUMU NA ZÁKLADĚ ANALÝZY DAT	21
4. NAVRHOVANÁ METODIKA.....	22
4.1. Detekce oocyst kryptosporidií.....	22
4.2. Purifikace oocyst	22
4.3. Morfometrická analýza	23
4.4. Molekulární analýza	24
4.5. Histopatologické vyšetření.....	24
4.6. Experimentální infekce	24
5. LITERATURA	26

1. CÍLE PRÁCE

- Kriticky zpracovat literární rešerši k tématu.
- Analyzovat hlavní problémy tématu s návrhem dalších možností výzkumu.
- Rozpracovat podrobnou metodiku budoucí experimentální práce.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1. Rod *Cryptosporidium*

Rod *Cryptosporidium* je kosmopolitně rozšířená parazitická skupina infikující převážně epiteliální buňky gastrointestinálního traktu celé řady obratlovců včetně člověka.

Paraziti se šíří silnostěnnými oocystami, které jako klidová stádia přečkávají nepříznivé vnější podmínky. Oocysty jsou přenášeny fekálně-orální cestou. Infekční stádia, které se z nich uvolní způsobují onemocnění nazývané kryptosporidióza. Kryptosporidióza je zahrnována mezi zoonózy a oportunní infekce. Je to průjemové onemocnění spojené s dehydratací a úbytkem hmotnosti.

Ernest Edward Tyzzer byl první, kdo pozoroval kryptosporidie. V roce 1907 našel v žaludku laboratorní myši (*Mus musculus*) tyto prvoky a pojmenoval je *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). V roce 1912 popsal další nový druh *Cryptosporidium parvum* v tenkém střevě laboratorní myši (Tyzzer 1912).

2.1.2. Systematické zařazení

Kryptosporidie patří do kmene Apicomplexa. Původně byly řazeny do třídy Coccidea, na základě podobnosti vývojového cyklu některých zástupců kokcií (Fayer et al. 1997). Až podle molekulárně fylogenetických studií, založených na analýze sekvencí malé ribozomální podjednotky DNA, se zjistila blízká příbuznost kryptosporidií ke gregarinám (Carreno et al. 1999), jmenovitě k archigregarinám, evolučně dříve vzniklé skupině (Leander et al. 2003).

Původní přiřazení ke třídě Coccidea přisuzovalo kryptosporidiím striktní hostitelskou specifitu. To zapříčinilo popsání více jak 20 druhů kryptosporidií z různých hostitelů. Následné studie mezidruhových infekcí (Levine 1984) a morfologie oocyst tuto domněnku vyvrátily a tím se některé druhy staly neplatnými. Přes 40 nezařazených izolátů kryptosporidií je uváděno pod druhem *Cryptosporidium* sp. daného genotypu, který udává hostitelskou specifitu (Fayer et Xiao 2007). Tyto morfologicky identické genotypy zahrnující izoláty z jelena, fretky, kachny, lišky, husy, koně, vačnatce, opice, králíka, hada a ještěrky budou v budoucnu pravděpodobně popsány jako samostatné druhy (Fayer et Xiao 2007).

Pro klasifikaci kryptosporidií se převážně využívá morfologie oocyst, molekulární metody a hostitelská specifita, dále pak lokalizace vývojového cyklu v hostiteli. Doposud bylo uznáno 17 platných druhů kryptosporidií (tabulka 1.).

Podle lokalizace oocyst v trávicím traktu hostitele rozeznáváme dvě morfologicky odlišné skupiny kryptosporidií: žaludeční kryptosporidie s afinitou k žaludečním žlázám a střevní kryptosporidie s afinitou k enterocytům (Xiao et al. 2004). Střevní kryptosporidie (*C. bovis*, *C. canis*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. scophthalmi*, *C. suis*, *C. wrairi*, *C. meleagridis*, *C. bailey*, *C. varanii*) mají menší a kulaté oocysty oproti žaludečním oocystám (*C. andersoni*, *C. muris*, *C. galli*, *C. serpentis*, *C. molnari*), která jsou větší a oválné.

Tabulka 1. Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*

Druh	Hostitel	Lokalizace	Autor
<i>C. parvum</i>	myši	tenké střevo	Tyzzler 1912
<i>C. muris</i>	hlodavci	žaludek	Tyzzler 1912
<i>C. meleagridis</i>	ptáci	tenké střevo	Slavin 1955
<i>C. wrairi</i>	morčata	tenké střevo	Vetterling et al. 1971
<i>C. felis</i>	kočky	tenké střevo	Iseki 1979
<i>C. serpentis</i>	plazi	žaludek	Levine et al. 1980
<i>C. bailey</i>	drůbež	bursa Fabricii	Current et al. 1986
<i>C. varanii</i>	plazi	žaludek, tenké střevo	Pavlásek 1995
<i>C. andersoni</i>	skot	žláznatý žaludek	Lindsay et al. 2000
<i>C. canis</i>	psi	tenké střevo	Fayer et al. 2001
<i>C. hominis</i>	člověk	tenké střevo	Morgan-Ryan et al. 2002
<i>C. molnari</i>	ryby	žaludek, tenké střevo	Alvarez-Pellitero et Sitja-Bobadilla 2002
<i>C. galli</i>	ptáci	žláznatý žaludek	Ryan et al. 2003
<i>C. scophthalmi</i>	platýs	střevo	Alvarez-Pellitero 2004
<i>C. suis</i>	prasata	tlusté střevo	Ryan et al. 2004
<i>C. bovis</i>	skot	tenké střevo	Fayer et al. 2005
<i>C. fayeri</i>	klokan	střevo	Ryan et al. 2008

2.1.3. Vývojový cyklus

Životní cyklus rodu *Cryptosporidium* je monoxenní, zahrnuje 4 fáze: excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie. Vývojový cyklus *C. hominis* a *C. parvum* je lokalizován v tenkém střevě, u *C. muris*, *C. andersoni* a *C. serpentis* probíhá

v žaludeční sliznici. Výjimku tvoří ptačí druh *C. baileyi*, který může být lokalizován v gastrointestinálním traktu, ale infikuje rovněž respirační trakt, kloaku a bursu Fabricii.

Po spolknutí či inhalaci oocyst vhodným hostitelem dochází za působení rozličných faktorů (teplota, koncentrace oxidu uhličitého, pankreatické enzymy, žlučové sole) k excystaci (Fayer et Leek 1984). Z oocysty se uvolní sporozoiti prostřednictvím sutury umístěné v buněčné stěně oocysty (O'Donoghue 1995). Uvolnění infekční sporozoiti napadají epitelální buňky tenkého střeva či sliznici žaludku, případně respiračního traktu. Sporozoiti uzavření v parazitoformní vakuole se mění v trofozoity. Trofozoiti prodělají asexuální proliferaci (merogonie). Při merogonii dochází k tvorbě dvou typů merontů u druhu *C. parvum* (u *C. baileyi* vznikají tři rozdílné typy merontů) (Current et al. 1986). Meronti I. typu obsahují 6–8 merozoitů, které po uvolnění z parazitoformní vakuoly napadají další epitelální buňky a nepohlavním množením dávají vznik novým merontům I. typu nebo se přemění v morfologicky odlišné meronty II. typu produkující 4 merozoity. Ty se již dále nemnoží merogonií, ale v následné gametogonii se transformují v sexuálně reprodukční stádia: jednojaderné mikrogamonty a vícejaderné makrogamonty. Mikrogamonti se vyvíjí v mikrogametocyty produkující 14–16 nebičíkatých mikrogamet. Zralá mikrogameta pak oplodní makrogametocyt, vzniklý z makrogamonta. Vzniklá zygota prodělá sporogonii, při níž se v oocystě vytvoří 4 sporozoiti. V konečné endogenní fázi vznikají dva typy oocyst - rezistentní silnostěnné a autoinfekční tenkostěnné. Asi 80 % oocyst je silnostěnných. Tyto oocysty odchází s výkaly z těla hostitele a stávají se tak potenciálním zdrojem infekce pro další jedince. V případě respiračních kryptosporidií, oocysty odchází z těla hostitele respiračními nebo nasálními sekrety. Autoinfekční tenkostěnné oocysty excystují v těle hostitele a navozují tak další vývojový cyklus merogonií (Fayer et al. 1997).

2.1.4. Vzájemný vztah host – parazit

Kryptosporidie jako parazitická skupina se výborně přizpůsobila k intracelulárnímu parazitickému způsobu života. *Cryptosporidium* napadá apikální povrch mikroklků ve dvou krocích: adheze a internalizace. Kryptosporidie vyvinuly jedinečný způsob uchycení k hostitelské buňce. Pro přichycení používají apikální orgány (rhoptrie, mikronemy, husté granule) a navíc všechna endogenní stádia

kryptosporidií jsou uzavřena v parazitoformní vakuole. Tento jedinečný útvar odlišuje rod *Cryptosporidium* od ostatních Apicomplex (Valigurová et al. 2008). Mechanismus vzniku této vakuoly není doposud znám. Vnější membrána parazitoformní vakuoly je souvislá plasmatická membrána hostitelské buňky (Vetterling et al. 1971), a proto se míní, že vakuola slouží jako ochrana před imunitním systémem hostitele (Tzipori et Ward 2002). Postupným uzavíráním parazita do vakuoly, se parazit stává epicelulárním (Valigurová et al. 2008) a způsobuje tím změnu struktury mikrokloků.

Kryptosporidie nepronikají přímo do hostitelské buňky ani nepřichází do těsného kontaktu s hostitelskou cytoplazmou (Valigurová et al. 2008). Od té jsou odděleny elektron densní vrstvou hostitelského původu. Během uzavírání parazita do vakuoly se vytvoří primární spojení, kterým parazit přilne k hostitelské buňce (Huang et al. 2004). Předpokládá se, že toto spojení je první krok k vytvoření „feeder organely“, která zajišťuje transmembránový transport živin z hostitele (Thompson 2005).

2.1.5. Epidemiologie

Kryptosporidie jsou zejména patogeny tenkého střeva způsobující ztrátu absorpční schopnosti tkáně, zánětlivou infekci slizničního vaziva a zhoršení transportu živin a elektrolytů. Nejčastějším klinickým symptomem je průjem. Průběh infekce závisí na stavu hostitele (věk, přítomnost mateřských protilátek, stav imunitního systému) a na druhu/genotypu parazita (Tzipori et Ward 2002).

V roce 1976 byly zjištěny první případy kryptosporidiózy u člověka (Nime et al. 1976, Meisel et al. 1976). U lidí byly diagnostikované především dva druhy: *C. parvum* (dříve *C. parvum* genotyp 2) parazitující mimo jiné u krav, ovcí, koz, prasat a myší a *C. hominis* (dříve *C. parvum* typ 1). Dalšími druhy infikujícími děti a imunodeficitní jedince jsou *C. andersoni*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. suis* a 4 genotypy (jelení, tchoří, CZB 141 genotyp, a *Cryptosporidium* pig genotype II). Pacient může být infikován i více druhy kryptosporidií (Cama et al. 2006).

U imunokompetentních jedinců nejsou mnohdy klinické příznaky patrné nebo nejčastěji jedinec trpí akutním průjmem s inkubační dobou 3–14 dnů, poté dochází k samovyléčení (Warren et al. 2007). Dalšími příznaky mohou být kolikové bolesti břicha, malátnost, nechutenství, zvracení, horečka, únava (Thompson 2005). Vyskytly

se ojedinělé případy, kde průjem přetrvával až 1 měsíc, výjimečně 4 měsíce (Isaacs 1985, Wolfson et al. 1985, Jokipii et Jokipii 1986, Soave et Armstrong 1986, Stehr-Green et al. 1987). Střevní kryptosporidie, zejména druh *C. parvum*, způsobují u imunokompetentních jedinců poruchy trávení, růstu a vývoje především u mláďat. Naopak infekce některých střevních kryptosporidií jako je *C. suis* probíhají asymptomaticky (kapitola 2.2.4.2.). Infekce žaludečních kryptosporidií většinou probíhají bez klinických příznaků.

Pro imunodeficitní jedince, jako jsou podvyživené osoby, děti (< 2 let), HIV pozitivní pacienti, příjemci transplantace či jedinci podstupující chemoterapii, představují kryptosporidiové infekce závažné zdravotní riziko. Střevní i žaludeční kryptosporidie způsobují vážný průběh infekce v závislosti na stupni imunodeficientu jedince (Flanigan et al. 1992). Onemocnění probíhá chronicky po několik měsíců až roků, často diseminuje do přilehlých orgánů zažívacího traktu (pankreas, játra, žlučník) a respiračního traktu (Current et Garcia 1991). Bez hospitalizace, následkem dehydratace a podvýživy může mít onemocnění až fatální průběh, zvláště u HIV pozitivních pacientů (Navin et Hardy 1987, Blanshard et al. 1992).

2.1.5.1. Zdroje infekce

Primárním zdrojem nákazy u lidí je kontaminovaná pitná a rekreační voda. K nakažení dochází pozřením vody nebo potravy kontaminované oocystami či přímým kontaktem s nakaženou osobou nebo zvířetem. Fekální znečištění půdy a povrchové vody může nakonec vést ke kontaminaci pitné vody a potravy (Fayer 2000). Díky vysoké životaschopnosti a odolnosti oocyst k vlivům vnějšího prostředí jsou schopné přežít ve vodě až 140 dní (Ramirez et al. 2004). Oocysty nepodléhají ani klasickým desinfekčním postupům založeným na chloraci (Dolejš 2004). Největší epidemie, která byla způsobena kontaminovanou pitnou vodou, proběhla v roce 1993 v Milwaukee, Wisconsin (MacKenzie et al. 1995). Tato událost měla přímou souvislost se zpřísněním legislativy upravující kvalitu pitné vody v USA (Dolejš 2004). V České republice nebyla dosud hlášena žádná epidemie z pitné vody způsobená těmito parazity, ale není vyloučen jejich podíl na některých z epidemií, u nichž se původce nepodařilo prokázat (<http://www.szu.cz/chzp/voda/pdf/mdcrypto.pdf>).

Zdrojem kontaminace potravy je hnojení trusem zvířat nebo stolicí lidí a zavlažování kontaminovanou vodou. Oocysty kryptosporidií byly nalezeny i na žábrách mořských měkkýšů. Ty jsou často konzumováni syroví. Ojedinelé nákazy z kontaminované potravy byly zaznamenány ze špatně pasterizovaného mléka, z moštu, ze syrové zeleniny a ovoce (Fayer 2000).

2.1.5.2. Terapie

K terapii se využívá podpůrná a symptomatická léčba ke zmírnění následků infekce. U imunokompetentních jedinců se aplikují rehydratační roztoky k zamezení dehydratace. Ke zmírnění průjmu lze využít kaolin, pektin či loperamid. U AIDS pacientů se využívá antiretrovirová terapie pro zpomalení progresu imunodeficitu a doprovodné zvyšování počtu CD4+ lymfocytů. Tato podpůrná léčba redukuje počet vylučovaných oocyst a zlepšuje gastrointestinální klinické příznaky (Thompson 2005). Dále to jsou chemoterapeutické léky, které pomáhají omezovat tvorbu oocyst. Mezi ně patří například aminoglykosid paramomycin. Jeho účinnost je však nepatrná. Jen velmi malé množství paramomycinu projde přes apikální membránu obklopující parazita. Azithromycin inhibuje syntézu proteinů, byl používán v kombinaci s paramomycinem u lidí. Dalším lékem je nitazoxanid, který účinně zmírňuje průjem a eliminuje výskyt oocyst (Thompson 2005). Tento výčet léků není úplný. Byla zkoušena celá řada látek, nicméně bez uspokojivého výsledku. Další alternativní léčbou je imunoterapie. Podávání hyperimunitního bovinního kolostra obsahujícího protilátky proti *C. parvum* (Ramirez et al. 2004), snížilo exkreci oocyst u jehňat a telat. Bohužel tento druh léčby není vhodný pro lidi, u kterých vyvolává zvracení a křeče. Zřejmě to je dáno rozdílem imunitních protilátek a střevní fyziologií jedinců (Thompson 2005). Probiotické bakterie jsou další možností podpůrné léčby. Navozují proliferaci enterocytů (Thompson 2005) a snižují dobu a počet vylučovaných oocyst (Ramirez et al. 2004). Mezi tyto probiotické bakterie patří například *Lactobacillus reuteri*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium breve* a *B. longum*.

2.2. Druhy a genotypy kryptosporidií infikující prasata

Druh *C. parvum* byl vzhledem ke své nízké hostitelské specifitě a značné vnímavosti selat k experimentálním infekcím tímto druhem dlouhou dobu považován za jediného původce způsobujícího kryptosporidiózu prasat. Avšak z následných epidemiologických a epizootologických studií bylo zjištěno, že kryptosporidiové infekce prasat jsou odlišné od infekcí jiných hospodářských zvířat a lidí (Morgan et al. 1999). Molekulární analýzou prasečích izolátů kryptosporidií pocházejících z Austrálie a Švýcarska byla prokázána přítomnost dvou odlišných kryptosporidií, a to *C. parvum* a nového prasečího genotypu, který byl pojmenován *Cryptosporidium* pig genotype I (Morgan et al. 1999). V roce 2003 byl pomocí molekulárních metod identifikován další genotyp kryptosporidií, *Cryptosporidium* pig genotype II (Ryan et al. 2003). Na základě biologických studií byla zjištěna vysoká hostitelská specifita prasečích genotypů (genotype I a II) s adaptací na prasata (Morgan et al. 1999, Ryan et al. 2003). *Cryptosporidium* pig genotype I byl později na základě genotypizace a biologické charakterizace popsán jako samostatný druh a pojmenován *Cryptosporidium suis* (Ryan et al. 2004).

Kromě druhů a genotyp kryptosporidií přirozeně se vyskytujících u prasat, byla experimentálně prokázána vnímavost prasat k infekci *C. hominis* (Pereira et al. 2002) a *C. meleagridis* (Akiyoshi et al. 2003).

Vývojový cyklus všech výše uvedených druhů a genotyp kryptosporidií je lokalizován ve střevním epitelu hostitele. Za pozornost stojí nález žaludeční kryptosporidie *C. muris* v prasečí kejďě na farmě v Irsku (Xiao et al. 2006) a v trusu dvou porážkových prasat na jatkách v České republice (Kváč osobní sdělení). Vzhledem k tomu, že v prvním případě se jednalo o nález z netříděného materiálu, který mohl být kontaminován trusem hlodavců, kteří jsou přirozenými hostiteli *C. muris*. Taktéž v druhém případě nelze jednoznačně určit, zda se jednalo o přirozenou infekci nebo o pouhou pasáž oocyst zaživacím traktem prasat, která pozřela infikované hlodavce.

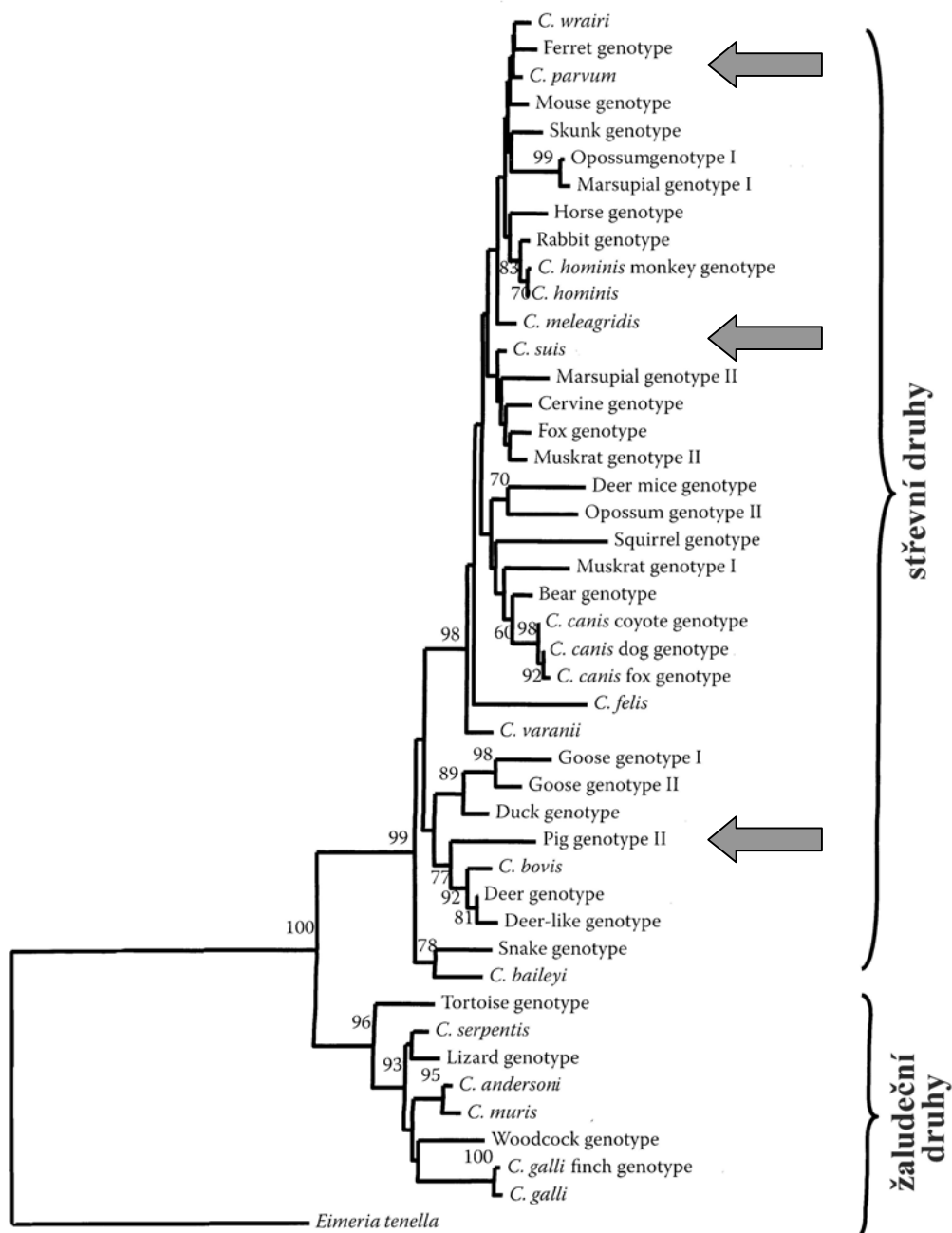
2.2.1. Fylogenetická analýza prasečích kryptosporidií

Morfologie a morfometrie oocyst je jeden z hlavních aspektů používaných pro stanovení nového druhu. Nicméně určení druhů a genotypů *Cryptosporidium* sp. pouze pomocí morfologie oocyst je nemožné, proto je potřeba dalších metod pro identifikaci nových druhů a genotypů. V taxonomii kryptosporidií (kapitola 2.1.2.) se nejčastěji používají molekulární analýzy genu pro malou ribosomální podjednotku (18S rDNA), pro Heat Shock Protein (HSP 70) a pro aktin.

Analýzou sekvencí nukleotidů genu 18S rDNA z izolátů *C. suis* byla prokázána genetická odlišnost od druhu *C. parvum*, přičemž genetická shoda v tomto lokusu mezi *C. suis* a *C. parvum* je 97 %, to je mnohem méně než je shoda mezi *C. meleagridis*, *C. parvum* a *C. hominis* (98,6 %) nebo mezi *C. parvum* a *C. hominis* (99,42 %). Podobné evoluční vztahy byly prokázány i analýzou genu pro HSP 70 a genu pro aktin. Přestože v závislosti na typu použité analýzy (neighbor-joining Tamura-Nei distance calculated, maximum-likelihood a parsimony) se měnila fylogenetická pozice *C. suis* bylo prokázáno, že *C. suis* je samostatným druhem (Ryan et al. 2004). Navíc analýzou genu HSP 70 z prasečích izolátů se prokázaly různé podskupiny v rámci druhu *C. suis*.

Z fylogenetického hlediska se *Cryptosporidium* pig genotype II nepokládá za geneticky blízce příbuzného k *C. suis*, s kterým sdílí pouhých 93 % sekvence nukleotidů genu 18S rDNA. Dokonce jeho shodnost s *C. parvum* je ještě menší než u *C. suis*. Shodnost sekvencí genů 18S rDNA mezi *Cryptosporidium* pig genotype II a *C. parvum*, *C. hominis* a *C. meleagridis* byla pouze 92,2–92,8 %. (Ryan et al. 2003). Takto velká divergence od druhu *C. parvum* by v budoucnu mohla přispět k ustanovení *Cryptosporidium* pig genotype II novým druhem. Evoluční vztahy kryptosporidií jsou ukázány na fylogenetickém stromu (obrázek 1), ve kterém byly zvýrazněny prasečí kryptosporidie.

Obrázek 1: Genetické vztahy mezi druhy a genotypy kryptosporidií (analýza neighbor-joining, částečná sekvence SSU rRNA, bootstrey (%) v 1000 opakování). Převzato z knihy „*Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis“ (Fayer et Xiao 2007) kapitola „Molecular Epidemiology“ (Xiao et Ryan 2007).



2.2.2. Morfologie exogenních stádií kryptosporidií infikujících prasata

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.2., oocysty žaludečních a střevních kryptosporidií se liší v rámci morfologie i morfometrie. Avšak i v rámci skupiny lze nalézt odlišnosti v morfometrii oocyst.

Oocysty *C. suis*, které popsali Ryan et al. (2004), měřily 4,9×4,4 μm. Velmi podobná velikost byla naměřena u druhu *C. parvum* s velikostí oocyst 5,0×4,5 μm (Upton et Current 1985). Vítovec et al. (2006) popsali jinou velikost oocyst *C. suis* z přirozené infekce prasat, která se prokazatelně odlišovala od *C. parvum* i od originálního popisu *C. suis*. Jejich velikost byla 6,2 × 5,5 μm. Tento výrazný rozdíl ve velikosti oocyst naznačuje morfologickou nejednotnost *C. suis*. Podobná variabilita velikostí oocyst byla popsána i u druhu *C. andersoni* (Lindsay et al. 2000, Kváč et Vítovec 2003). Morfometrie oocyst *Cryptosporidium* pig genotype II zatím nebyla popsána.

2.2.3. Vývojový cyklus a lokalizace kryptosporidií u prasat

Nejlépe probádaný vývojový cyklus je u druhu *C. parvum* (kapitola 2.1.3.). U ostatních kryptosporidií se předpokládá, že vývojový cyklus probíhá velmi podobně s výjimkou *C. bailey* (kapitola 2.1.3.).

Endogenní stádia *C. suis* se nachází v epiteliálních buňkách tlustého střeva, později často dochází k diseminaci do dalších částí zažívacího traktu. Zajímavou lokalizaci této kryptosporidie popsali Vítovec et al. (2006) ve své studii patogenity *C. suis*, kde oocysty *C. suis* měly specifickou lokalizaci v žlázách lymfoglandulárního komplexu v submukóze colonu a recta, což nebylo pozorováno u žádných jiných střevních kryptosporidií. Podobnou lokalizaci oocyst můžeme najít u žaludečních kryptosporidií (*C. muris*, *C. andersoni*, jejichž vývojový cyklus probíhá v žaludečních žlázách).

Experimentálními infekcemi byla prokázána vnímavost prasat ke střevním kryptosporidiím *C. meleagridis*, *C. hominis*. *Cryptosporidium meleagridis*, které parazitují především ve slepém střevě krů'at, u prasat se vyskytovaly v tenkém střevě. Vývojový cyklus *C. hominis* je lokalizován v celém tenkém střevě (duodenum, jejunum,

ileum). U experimentální infekce prasat se endogenní stádia *C. hominis* nacházela v ileu a v tlustém střevě (Pereira et al. 2002).

Cryptosporidium parvum, které u telat infikuje převážně celé tenké střevo, mělo navíc u prasat tendenci diseminovat do tlustého střeva (Pereira et al. 2002).

Kromě zažívacího traktu postihují kryptosporidie u prasat i přilehlé orgány. Například spontánní infekce v žlučníku, která byla způsobena druhem *C. parvum* (Fleta et al. 1995). Experimentálně se druhem *C. parvum* podařilo nainfikovat žlučovod a pankreat imunodeficitních prasat (Healey et al. 1997) a dále respirační trakt a spojivku oka zdravých prasat (Heine et al. 1984).

2.2.4. Patogenita a klinické příznaky

2.2.4.1. *Cryptosporidium parvum*

Nejčastěji jsou popisovány kryptosporidiové infekce způsobené druhem *C. parvum*, který pravděpodobně parazituje u všech druhů savců. U neonatálních zvířat byla pozorována větší vnímavost k infekci *C. parvum*, především u telat, kde je tato kryptosporidie běžným enteropatogenem během prvních týdnů života. Klinické příznaky v podobě vodnatého průjmu, deprese, podvýživy, ztrátě hmotnosti a abdominální bolesti mohou přetrvávat po dobu 4–14 dnů. Průběh kryptosporidiózy u telat je charakterizován různým stupněm morbiditu, ale všeobecně nízkou mortalitou. Patologické změny zažívacího traktu jsou charakterizovány atrofií mikroklků, lokálním odumřením a ztrátou epitelálních buněk, buněčnou infiltrací do *lamina propria* a občasným zánětem střevního epitelu (Thompson et al. 2005).

Přestože bylo popsáno velké množství prací o patogenitě *C. parvum*, přirozené infekce prasat byly popsány jen v ojedinělých případech (Morgan et al. 1999, Zintl et al. 2007, Kváč nepublikovaná data), i když vnímavost prasat k *C. parvum* byla experimentálně potvrzena (Tzipori et al. 1981, Vítovec et al. 1992).

Klinické příznaky kryptosporidiózy způsobené *C. parvum* u prasat byly obdobné jako u kryptosporidiózy telat. U konvenčně chovaných prasat experimentálně infikovaných dávkou 5×10^6 oocyst *C. parvum* byl pozorován v průběhu prvních 4 dnů po infekci průjem s následným samovyléčením (Vítovec et Koudela 1992). Naopak při

dávce $2,5 \times 10^5$ oocyst nebyly pozorovány žádné klinické příznaky. U gnotobioticky chovaných prasat byl klinický průběh infekce vážnější s výraznou dehydratací organismu (Vítovec et Koudela 1992).

Byly zaznamenány podobné patologické změny jako u telat, které se nelišily ani mezi konvenčně či gnotobioticky chovanými prasaty. Histopatologické změny byly charakterizované atrofií mikrokloků s vymizením kartáčového lemu, hyperplazií krypt a zánětlivou odezvou v *lamina propria*. V počáteční fázi infekce bylo pozorováno poškození pouze tenkého střeva s následným rozšířením do tlustého střeva (Moon et al. 1982, Tzipori et al. 1982, Vítovec et Koudela 1992). V kapitole 2.2.4.4. je uvedeno podrobnější srovnání infekce *C. parvum* a *C. hominis* u prasat za stejných experimentálních podmínek.

2.2.4.2. *Cryptosporidium suis*

Cryptosporidium suis se často vyskytuje u sajících selat. Ve většině případů spontánních a experimentálních infekcí prasat probíhala kryptosporidióza asymptomaticky (Guselle et al. 2003, Vítovec et al. 2006), kromě ojedinělých výskytů průjmu a zvracení u experimentálně infikovaných selat od 1. do 2. DPI (day post infection) (Enemark et al. 2003). V žádném z případů nebyly zjištěny podstatné makroskopické změny vnitřních orgánů (Enemark et al. 2003, Vítovec et al. 2006). Infekce se vyskytovala pouze v tlustém střevě s predispozicí k *ansa centralis*, kde poměr infikovaných a neinfikovaných žláz byl přibližně 1:5, zatím co v jiných partiích tlustého střeva byl tento poměr 1:10 až 1:20. Infikované žlázy byly mírně diletované a nebyla zjištěna zánětlivá odezva v *lamina propria* (Vítovec et al. 2006).

Jediný netypický hostitel, který je vnímavý k experimentální infekce *C. suis*, je tele (Enemark et al. 2003). Obdobně jako u přirozeného hostitele se infekce *C. suis* u telat neprojevovala klinickými příznaky, ani nebyly zjištěny žádné makroskopické změny vnitřních orgánů. Typický výskyt oocyst *C. suis* v tlustém střevě byl zaznamenán i u telat s rozšířením do konečníku. Oportunní charakter *C. suis* byl prokázán při koinfekci s rotaviry, kdy bylo onemocnění provázeno polotekutým až vodnatým průjmem s nadměrným množstvím slizu v období od 4. do 19. DPI. Na rozdíl od monoinfekce (výše) bylo pozorováno mírné zvětšení mezenterických lymfatických

uzlin a zánět sliznice vymezený v zadní části jejunu a ilea (bez nálezu kryptosporidií) (Enemark et al. 2003). Obdobné výsledky patogenity kryptosporidií prasat („*C. parvum*“ bez genotypizace) při koinfekci s prasečím cirkovirem typu 2 popsali Núñez et al. (2003).

2.2.4.3. *Cryptosporidium* pig genotype II

O patogenitě spontánní kryptosporidiózy prasat vyvolané *Cryptosporidium* pig genotype II je zatím velmi málo známo. Vzhledem k informacím vyplývajícím z epizootologických studií, lze předpokládat, že tento genotyp kryptosporidií je pro prasata málo patogenní (Suárez-Luengas et al. 2007).

2.2.4.4. *Cryptosporidium meleagridis*

Typickým hostitelem tohoto druhu kryptosporidie jsou ptáci, zejména drůbež (Ryan a Xiao 2007). Patologické změny na sliznici infikovaných částí zažívacího traktu jsou charakterizovány zkrácením mikroviální vrstvy a nepravidelností epiteliálního povrchu (Akiyoshi et al. 2003). Infekce *C. meleagridis* u ptáků se projevuje průjmem bez významného vlivu na ztrátu hmotnosti nebo na mortalitu (Tůmová et al. 2002).

Na rozdíl od ptáků byl vývojový cyklus tohoto druhu kryptosporidie u experimentálně infikovaných selat nalezen pouze v tenkém střevě. Změny infikované sliznice jsou méně patrné než u infekce způsobené *C. parvum* a odpovídají patologickým změnám pozorovaným při experimentálních infekcích druhem *C. hominis* (Pereira et al. 2002, Akiyos jsou klinické příznaky infekce *C. meleagridis* u prasat omezeny pouze na mírné průjmové onemocnění bez známek dehydratace (Akiyoshi et al. 2003).

2.2.4.5. *Cryptosporidium hominis*

Cryptosporidium hominis je druh specializovaný na člověka, který ale také byl nalezen u dugonga (Morgan et al. 2000) a experimentálně přenesena na gnotobiotická prasata (Pereira 2002) a jehňata (Giles 2001). Infekce tohoto druhu kryptosporidie pro člověka je popsána v kapitole 2.1.5.

Experimentální infekce *C. hominis* u prasat měla ve srovnání s lidskou kryptosporidiózou mírnější průběh. Nízká infekční dávka oocyst (1–10 oocyst) u gnotobiotických prasat vyvolala pouze minimální patologické změny. Jednoznačně více endogenních stádií na povrchu mikrokloků bylo pozorováno u prasat infikovaných druhem *C. hominis* než u infekce *C. parvum*. *Cryptosporidium parvum* způsobuje časté změny mikrokloků na rozdíl od infekce *C. hominis*, kde byla jen ojediněle zaznamenána atrofie mikrokloků. Mírná lymfatická hyperplazie a sporadický zánět byly pozorovány v ileu a v tlustém střevě pouze během patentní periody (16 dní) naopak u *C. parvum* byly tyto příznaky patrné od 1. do 2. DPI v duodenu, jejunu, ilea a od 7. do 10. DPI v tlustém střevě (Pereira et al. 2002).

2.2.4.6. *Cryptosporidium muris*

Cryptosporidium muris má široké hostitelské spektrum zahrnující myši a jiné hlodavce, některé přežvýkavce, primáty, psi, kočky a králíky (Iseki et al. 1989, Xiao et al. 2004). Žaludeční kryptosporidióza probíhá ve většině případů jako asymptomatické onemocnění (Iseki et al. 1989, Kváč et Vítovec 2003) bez makroskopických změn vnitřních orgánů. Patologické změny jsou charakterizovány hypertrofií, atrofií a metaplasii žláznatého epitelu s rozšířením infikovaných žláz, zatím co zánětlivá odezva ve sliznici není patrná (Anderson 1987, Özkul et Aydin 1994, Aydin et Özkul 1996, Kváč a Vítovec 2003, Kváč et al. 2008).

I když byly popsány nálezy *C. muris* u prasat (viz výše), není o patologii ani o klinických symptomech nic známo. Lze však předpokládat, že stejně tak jako u přirozených hostitelů bude i u prasat nízká patogenita a absence klinických příznaků.

2.2.5. Prevalence

Kryptosporidiové infekce prasat jsou celosvětově rozšířené. První zmínky o kryptosporidióze u prasat pochází z roku 1977 z jižní Dakoty a Kansasu (Bergeland 1977, Kennedy et al. 1977).

Kryptosporidie byly popsány u všech věkových kategorií prasat s různou mírou prevalence. Velmi často je popisován výskyt kryptosporidií u prasat krátce před odstavením a po odstavení s věkovým rozmezím 1,5–3 měsíce (Sanford 1987, Guselle et al.

2003, Maddox-Hyttel et al. 2006, Vítovec et al. 2006). Infekce se méně často vyskytuje u starších jedinců. Malá prevalence (5–12 %) byla zaznamenána u prasat ve věku 5,5–6 měsíců (Tacal et al. 1987, Suárez-Luengas et al. 2007) a další studie uvádějí nízkou prevalenci u prasat starších 9 měsíců (Xiao et al. 1994, Atwill et al. 1997, Maddox-Hyttel et al. 2006). Některé studie uvádějí úplnou absenci kryptosporidiózy v této věkové kategorii (Quílez et al. 1996, Vítovec et al. 2006). Naopak 34% prevalenci u 2–6 měsíčních prasat publikovali Quílez et al. (1996) a obdobnou prevalenci (30 %) u podobné věkové kategorie popsali Kváč et al. (nepublikovaná data).

Bylo prokázáno, že distribuce jednotlivých druhů/genotyp kryptosporidií u prasat byla ovlivněna věkem jedince. Převažující kryptosporidií u prasat před odstavením je *C. suis*, kdežto u odstavených prasat je častěji popisován výskyt *Cryptosporidium* pig genotype II. Přirozený výskyt *C. parvum* u prasat je popisován vzácně (Morgan et al. 1999, Zintl et al. 2007). Byly nalezeny ojedinělé případy *C. parvum* u prasnic (Zintl et al. 2007, Kváč nepublikovaná data), i když *C. parvum* je všeobecně znám jako kryptosporidie juvenilních jedinců.

Vzhledem k faktu, že většina prací zabývajících se kryptosporidiiemi prasat byla publikována před popisem *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II a data nejsou podpořena molekulární analýzou, nelze přiřkládat těmto výsledkům větší význam z hlediska distribuce jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií v závislosti na věku prasat (tabulka 2.).

Tabulka 2. Výskyt jednotlivých druhů/genotypu kryptosporidií u prasat

Země	Počet zvířat	Věk	Prevalence (%)	Procentuální podíl druhů/genotypu z genotypizovaných vzorků		
				<i>C. suis</i>	<i>Cryptosporidium</i> pig genotype II	<i>C. parvum</i>
Austrálie ¹	646	<9 t	6,03	50	50	0
Česká republika ²	3368	<5 t	5,7	100	0	0
	835	>6 t	24,1	100	0	0
	135	prasnice	0	0	0	0
Dánsko ³	488	< 1 m	6	69	31	0
	504	1–4 m	71	24	76	0
	245	prasnice	4	0	0	0
Německo ⁴	287	1–4 d	1,4	negenotypizováno		
Norsko ⁵	684	4–33 d	8,3	67	33	0
Španělsko ⁶	49	< 1 m	0	negenotypizováno		
	49	1–2 m	59,2			
	312	2–6 m	34,3			
	210	dospělci	0			
Španělsko ⁷	75	1–2 m	30,7	40	60	0
	42	2–6 m	11,9	0	100	0
	25	prasnice	16	100	0	0

¹Ryan et al. 2003, ²Vítovec et al. 2006, ³Langkjaer et al. 2007, ⁴Wieler et al. 2001,

⁵Hammes et al. 2007, ⁶Quílez et al. 1996, ⁷Suárez-Luengas 2007.

3. NÁVRHY DALŠÍHO VÝZKUMU NA ZÁKLADĚ ANALÝZY DAT

1. Popsat tvar a velikost oocyst *Cryptosporidium* pig genotype II (kapitola 2.2.2.).
2. Podrobně prostudovat morfometrickou vnitrodruhovou variabilitu oocyst druhu *C. suis* (kapitola 2.2.2.).
3. Provést detailní studie podpořené výsledky genotypizace s cílem objasnit věkovou specifitu jednotlivých druhů a genotyp kryptosporidií infikující prasata (2.2.5.).
4. Determinovat lokalizaci vývojového cyklu a popsat patogenitu *Cryptosporidium* pig genotype II (kapitola 2.2.3.).
5. Nalézt vhodný modelový organismus pro snadnou práci v laboratoři (2.2.4.2.).
6. Objasnit hostitelskou vnímavost prasat k infekci druhem *C. muris* (2.2.4.6.).

4. NAVRHOVANÁ METODIKA

4.1. Detekce oocyst kryptosporidií

Vzhledem k tomu, že většina prací je prováděna na omezeném počtu vzorků je nutné povést větší množství pozorování, kde by byly zastoupeny všechny věkové kategorie. Vyšetření preparátů na přítomnost oocyst kryptosporidií bude prováděno barvením dle Miláček et Vítovec (1985) anilin - karbol - methyl – violetí. Nabarvené oocysty budou následně pozorovány pod světelným mikroskopem při zvětšení 1000× s použitím imerzního oleje.

Barvení dle Miláček et Vítovec (1985)

Barvicí roztoky:

- roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml etanolu, 70 ml deionizované vody)
- roztok tartrazinu (1% tartrazin v 1% kyselině octové)

Postup:

1. tenký nátěr trusu na podložním sklíčku fixovat methanolem v plameni
2. barvit roztokem methylvioleti 30 minut
3. opláchnout vodou a diferencovat 2% kyselinou sírovou přibližně 30 sekund
4. opláchnout vodou a dobarvit roztokem tartrazinu přibližně 1 minutu

4.2. Purifikace oocyst

Pozitivní nálezy oocyst *Cryptosporidium* pig genotype II budou připraveny pro morfometrickou analýzu tak, že budou vyčištěny na sacharózovém gradientu (Arrowood et Sterling 1987)

Sacharózový gradient (Arrowood et Sterling 1987)

Použité roztoky :

- Sheaterův cukerný roztok (259 ml deionizovaná voda; 405 g cukr; 7,29 g fenol)
- 1% PBS TWEEN (do 1 l PBS přidat 0,5 ml TWEEN 20)
- Pracovní sheaterovy roztoky:

roztok A: 1+2 (1 díl Shaeterova roztoku + 2 díly PBS TWEEN)

roztok B: 1+4 (1 díl Shaeterova roztoku + 4 díly PBS TWEEN)

Postup:

1. vzorek trusu přecedit přes sítko
2. navrstvit sacharózové gradienty 30 ml roztoku A, 30 ml roztoku B a 15 ml suspenze oocyst v destilované vodě
3. centrifugovat 30 minut při 1370 g
4. vodní vývěvou odsát horní vrstvu a supernatant přenést do čisté zkumavky
5. doplnit objem deionizovanou vodou
6. centrifugovat 20 minut při 1370 g
7. odsát vodní vývěvou polovinu objemu, doplnit deionizovanou vodou
8. body 6 a 7 opakovat 2×
9. pelet s oocystami přenést do čisté zkumavky a uchovávat ve tmě při 4 °C

4.3. Morfometrická analýza

Bude provedena morfometrická analýza oocyst pomocí digitální analýzy obrazu (M.I.C. Quick Photo Pro v.2.0 software; Olympus Camedia C 5060 WIDEZOOM, 5.1 pixels digitální kamera; mikroskop Olympus IX70). Bude změřena délka a šířka oocyst každého izolátu a bude vypočítán index tvaru (n=100).

4.4. Molekulární analýza

Celková DNA bude extrahována přímo z trusu pomocí komerčního kitu Qiamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) a analyzována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Izolace DNA

K 180 – 200 mg trusu bude do mikrozkušavky (2 ml) přidáno 200 µl ASL a 150 mg skleněných kuliček (Ø 0,5 mm). Poté bude provedeno rozbíjení oocyst po dobu 2 minut při rychlosti 5000 kmitů/min. Dále bude postupováno podle návodu, který je součástí kitu. Získaná DNA bude uchována při teplotě -20°C.

PCR

Přibližně 830-bp dlouhý fragment genu pro 18S rRNA bude amplifikován pomocí nested PCR protokolu podle Jiang et al. (2005). Sekundární PCR produkty budou sekvenovány pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) a ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sekvence budou upraveny v programu ClustalX a srovnány s referenčními sekvencemi uložené v GenBank.

4.5. Histopatologické vyšetření

Prase s pozitivním nálezem *Cryptosporidium* pig genotype II nebo *C. muris* bude zakoupeno a usmrceno nadměrnou dávkou barbiturátu. Při pitvě bude provedeno kompletní vyšetření vnitřních orgánů a tkání. Vzorky pro histologické vyšetření budou odebrány ze všech částí tenkého střeva a tlustého střeva dle metodiky Vítovec et al. (2006). Odebraný materiál bude fixován v 10% formolu a zpracován parafinovou metodou. Histologické řezy budou barveny hematoxylinem-eosinem, modifikovaným barvením podle Wolbacha.

4.6. Experimentální infekce

Infektivita vyizolovaných oocyst *Cryptosporidium* pig genotype II bude testována na různých druzích hlodavců. Každé zvíře bude nainfikováno per-orální jícní sondou (1×10^4

oocyst v 200–400 µl deionizované vody). Vzoroky trusu budou denně (od 4. DPI do 30. DPI) vyšetřovány na přítomnost oocyst metodou Miláček et Vítovec (1985) (kapitola 4.1.).

Pro objasnění infekivity *C. muris* pro prasata budou infikována odstavená selata pocházející z chovů prostých kryptosporidiových infekcí (např. nukleové chovy) izolátem *C. muris*. Bude pozorována dynamika infekce a poté bude prase usmrceno a histopatologicky vyšetřeno (viz 4.5.).

5. LITERATURA

- AKIYOSHI D. E., DILO J., PEARSON C., CHAPMAN S., TUMWINE J., TZIPORI S., 2003: Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. *Infect. Immun.* 71: 1828-1832.
- ALVAREZ-PELLITERO P., QUIROGA M. I., SITJÀ-BOBADILLA A., REDONDO M. J., PALENZUELA O., PADRÓS F., VÁZQUEZ S., NIETO J. M., 2004: *Cryptosporidium scopthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. Aquat. Organ.* 62: 133-145.
- ALVAREZ-PELLITERO P., SITJÀ-BOBADILLA A., 2002: *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int. J. Parasitol.* 32: 1007-1021.
- ANDERSON B. C., 1987: Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.* 24: 235-238.
- ARROWOOD M. J., STERLING C. R., 1987: Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.* 73: 314-319.
- ATWILL E. R., SWEITZER R. A., PEREIRA M. G., GARDNER I. A., VAN VUREN D., BOYCE W. M., 1997: Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3946-3949.
- AYDIN Y., OZKUL I. A., 1996: Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Vet. Parasitol.* 66: 257-262.
- BERGELAND M. E., 1977: Necrotic enteritis in nursing piglets. *Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnostic.* 20: 151-158.
- BLANSHARD C., JACKSON A. M., SHANSON D. C., FRANCIS N., GAZZARD B. G., 1992: Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. *Q. J. Med.* 85: 813-823.
- CAMA V., GILMAN R. H., VIVAR A., TICONA E., ORTEGA Y., BERN C., XIAO L. 2006: Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1025-1028.

- CARRENO R. A., MARTIN D. S., BARTA J. R., 1999: *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85: 899-904.
- CURRENT W. L., GARCIA L. S., 1991: Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 325-358.
- 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.
- DOLEJŠ P., 2004: *Cryptosporidium* a *Giardia* – přehled vodárenské problematiky za první desetiletí po událostech Milwaukee (USA). *Vodní hospodářství.* 54: 271-273.
- ENEMARK H. L., AHRENS P., BILLE-HANSEN V., HEEGAARD P. M., VIGRE H., THAMSBORG S. M., LIND P., 2003: *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the 'porcine' genotype. *Parasitology* 126: 407-416.
- FAYER R., 2007: General biology. In FAYER R., XIAO L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Second edition, CRC Press, FL, pp. 1-42.
- FAYER R., LEEK R. G., 1984: The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. *J. Protozool.* 31: 567-569.
- FAYER R., MORGAN U. M., UPTON S. J., 2000: Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30: 1305-1322.
- FAYER R., SANTÍN M., XIAO L., 2005: *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91: 624-629.
- FAYER R., SPEER C. A., DUBEY J. P., 1997: The general biology of *Cryptosporidium*. In FAYER R. (Ed.). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press. pp. 2-33.
- FAYER R., TROUT J. M., XIAO L., MORGAN U. M., LAI A. A., DUBEY J. P., 2001: *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87: 1415-1422.
- FLANIGAN T., WHALEN C., TURNER J., SOAVE R., TOERNER J., HAVLIR D., KOTLER D., 1992: *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Ann. Intern. Med.* 116: 840-842.

- FLETA J., SÁNCHEZ-ACEDO C., CLAVEL A., QUÍLEZ J., 1995: Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs. *Vet. Parasitol.* 59: 1-5.
- GILES M., WEBSTER K. A., MARSHALL J. A., CATCHPOLE J., GODDARD T. M., 2001: Experimental infection of a lamb with *Cryptosporidium parvum* genotype 1. *Vet. Rec.* 149: 523-525.
- GUSELLE N. J., APPELBEE A. J., OLSON M. E., 2003: Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet. Parasitol.* 113: 7-18.
- HAMNES I. S., GJERDE B. K., FORBERG T., ROBERTSON L. J., 2007: Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Vet. Parasitol.* 144: 222-233.
- HEALEY M. C., YANG S., DU C., LIAO S. F., 1997: Bovine fallopian tube epithelial cells, adult C57BL/6 mice, and non-neonatal pigs as models for cryptosporidiosis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44: 64S-65S.
- HEINE J., MOON H. W., WOODMANSEE D. B., POHLENZ J. F., 1984: Experimental tracheal and conjunctival infections with *Cryptosporidium* sp. in pigs. *Vet. Parasitol.* 17: 17-25.
- HUANG B. Q., CHEN X. M., LARUSSO N. F., 2004: *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro: a morphologic study. *J. Parasitol.* 90: 212-221.
- ISAACS D., 1985: *Cryptosporidium* and diarrhoea. *Arch. Dis. Child.* 60: 608-609.
- ISEKI M., 1979: *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jap. J. Parasitol.* 28: 285-307.
- 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: 218-22.
- 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.
- JOKIPII L., JOKIPII A. M., 1986: Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 315: 1643-1647.

- KENNEDY G. A., KREITNER G. L., STRAFUSS A. C., 1977: Cryptosporidiosis in three pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170: 348-350.
- KVÁČ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., DITRICH O., HOFMANNOVÁ L., MODRÝ D., VÍTOVEC J., XIAO L., 2008: Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Vet. Parasitol.* 153: 363-367.
- KVÁČ M., VÍTOVEC J., 2003: Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. 50: 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.
- LEANDER B. S., CLOPTON R. E., KEELING P. J., 2003: Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 345-354.
- LEVINE N. D., 1984: Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, Apicomplexa). *J. Protozool.* 31: 94-98.
- LEVINE N. D., CORLISS J. O., COX F. E., DEROUX G., GRAIN J., HONIGBERG B. M., LEEDALE G. F., LOEBLICH A. R. 3RD, LOM J., LYNN D., MERINFELD E. G., PAGE F. C., POLJANSKY G., SPRAGUE V., VAVRA J., WALLACE F. G., 1980: A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27: 37-58.
- LINDSAY D. S., UPTON S. J., OWENS D. S., MORGAN U. M., MEAD J. R., BLAGBURN B. L., 2000: *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47: 91-95.
- MACKENZIE W. R., SCHELL W. L., BLAIR K. A., ADDISS D. G., PETERSON D. E., HOXIE N. J., KAZMIERCZAK J. J., DAVIS J. P., 1995: Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin. Infect. Dis.* 21: 57-62.
- MADDOX-HYTTEL C., LANGKJAER R. B., ENEMARK H. L., VIGRE H., 2006: *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs-occurrence and management associated risk factors. *Vet. Parasitol.* 141: 48-59.

- 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.
- MILÁČEK P., VÍTOVEC 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.
- MOON H. W., SCHWARTZ A., WELCH M. J., MCCANN P. P., RUNNELS P. L., 1982: Experimental fecal transmission of human cryptosporidia to pigs, and attempted treatment with an ornithine decarboxylase inhibitor. *Vet. Pathol.* 19: 700-707.
- MORGAN U. M., BUDDLE J. R., ARMSON A., ELLIOT A., THOMPSON R. C., 1999: Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs. *Aust. Vet. J.* 77: 44-47.
- MORGAN U. M., 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.
- MORGAN-RYAN U. M., FALL A., WARD L. A., HIJAWI N., SULAIMAN I., FAYER R., THOMPSON R. C., OLSON M., LAL A., XIAO L., 2002: *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 433-440.
- NAVIN T. R., HARDY A. M., 1987: Cryptosporidiosis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 155: 150.
- 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.
- NÚÑEZ A., MCNEILLY F., PEREA A., SÁNCHEZ-CORDÓN P. J., HUERTA B., ALLAN G., CARRASCO L., 2003: Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2 in weaned pigs. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 50: 255-258.
- O'DONOGHUE P. J., 1995: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25: 139-195.

- ÖZKUL I. A., AYDIN Y., 1994: Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 55: 129-132.
- PAVLÁSEK I., LÁVIČKOVÁ M., HORÁK P., KRÁL J., KRÁL B., 1995: *Cryptosporidium varanii* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo, *Gazella* 22, pp. 99–108. Zoo Praha.
- 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.
- QUÍLEZ J., SÁNCHEZ-ACEDO C., CLAVEL A., DEL CACHO E., LÓPEZ-BERNAD F., 1996: Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 67: 83-88.
- RAMIREZ N. E., WARD L. A., SREEVATSAN S., 2004: A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes. Infect.* 6: 773-785.
- RYAN U. M., MONIS P., ENEMARK H. L., SULAIMAN I., SAMARASINGHE B., READ C., BUDDLE R., ROBERTSON I., ZHOU L., THOMPSON R. C., XIAO L., 2004: *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* 90: 769-773.
- RYAN U. M., POWER M., XIAO L., 2008: *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 55: 22-26.
- RYAN U. M., SAMARASINGHE B., READ C., BUDDLE J. R., ROBERTSON I. D., THOMPSON R. C., 2003: Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3970-3974.
- SANFORD S. E., 1987: Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1981–1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190: 695–698.
- SLAVIN D., 1955: *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 65: 262-266.
- SOAVE R., ARMSTRONG D., 1986: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Rev. Infect. Dis.* 8: 1012-1023.

- STEHR-GREEN J. K., MCCAIG L., REMSEN H. M., RAINS C. S., FOX M., JURANEK D. D., 1987: Shedding of oocysts in immunocompetent individuals infected with *Cryptosporidium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 338-342.
- SUÁREZ-LUENGAS L., CLAVEL A., QUÍLEZ J., GOÑI-CEPERO M. P., TORRES E., SÁNCHEZ-ACEDO C., DEL CACHO E., 2007: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 148: 231-235.
- TACAL J. V. JR., SOBIEH M., EL-AHRAF A., 1987: *Cryptosporidium* in market pigs in southern California, USA. *Vet. Rec.* 120: 615-616.
- THOMPSON R. C., OLSON M. E., ZHU G., ENOMOTO S., ABRAHAMSEN M. S., HIJAWI N. S., 2005: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 59: 77-158.
- TŮMOVÁ E., SKŘIVAN M., MAROUNEK M., PAVLÁSEK I., LEDVINKA Z., 2002: Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Avian Dis.* 46: 203-207.
- TYZZER E. E., 1907: A sporozoan found in the peptic flanda of the common mouse. *Proc. Doc. Exp. Biol. Med.* 5:12-13.
- TYZZER E. E., 1912: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394-412.
- TZIPORI S., MCCARTNEY E., LAWSON G. H., ROWLAND A. C., CAMPBELL I., 1981: Experimental infection of piglets with *cryptosporidium*. *Res. Vet. Sci.* 31: 358-368.
- TZIPORI S., SMITH M., MAKIN T., HALPIN C., 1982: Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from calf faeces. *Vet. Parasitol.* 11: 121-126.
- TZIPORI S., WARD H., 2002: Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes. Infect.* 4: 1047-1058.
- UPTON S. J., CURRENT W. L., 1985: The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *J. Parasitol.* 71: 625-629.
- VALIGUROVÁ A., JIRKŮ M., KOUDELA B., GELNAR M., MODRÝ D., ŠLAPETA J., 2008: Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *Int. J. Parasitol.*, v tisku.

- VETTERLING J. M., JERVIS H. R., MERRILL T. G., SPRINZ H. 1971: *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. J. Protozool. 18: 243-247.
- VÍTOVEC J., HAMADEJOVÁ K., LANDOVÁ L., KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B., 2006: Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. J. Vet. Med. B. 53: 239-243.
- VÍTOVEC J., KOUDELA B., 1992: Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. Vet. Parasitol. 43: 25-36.
- WIELER L. H., ILIEFF A., HERBST W., BAUER C., VIELER E., BAUERFEIND R., FAILING K., KLÖS H., WENGERT D., BALJER G., ZAHNER H., 2001: Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. J. Vet. Med. 48: 151-159.
- WOLFSON J. S., RICHTER J. M., WALDRON M. A., WEBER D. J., MCCARTHY D. M., HOPKINS C. C., 1985: Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. N. Engl. J. Med. 312: 1278-1282.
- 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., HERD R. P., BOWMAN G. L., 1994: Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. Vet. Parasitol. 52: 331-336.
- XIAO L., MOORE J. E., UKOH U., GATEI W., LOWERY C. J., MURPHY T. M., DOOLEY J. S., MILLAR B. C., ROONEY P. J., RAO J. R. , 2006: Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4461-4463.
- XIAO L., RYAN U., 2007. Molecular Epidemiology. In FAYER R., XIAO L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Second edition, CRC Press, FL, pp. 119-163.
- ZINTL A., NEVILLE D., MAGUIRE D., FANNING S., MULCAHY G., SMITH H. V., DE WAAL T., 2007: Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. Parasitology 134: 1575-1582.

WARREN C. A., GUERRANT R. L., 2007. Clinical disease and pathology. In FAYER R., XIAO L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Second edition, CRC Press, FL, pp. 235-253.