

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**



**Vliv blízkého kontaktu člověka s lidoopy  
na mikrosporidiové a kryptosporidiové infekce**

Bakalářská práce

**Anna Mynářová**

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

České Budějovice 2012

**Mynářová A., (2012):** Vliv blízkého kontaktu člověka s lidoopy na kryptosporidiové a mikrosporidiové infekce [The effect of close human – apes contact on cryptosporidial and microsporidial infections, Bc. Thesis, in Czech] – 73 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

Due to growing ecotourism and research purposes several groups of free – ranging great apes have been habituated to human presence. Humans can act as reservoir of pathogens for great apes and thus close contact with them can pose a risk to their health and *vice versa*. Two hundred and fifty great apes at different levels of habituation, 175 wild and domestic animals and 47 persons in Central Africa were sampled for the occurrence of *Cryptosporidium*, *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon bieneusi* to consider the risk of close human – apes contact on cryptosporidial and microsporidial infections.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 27. 4. 2012

.....

**Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GA CR 206/09/0927**

Tato práce by byla nemyslitelnou bez přičinění mnohých. Děkuji především váženému a milému Martinu Kváčovi za veškerou vstřícnost, opětovné pročitání práce a bezmála tři léta odborného vedení. Děkuji celému kolektivu laboratoře veterinární a humánní protistologie Parazitologického ústavu BC AV ČR v. v. i. za vřelé přijetí a příjemnou pracovní atmosféru, zejména pak děkuji Bohumilu Sakovi a Daně Květoňové za všechna povzbuzení, pomoc a přátelský přístup.

Děkuji Kláře J. Petrželkové, Kateřině Pomajbíkové, Barboře Kalousové, Davidu Modrému, Kathryn A. Shutt, Julio Benavides, Angélique Todd a všem dalším, kteří se na práci podíleli, za poskytnutí biologického materiálu, cenné rady a za to, že jsem na jejich úsilí mohla vystavět svou práci.

Děkuji milovaným rodičům za ohromnou a neutuchající podporu během celé doby studia.

Děkuji rovněž drahé Tereze Velehradské, Světle Jarošové, Kateřině Koňářkové, Františkovi Sládečkovi a Jitce Bradáčové za pomoc se psáním práce.

Z celého srdce děkuji také přátelům Kateřině Břichcínové, Janovi Fojtů a Martinovi Vávrovi za mnohá povzbuzení a především za to, že mne v nemoci nikdy nenechali samotnou.

Děkuji Marii Kropšové, Elišce Nekvapilové a Anně Voleníkové za nemalou pomoc při studiu.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>2</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 Mikrosporidie</b> .....	<b>3</b>
3.1.1 Taxonomie .....	3
3.1.2 Historie .....	4
3.1.3 Vývojový cyklus.....	4
3.1.4 Mechanismy přenosu infekce .....	7
3.1.5 Prevence .....	8
3.1.6 Projevy infekce .....	8
3.1.8 <i>Enterocytozoon bieneusi</i> .....	10
3.1.9 <i>Encephalitozoon</i> spp.....	10
3.1.10 Další mikrosporidie infikující člověka .....	11
3.1.11 Mikrosporidióza u opic Starého světa .....	12
3.1.12 Mikrosporidióza u opic Nového světa.....	13
3.1.13 Mikrosporidióza u lidoopů .....	13
<b>3.2 Kryptosporidie</b> .....	<b>14</b>
3.2.1 Taxonomie .....	14
3.2.2 Historie .....	15
3.2.3 Vývojový cyklus.....	16
3.2.4 Způsoby přenosu .....	17
3.2.5 Projevy infekce .....	19
3.2.6 Terapie a preventivní opatření.....	19
3.2.7 Kryptosporidie u opic Starého světa.....	20
3.2.8 Kryptosporidie u opic Nového světa .....	21
3.2.9 Kryptosporidie u lidoopů.....	21
<b>3.3 Přenos infekcí mezi člověkem a ostatními lidoopy</b> .....	<b>22</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1 Původ vzorků a charakteristika lokalit</b> .....	<b>25</b>
4.1.1 Národní park Dzanga – Ndoki, Středoafriká republika .....	25
4.1.2 Rezervace Ugalla, Tanzánie .....	27
4.1.3 Národní park Volcanoes Virunga, Rwanda.....	28

4.1.4 Rezervace Kalinzu, Uganda .....	29
<b>4.2 Zpracování vzorků.....</b>	<b>29</b>
4.2.1 Izolace DNA .....	29
4.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	30
4.2.3 Gelová elektroforéza .....	32
4.2.4 Příprava vzorků na sekvenaci .....	33
4.2.5 Sekvence .....	33
4.2.6 Statistické zpracování výsledků .....	34
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>35</b>
5.1 Prevalence kryptosporidií a mikrosporidií u goril nížinných ( <i>Gorilla gorilla gorilla</i> ) s odlišnou mírou habituace .....	35
5.2 Prevalence kryptosporidií a mikrosporidií u šimpanzů učenlivých ( <i>Pan troglodytes schweinfurthii</i> ) s odlišnou mírou habituace .....	40
5.3 Prevalence kryptosporidií a mikrosporidií u skupiny goril horských ( <i>Gorilla beringei beringei</i> ) .....	40
5.4 Prevalence mikrosporidií a kryptosporidií u divokých a domácích zvířat ....	41
5.5 Vliv habituace na prevalenci mikrosporidií a kryptosporidií .....	42
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>43</b>
6.1 Vliv různých úrovní habituace na prevalenci mikrosporidií a kryptosporidií u volně žijících lidoopů .....	43
6.2 Genetická variabilita .....	44
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>46</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>47</b>

# 1. ÚVOD

Kryptosporidie, stejně jako mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon*, patří mezi jednobuněčné monoxenní parazity. Vyskytují se u hostitelů z řad bezobratlých a všech tříd obratlovců včetně člověka. Jedná se o eukaryotní organismy. Mikrosporidie jsou řazeny do kmene Mikrosporidia v rámci říše Fungi, kryptosporidie do kmene Apicomplexa, říše Chromalveolata. Některé druhy jsou hostitelsky specifické, zatímco jiné napadají mnoho hostitelských druhů.

Kryptosporidióza i mikrosporidióza patří mezi oportunní infekce, což znamená, že projev nákazy závisí, kromě lokalizace a druhu parazita, především na imunitním stavu hostitele. Zmínění paraziti infikují zejména jedince se sníženou imunitou, především HIV (SIV) pozitivní, pacienty po transplantaci orgánů a kostní dřeně, cestovatele, seniory a děti. Onemocnění může být akutní i chronické, zcela asymptomatické až letální u imunokomprimovaných jedinců. K přenosu dochází fekálně – orální cestou.

Organismy obou kmenů patří mezi nejčastější parazitické prvky napadající savce. Vyskytují se na všech obydlených kontinentech, v rozvojových i rozvinutých zemích. K jejich šíření nepopíratelně přispívá fakt, že dosahují pouze malých rozměrů a exogenní vývojová stádia (oocysty a spory) přežívají dlouho i v nepříznivých podmínkách. Tyto organismy vykazují zoonotický potenciál, mohou být tedy přenášeny mezi člověkem a zvířaty.

Vzhledem k blízké fylogenetické příbuznosti člověka s ostatními lidoopy, existuje celá řada patogenů, která je mezi nimi přenášena. Zvláště pak v poslední době, kdy vlivem rostoucí lidské populace, fragmentace biotopů a úbytku přirozených habitatů dochází k bližšímu kontaktu člověka s lidoopy. Choroby pouze lidské tak mohou být přenášeny na primáty a naopak. Populace ohrožených lidoopů, které jsou předmětem habituace za účelem ekoturismu a výzkumu, tak mohou být snadno vystaveny nebezpečí nákazy.

## 2. CÍLE PRÁCE

- zpracovat kriticky literární rešerši o tématu
- pomocí molekulárních metod detekovat kryptosporidie a mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* ve vzorcích trusu různých druhů lidoopů
- posoudit vliv kontaktu člověka s lidoopy na riziko infekcí



## 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Mikrosporidie

Mikrosporidie jsou jednobuněční intracelulární paraziti, které můžeme nalézt u celé řady hostitelů – zvláště u bezobratlých a ryb (Mathis a kol. 2005). Byly ale také pozorovány u prvoků (Fokin a kol. 2008), mechovek (Canning a kol. 2002), máloštetinatců (Morris a kol. 2005), hlístic (Troemel a kol. 2008) a všech tříd obratlovců včetně člověka (Matsubayashi a kol. 1959, Desportes a kol. 1985, Didier a kol. 1991, Cali a kol. 1993). Mikrosporidie jsou příčinou významných ekonomických ztrát ve včelařství, hedvábnictví a rybařství (Wittner 1999). Rozšíření mikrosporidií je kosmopolitní a tato protista byla nalezena na všech obydlených kontinentech.

Je známo celkem 14 druhů mikrosporidií infikujících člověka a bylo zaznamenáno několik set případů nakažení (Didier 2005). Nejčastěji jsou u lidí detekovány dva druhy: *E. bienersi* a *E. intestinalis*.

#### 3.1.1 Taxonomie

Mikrosporidie byly dříve řazeny do říše Archezoa, protože jsou v mnoha ohledech podobné prokaryotním organismům. Mají velmi malý genom a ribozomy podobné prokaryotním. Postrádají centrioly, peroxizomy a mitochondrie. Introny jsou u nich přítomny zřídka. Nyní jsou mikrosporidie považovány za velmi odvozené houbové organismy, které prošly významnými genetickými a funkčními ztrátami, které vedly k tomu, že mají jeden z nejmenších eukaryotních genomů (Mathis a kol. 2005). Řadí se jako samostatný kmen Mikrosporidia do říše Fungi a jejich nejbližší příbuznou skupinou jsou Zygomycetes (Keeling a kol. 2000). S houbovými organismy mají společnou přítomnost chitinu, trehalózy a některých genů. Poznatek o příslušnosti mikrosporidií do říše Fungi vedl mimo jiné k zavedení účinnější léčby mikrosporidiózy, a to díky použití inhibitorů chitin syntázy.

V rámci kmene jsou klasifikovány podle velikosti a morfologie spor, počtu závitů pólové trubice, uspořádání jádra, typu buněčného dělení, vývojového cyklu a vztahu hostitel – parazit (Sprague a kol. 1992, Didier a kol. 1998). Na základě přítomnosti mitochondriím podobným HSP70 genů u několika druhů mikrosporidií, je předpokládána sekundární ztráta mitochondrií (Keeling a kol. 2000).

Kmen Mikrosporidia zahrnuje v současné době přes 1200 popsaných druhů (Didier 2005).

### 3.1.2. Historie

V 19. století infekce mikrosporidií pustošila evropský hedvábný průmysl a téměř zdevastovala chovy bource morušového (*Bombyx mori*) ve Francii, Německu a Itálii. Roku 1857 profesor botaniky Carl Wilhelm von Nägeli ve své přednášce pojmenoval organismus za tuto škodu zodpovědný jako *Nosema bombycis* (Nägeli 1857). Tento rok je považován za počátek mikrosporidiologie, i když některé práce o mikrosporidiích byly publikovány dříve (Gluge 1838, Müller 1841, Creplin 1842).

Poté co byla popsána *Nosema bombycis*, byly nalezeny podobné organismy u celé řady živočichů – zejména bezobratlých a ryb. Systematické zařazení mikrosporidií bylo však sporné řadu let – často byly řazeny do Schizomycetes, které zahrnovaly kvasinky a bakterie, označovány za jednobuněčné řasy nebo nádorové buňky. První zdokumentovaný případ mikrosporidií u savce je z roku 1922, kdy Wright a Craighead popsali tyto organismy u králíků, kteří vykazovali třes, otupělost a strnulost (Wright a Craighead 1922). Tato mikrosporidie byla nazvána *Encephalitozoon cuniculi*.

První případ infekce člověka byl popsán v roce 1959 u devítiletého chlapce, který trpěl horečkou, bolestmi hlavy a křečemi (Matsubayashi a kol. 1959). U lidí byly popisovány zřídka až do začátku pandemie HIV, kdy počet nakažených osob mikrosporidiemi vzrostl. Byly také popsány nové druhy, které jsou schopny napadnout člověka. U pacientů s AIDS byly odhaleny: *Enterocytozoon bieneusi* v roce 1985 (Desportes a kol. 1985), *Encephalitozoon hellem* v roce 1991 (Didier a kol. 1991) a *Septata (Encephalitozoon) intestinalis* v roce 1993 (Cali a kol. 1993).

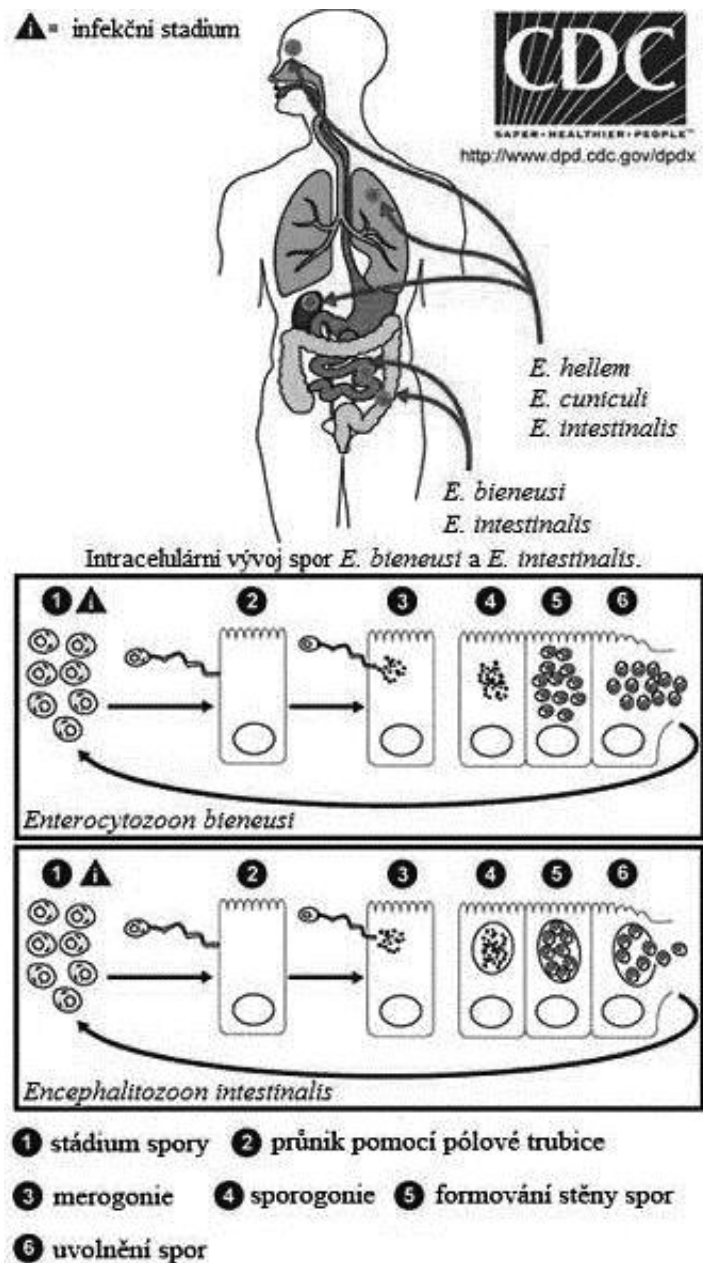
V souvislosti s větším povědomím o mikrosporidiích a objevením lepších diagnostických technik byly popsány i u příjemců transplantovaných orgánů a kostní dřeně, cestovatelů, dětí, seniorů a uživatelů kontaktních čoček (Deplazes a kol. 2000). Mikrosporidie jsou tedy běžnější, než se dříve předpokládalo.

### 3.1.3 Vývojový cyklus

Mikrosporidie nemají aktivní stadia mimo hostitelské buňky a v prostředí přežívají ve stádiu spory. Životní cyklus mikrosporidií (Obrázek 1) můžeme rozdělit na tři fáze (Weber a kol. 1994):

- infekční fázi (zahrnuje stádium spory a její uvolnění do prostředí, přenos spory, vystřelení pólové trubice a infekčního obsahu spory do hostitelské buňky)
- proliferační vegetativní fázi – merogonii (organismus se dělí v hostitelské buňce)
- intracelulární sporogonii (formují se nové spory)

• **Obrázek 1: Mikrosporidie - životní cyklus (upraveno)**



Cytoplazma obsahuje jednojadernou nebo dvoujadernou infekční část (sporoplazma), speciální vystřelovací aparát (skládající se z pólové trubice stočené uvnitř spory, jenž je

připojena ke kotvícímu disku v přední části spory), atypický Golgiho aparát – složitý systém membrán (lamelární polaroplast), posteriorní vakuolu, hrubé endoplazmatické retikulum a volné ribozomy. Mikrosporidie nemají peroxizomy a mitochondrie. Mohou být jednojaderné (např. *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*) nebo dvoujaderné – dvě spojená jádra, která fungují jako jednotka (např. *Nosema*, *Brachiola*). Pólová trubice, která je ve spoře svinutá, vytváří přibližně 4-30 závitů kolem sporoplazmy a slouží k přenosu sporoplazmy do hostitelské buňky. Ke stěně spory je přichycena kotvícím diskem. Kritériem pro zahrnutí do kmene mikrosporidií je právě přítomnost této organely a počet závitů pólové trubice je klíčovým klasifikačním znakem v rámci tohoto kmene.

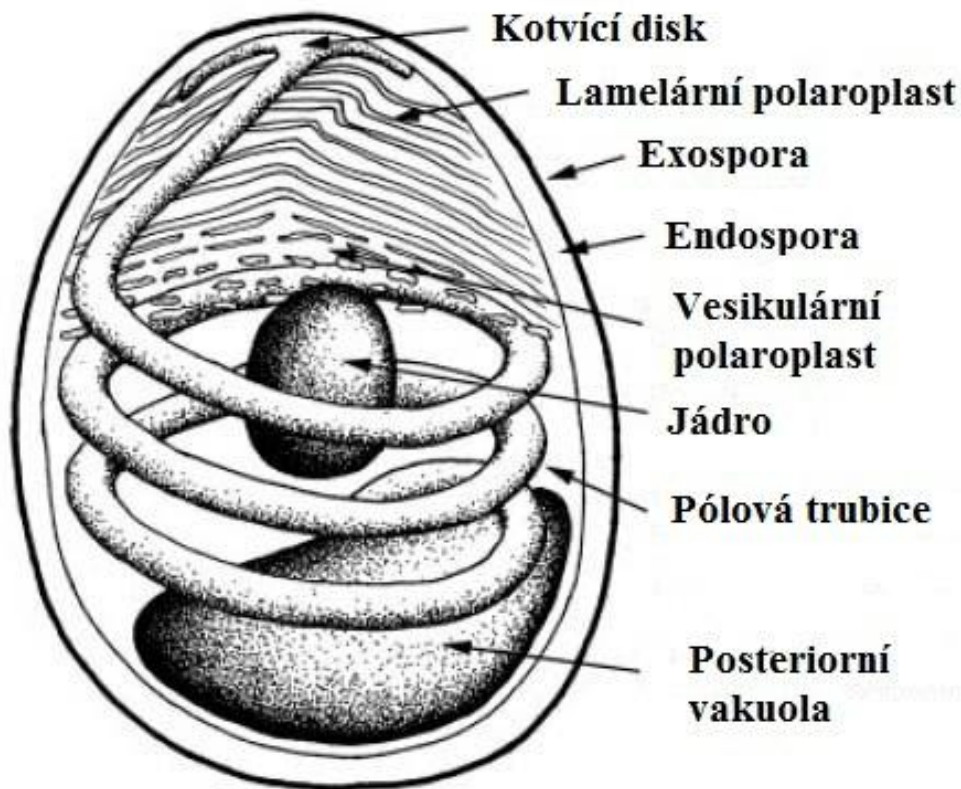
Spory mají oválný tvar (Obrázek 2). Stěny spor mikrosporidií se skládají:

- ze zvlněné glykoproteinové exospory
- z chitinové endospory
- z třívrstvé plazmatické membrány, která sporám zajišťuje mimořádnou odolnost

Spory se liší velikostí a strukturou, ale u savců nepřesahují 3  $\mu\text{m}$ . Spora proniká do hostitelské buňky pomocí pólové trubice. Pokud je spora aktivována nespecifickými signály, jako jsou změny osmotického tlaku nebo pH způsobené hydrolýzou zásob trehalózy, dojde k bobtnání posteriorní vakuoly, které je zapříčiněno přílivem vody. Následně zvýšený tlak způsobí vystřelení pólové trubice, jež pronikne plazmatickou membránou hostitelské buňky, a vypuzení sporoplazmy skrze pólovou trubici.

Uvnitř hostitelské buňky se sporoplazma za vhodných podmínek dělí a vytváří proliferační formu (meronty). Meronti mají oválný, prodloužený nebo nepravidelný tvar, jednoduchou plazmatickou membránou a malé ribozomy. Vývoj meronta může probíhat v parazitoformní vakuole (např. *Encephalitozoon* spp.) nebo zůstává volně v přímém kontaktu s cytoplazmou (např. *Enterocytozoon bieneusi*). Meronti jsou přizpůsobeni k odsávání živin přímo z hostitelské buňky. Vyvíjí se ve sporonty, kteří se dělí a vznikají sporoblasty – plazmatická membrána se zesiluje, cytoplasma se zahušťuje a vytváří se organely spory (vakuola, pólová trubice a kotvící disk) (Wasson a Peper 2000). Dochází k množení a dozrávání spor, které vyústí v protržení cytoplazmatické membrány hostitelské buňky a uvolnění spor do extracelulárního prostoru. Uvolněné spory mohou dále napadat okolní buňky nebo se mohou šířit dále cévním systémem. Proniknutí do hostitelské buňky je možné nejen pomocí pólové trubice, ale také fagocytózou.

Obrázek 2: Mikrosporidie – spora (Keeling a Fast 2002, upraveno)



### 3.1.4 Mechanismy přenosu infekce

Spory mikrosporidií se vyskytují běžně v prostředí, do něhož jsou vylučovány zvířaty s močí a výkaly. Na člověka mohou být přenášeny kontaktem s jinými infikovanými lidmi, zvířaty nebo vodou. Bylo také popsáno přenesení skrze poštípání hmyzem.

U laboratorních zvířat byl experimentálně prokázán i intraperitoneální, intravenózní, intratracheální a intracerebrální přenos infekce (Snowden a kol. 1998).

- **Horizontální a vertikální přenos**

Přenos spory do hostitelského organismu se děje nejčastěji vdechnutím nebo pozřením. Byl také popsán přenos horizontální skrze placentu u hlodavců, koní, lišek, psů a opic. (Snowder a kol. 1998, Snowder a Shaddock 1999). U člověka prokázán nebyl (Didier a kol. 2000). Zřídka může být infekce přenesena přímým kontaktem – např. oční infekcí nebo ránou. Podle nálezu mikrosporidií v močovodu a prostatě některých pacientů s AIDS je pravděpodobný sexuální přenos mikrosporidií (Birchistle a kol. 1996). Počáteční místo infekce závisí na způsobu přenosu – typicky se jedná o buňky gastrointestinálního nebo dýchacího traktu.

- **Přenos vodou**

Mnoho druhů mikrosporidií (včetně *E. intestinalis* a *E. bienersi*) je přítomno v půdě, užitkových, povrchových a odpadních vodách (Dowd a kol. 1998). Přenos skrze vodu je možný díky nízké hostitelské specificitě mikrosporidií. Mnoho zvířat je infikovaných stejnými druhy mikrosporidií, které napadají člověka. Zdroje vody mohou být kontaminovány močí a výkaly infikovaných zvířat. Spory mikrosporidií mohou přežívat dlouhé období ve vodě a infekční dávka pro člověka je velmi malá. Spory jsou malé a tak těžko zachytitelné filtrací. Jsou schopné přežívat ve slané i sladké vodě a proto představují značné riziko. Např. spory *E. cuniculi* jsou velmi odolné, zůstávají infekční po vysušení, zmrazení a rozmrazení, uchovávání v destilované vodě a inkubaci 24 hod při pH 4 a pH 9 (Shadduck a Polley 1978). *Encephalitozoon intestinalis* a *E. hellem* jsou schopny přežít ve vodě při teplotách 10-30 °C po několik měsíců (Didier a kol. 2004). Spory mohou přežívat v nechlorované vodě až 10 let (Shadduck a Polley 1978).

- **Přenos potravinami**

Možné je také nakažení z potravy – konzumací syrového rybiho masa, špatně tepelně upraveného masa či mořských plodů (Didier a kol. 2004).

### **3.1.5 Prevence**

Není přesně známo, co vše může být zdrojem infekce mikrosporidií. Hlavním rizikovým faktorem je především kontakt s vodou.

Za rizikové chování u HIV pozitivních pacientů je považováno požívání špatně tepelně zpracovaného hovězího masa, plavání ve veřejných bazénech, kontakt s vodou v zaměstnání, práce se zvířaty, která by mohla být infikována mikrosporidii, nitrožilní aplikace drog, poštipání včelou, vosou nebo sršněm (Hutin a kol. 1998, Deplazes a kol. 2000).

### **3.1.6 Projevy infekce**

Ačkoli byly mikrosporidie zpočátku považovány za řídce se vyskytující, dnes jsou známy jako běžně rozšířené patogeny, zvláště pak u HIV pozitivních pacientů. Klinické příznaky a průběh nemoci záleží na druhu mikrosporidie a imunitním systému jedince (Didier 2005).

U imunokompetentních osob je infekce často bez klinického projevu. Nejčastějším projevem spojeným s infekcí zažívacího traktu je průjem, ale vyskytuje se také hepatitida, zánět pobřišnice, oční infekce, plicní infekce, zánět ledvin, močové trubice, svalů

a mozku. Infekce jsou obvykle chronické, pomalu působící a zřídka kdy život ohrožující (Shaddock a Greeley 1989).

Procento nakažených mikrosporidiiemi u pacientů s AIDS se pohybuje od 2 do 50 % v závislosti na geografické oblasti a použitých diagnostických metodách (Weber a kol. 1994, Kotler a Orestein 1998). Podle těchto údajů bylo celkové procento AIDS pacientů nakažených mikrosporidiiemi odhadnuto na 15 (Bryan a Schwarz 1999). Vyšší infikovanost byla zaznamenána mezi dárci krve, těhotnými ženami, u pracovníků na jatkách, pacientů s průjemem, cestovatelů, seniorů, dětí a homosexuálů (Van Gool a kol. 1997, Enriquez a kol. 1998, Lopez-Velez a kol. 1999, del Aguila a kol. 2001, Müller a kol. 2001, Lores a kol. 2002).

U dětí v tropech, které byly nakaženy mikrosporidiiemi, zejména *E. bienewisi*, byl průvodním příznakem infekce silný průjem, pravděpodobně kvůli oslabenému imunitnímu systému v důsledku špatné výživy (Valperga a kol. 1999, Tumwine a kol. 2002). Bylo také publikováno, že starší lidé ve Španělsku jsou více náchylní k mikrosporidiióze, pravděpodobně díky snížené imunitě v důsledku stárnutí (Lores a kol. 2002).

Oční infekce může nastat i u osob imunokompetentních. *Vittaforma corneae*, *Brachyla algerae* a *Nosema* způsobují zastřené vidění a protržení rohovky (Font a kol. 2003).

### **3.1.7 Terapie**

Nejčastější léčba mikrosporidiiózy u lidí a zvířat je pomocí albendazolu a fumagilinu (Conteas a kol. 2000). Albendazol je efektivní při léčbě mikrosporidiií rodu *Encephalitozoon*, ale ne vždy je účinný proti *E. bienewisi* (Gross 2003). Proti infekci *E. bienewisi* je účinný fumagilin, antibiotikum produkované *Aspergillus fumigatus*, který je však často pro lidský organismus toxický. Mnoho dalších testovaných léčiv má proměnlivé účinky.

Při léčbě AIDS pacientů je účinná antiretrovirální terapie (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART), která obnovením imunitního systému brání rozvoji mnohých oportunních infekcí včetně mikrosporidiií.

### 3.1.8 *Enterocytozoon bienersi*

Rod *Enterocytozoon* zahrnuje druhy *Enterocytozoon bienersi* a *E. salmonis*. *E. bienersi* je nejčastější druh mikrosporidií, který infikuje člověka. Je známo několik set případů nakažení z celého světa. Prevalence u HIV pozitivních osob je odhadována na 50 % (Didier a kol. 2004). *E. bienersi* byl poprvé detekován v roce 1985 na základě vyšetření pacienta s AIDS trpícího chronickým průjmem (Desportes a kol. 1985).

Byl popsán u imunodeficitních i imunokompetentních osob, prasat (Rinder a kol. 2000, Buckholt a kol. 2002, Sak a kol. 2008), telat (Dengjel a kol. 2001, Fayer a kol. 2003, Sulaiman a kol. 2004), koček (Rinder a kol. 2000), kuřat (Reetz a kol. 2002), lam (Dengjel a kol. 2001), psů a koz (Lores a kol. 2002), králíků (del Aguila a kol. 1999), mývalů, ondatr, bobrů, lišek (Sulaiman a kol. 2004), divokých prasat (del Aguila a kol. 2004), pštrosů a holubů (del Aguila a kol. 2004, Haro a kol. 2005), lidoopů (Mansfield a kol. 1997, Sestak a kol. 2003), koní a kuduů (Santín a Fayer 2011).

Organismus se vyvíjí v přímém kontaktu s cytoplazmou hostitelské buňky mimo parazitoformní vakuolu. Spory jsou nejmenší ze všech mikrosporidií, oválné, tenkostěnné, měřící pouze  $1,1-1,6 \times 0,7-1,0 \mu\text{m}$ . Mají pět až sedm závitů polární trubice uspořádaných do dvou řad (Vávra a Larrison 1999). Parazit obvykle primárně napadá enterocyty tenkého střeva a epitelní buňky žlučníku, byl ale také nalezen v buňkách jater, slinivky, průdušek a nosního epitelu (Franzen a Müller 2001).

### 3.1.9 *Encephalitozoon spp.*

Zatímco *E. bienersi* způsobuje poměrně lokalizované infekce v zažívacím nebo méně často v dýchacím traktu, zástupci rodu *Encephalitozoon* se rozšiřují a způsobují zánět dutin, keratokonjunktivitu, encefalitidu, tracheobronchitidu, zánět ledvin, hepatitidu, myositis a ve spojitosti s HIV můžou ovlivnit všechny orgánové soustavy (Weber a kol. 1994).

Všechny druhy rodu *Encephalitozoon* se vyvíjejí v parazitoformní vakuole. Spory měří  $2,0-2,5 \times 1,0-1,5 \mu\text{m}$  a polární trubice tvoří pět až sedm závitů v jedné řadě (Franzen a Müller 2001).

*Encephalitozoon cuniculi* byl první pozorovanou mikrosporidií u savců a je také nejvíce zkoumanou mikrosporidií napadající savce. Byl popsán u králíků, myší, krys, ondatr, morčat, křečků, rejsků, koz, ovcí, prasat, koní, psů, lišek, koček a primátů včetně člověka (Shaddock a Pakes 1971). Jsou známy čtyři genotypy. Genotyp I pochází z králíků,



genotyp II z myši, genotyp III ze psů a genotyp IV byl objeven u HIV pozitivního pacienta (Shaddock 1969, Shaddock a kol. 1978, Didier a kol. 1998, Talabani a kol. 2010). *E. cuniculi* způsobuje rozšířené infekce téměř ve všech orgánových systémech (Mertens a kol. 1997).

***Encephalitozoon hellem*** je morfologicky podobný *E. cuniculi* a nelze ho odlišit pouze pomocí mikroskopu. Byl určen za použití biochemických a imunologických metod v roce 1990 jako příčina keratokonjunktividy u HIV pozitivního pacienta. Napadá dýchací a urogenitální trakt, časté je jeho rozšíření do dalších tkání (Didier a kol. 1991, Schwartz a kol. 1992). Pozorován byl u člověka, myši, králíků, ptáků (Slodkovicz-Kowalska 2006b, Kašičková a kol. 2007), kaloně (Childs-Sanford a kol. 2006) a scinků (Koudela a kol. 1998).

***Encephalitozoon intestinalis***, dříve *Septata intestinalis*, vytváří jedinečnou strukturu, parazitem vylučovanou vláknitou sítí, tvořící septa, obklopující vyvíjejícího se parazita. Matrix je vylučována do parazitoformní vakuoly. *Encephalitozoon intestinalis* byl pozorován u oslů, zeber, psů, prasat, krav, koz (Bornay-Llinares a kol. 1998), goril (Graczyk a kol. 2002), koal (Nimmo a kol. 2007), lišek (Murphy a kol. 2006), slávičky (Graczyk a kol. 2004) a člověka. Od *Enterocytozoon bieneusi* byl odlišen v roce 1993. *Encephalitozoon intestinalis* napadá zažívací trakt, žlučové cesty a může se rozšířit do ledvin, očí a nosních dutin (Orenstein a kol. 1992).

### **3.1.10 Další mikrosporidie infikující člověka**

Jako patogeny člověka byly také popsány mikrosporidie rodu *Nosema*. Ačkoli je tento rod široce rozšířen, většina druhů parazituje u bezobratlých. U člověka byly detekovány *N. connori* a *N. ocularum* (Margileth a kol. 1973, Sprague a kol. 1974, Cali a kol. 1991). *Pleistophora* spp. jsou běžní paraziti ryb, ale u člověka byla nalezena pouze *Pleistophora ronneafiei* (Ledford a kol. 1985). Morfologicky je mu podobný rod *Trachipleistophora* spp., u člověka byly detekovány *T. anthropophthera* a *T. hominis* (Hollister a kol. 1996, Vávra a kol. 1998). *Vittaforma corneae* byla izolována z nádoru rohovky imunokompetentního pacienta (Silveira a Canning 1995). *Brachiola algerae* je mikrosporidie, která je známa u komárů, ale může být přenesena také na člověka, stejně jako *B. vesicularum* a *B. connori* (Cali a kol. 1998, Visvesvara 1999).

Skupina *Microsporidium* je soubor identifikovaných druhů, jejichž zařazení je nejisté, protože chybí podrobnosti o životních cyklech. *M. ceylonensis* bylo identifikováno

v nádoru rohovky 11letého chlapce ze Srí Lanky (Ashton a Wirasinha 1973). *M. africanum* bylo izolováno z nádoru rohovky ženy z Botswany (Pinnolis a kol. 1981).

### 3.1.11 Mikrosporidióza u opic Starého světa

Spontánní a experimentální nákazy *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon cuniculi* byly popsány u makaků (*Macaca mulatta*, *M. nemestrina* a *M. cyclopsis*), lemuru (*Eulemur macaco* a *E. mongoz*) a kočkodana zeleného (*Cercopithecus pygerythrus*) chovaných v zajetí (Tabulka 1).

První dokumentovaný přenos *E. bieneusi* mezi dvěma hostiteli pochází z roku 1997, kdy byla experimentálně přenesena nákaza mezi AIDS pacientem a SIV pozitivním makakem (*Macaca mulatta*) (Tzipori a kol. 1997).

**Tabulka 1: Mikrosporidióza u opic Starého světa chovaných v zajetí.**

Druh	Infekce	SIV	Hostitel	Projevy infekce	Reference
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	experimentální	+	<i>Macaca mulatta</i>	těžká sepse a endokarditida	Tzipori a kol. 1997
			<i>Macaca mulatta</i> <i>Macaca nemestrina</i> <i>Macaca cyclopsis</i>	zánět žlučových cest	Mansfield a kol. 1997 Chalifoux a kol. 1998
			<i>Macaca mulatta</i>	zánět žlučových cest serositis -	Mansfield a kol. 1998 Chalifoux a kol. 2000 Green a kol. 2004
	spontánní	-	<i>Eulemur macaco</i> <i>Eulemur mongoz</i>	bez příznaků	Slodkovicz -Kowalska a kol. 2006a
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	experimentální	-	<i>Cercopithecus pygerythrus</i>	poškození jater, ledvin a mozku	Van Dellen a kol. 1989
		+	<i>Macaca mulatta</i>	poškození jater a ledvin	Didier a kol. 1994

U volně žijících opic v Kamerunu: kočkodana bělonosého (*Cercopithecus nicticans*), kočkodana muido (*Cercopithecus cephus*), kočkodana pruhohřbetého (*Cercopithecus pogonias*), kočkodana brazzova (*Cercopithecus neglectus*), kočkodana talaponina (*Miopithecus talapoin*), mangabeje štíhlého (*Cercocebus agilis*), mangabeje obecného

(*Cercocebus albigena*) a guarézy pláštíkové (*Colobus guereza*) byla zkoumána nákaza *E. bieneusi* (Pourrut a kol. 2002). Nákaza nebyla prokázána u žádné ze 42 opic.

### 3.1.12 Mikrosporidióza u opic Nového světa

Prevalence u volně žijících opic Nového světa není známá a studie popisují pouze nákazy *E. cuniculi* u jedinců chovaných v zajetí. Jsou zdokumentovány u kotula veverkovitého (*Saimiri sciureus*), tamarínů (*Saguinus imperator* a *S. oedipus*), lvíčka zlatého (*Leontopithecus rosaria rosaria*) a titiho rezavého (*Callicebus moloch*) (Tabulka 2).

**Tabulka 2: Spontánní nákazy *E. cuniculi* u opic Nového světa chovaných v zajetí.**

SIV	Hostitel	Projevy infekce	Reference
+	<i>Callicebus moloch</i>	-	Seibold a Fussell 1969
	<i>Saimiri sciureus</i>	zánět ledvin a plic	Zeman a Baskin 1985
-	<i>Saimiri sciureus</i>	poškození CNS	Brown a kol. 1973
		-	Shaddock a Baskin 1989
	<i>Saguinus imperator</i>	sepsy	Guscetti a kol. 2003
	<i>Saguinus imperator</i> <i>Oedipomidas oedipus</i> <i>Leontopithecus rosaria rosaria</i>	poškození jater	Reetz a kol. 2004
	<i>Saguinus imperator</i> <i>Oedipomidas oedipus</i>	poškození jater, plic a svalů	Juan Sallés a kol. 2006

### 3.8.13 Mikrosporidióza u lidoopů

Mikrosporidie byly pozorovány v národním parku Bwindi (330 km<sup>2</sup>) v Ugandě. Tento park je domovem asi 290 horských goril (*Gorilla beringei beringei*), což tvoří necelou polovinu jejich světové populace. Byla popsána nákaza *E. intestinalis* u 3 horských goril a 2 lidí (Graczyk a kol. 2002). Tyto gorily jsou zvyklé na přítomnost lidí. Vzhledem k tomu, že genotyp pozorovaný u nakažených osob i goril je stejný, je pravděpodobné, že došlo k přenosu nákazy z goril na člověka nebo naopak. Zaměstnanci parku pravděpodobně při odklizení trusu nedbali bezpečnostních předpisů nebo nákaza byla zapříčiněna pitím vody přímo z pramenů.

Mikrosporidiosis byla také zkoumána u 150 šimpanzů (*Pan troglodytes*), 14 bonobů (*Pan paniscus*), 53 goril nížinných (*Gorilla gorilla*) a 20 členů personálu ze 13 evropských zoologických zahrad a 2 afrických rezervací. Mikrosporidie byly nalezeny na všech zkoumaných místech a 36,7 % jedinců bylo na mikrosporidiosis pozitivních (78 *E. cuniculi* genotyp I, 5 *E. cuniculi* genotyp II, 2 *E. hellem* a 4 *E. bienersi*) (Sak a kol. 2011b).

## 3.2 Kryptosporidie

Kryptosporidie napadají gastrointestinální a respirační trakt všech tříd obratlovců včetně člověka. Jsou rozšířeny celosvětově. Onemocnění způsobené kryptosporidii označujeme jako kryptosporidiosis. Kryptosporidie jsou jednou z nejčastějších příčin průjemových onemocnění u člověka (Wheeler a kol. 2007).

Některé druhy jsou velmi patogenní (*C. parvum* nebo *C. hominis*), zatímco infekce jinými druhy ve většině případů není spojena s žádným projevem nemoci (*C. andersoni*) (Fayer a Xiao 2007). U imunokompetentních jedinců jsou projevy mírnější, u imunosuprimovaných mohou způsobit závažné zdravotní problémy nebo dokonce smrt.

Většina výzkumu zaměřujícího se na biologii, morfologii, biochemii a imunologii kryptosporidií je prováděna na *Cryptosporidium parvum*, který slouží jako modelový druh. Tento druh se vyznačuje širokou hostitelskou specifičností, produkuje velké množství oocyst a je geograficky široce rozšířen (Fayer a Xiao 2007).

Mezi druhy nejčastěji napadající člověka patří *Cryptosporidium parvum* a *Cryptosporidium hominis* (Xiao a Feng 2007). U těchto dvou druhů je patrná proměnlivost v zeměpisném rozšíření. Ve Velké Británii a na Novém Zélandu je *C. parvum* u člověka zodpovědné za více infekcí než *C. hominis* a naopak *C. hominis* způsobuje více infekcí než *C. parvum* v USA, Austrálii a mnoha rozvojových zemích (Adamu a kol. 2010).

### 3.2.1 Taxonomie

Kryptosporidie jsou jednobuněční paraziti, kteří jsou řazeni do kmene Apicomplexa. Pro zástupce kmene Apicomplexa je typický tzv. apikální komplex - invazní orgán, který umožňuje průnik infekčního stadia do buňky hostitele. Dříve byl rod *Cryptosporidium* řazen ke koccidiiám, ale odlišuje se od nich celou řadou znaků: poměrně nízkou hostitelskou a orgánovou specifičností, rezistencí k antimikrobiálním lékům, schopností autoinfekce a nezvyklou lokalizací parazita v membráně hostitelské buňky (Tzipori

1983). Některé fylogenetické analýzy proto předpokládají úzký vztah mezi kryptosporidii a gregarínami (Carreno a kol. 1999).

V rámci rodu *Cryptosporidium* v současné době rozeznáváme 24 druhů a asi 70 platných genotypů. Jejich identifikace je založena na morfologii vývojových stádií, genetických odlišnostech a hostitelské specificitě. V rámci rodu potom rozlišujeme dvě monofyletické skupiny kryptosporidií s rozdílnou lokalizací vývojového cyklu a morfologií oocyst. První skupinu tvoří kryptosporidie napadající střevní epitel. Jejich oocysty jsou kulaté a dosahují velikosti okolo 5  $\mu\text{m}$ . Druhým typem jsou kryptosporidie infikující žaludek hostitele. Jejich oocysty jsou oválné a měří kolem 7  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Historie

Rod *Cryptosporidium* poprvé popsal Ernest Edward Tyzzer v roce 1907. Tehdy prvoka nalezeného v žaludečním epitelu myši pojmenoval jako *Cryptosporidium muris* a popsal jeho vývojová stadia (Tyzzer 1907). V roce 1912 pak popsal další druh *Cryptosporidium parvum*, který našel v tenkém střevě myši (Tyzzer 1912). Oocysty *C. parvum* byly menší než oocysty *C. muris*. V roce 1955 byl identifikován nový druh *Cryptosporidium meleagridis*, který byl jako první spojen se smrtí hostitele (Slavin 1955). Těmto organismům nebyl přikládán medicínský význam až do roku 1976, kdy byly nezávisle na sobě publikovány dvě studie potvrzující výskyt kryptosporidií u člověka (Meisel a kol. 1976, Nime a kol. 1976). Oba pacienti, žijící na farmě v přítomnosti psů a dobytka, trpěli průjmem.

V sedmdesátých letech byla publikována celá řada prací, popisujících kryptosporidiózu u skotu, ovcí, prasat, koní, krocanů, králíků, opic, hadů a morčat. Nárůst zájmu také vzbudila zpráva amerického Centra pro kontrolu nemocí (Center for Disease Control, CDC) z roku 1982, která popsala 21 případů průjmového onemocnění u AIDS pacientů ve Spojených státech, způsobených kryptosporidii.

V devadesátých letech bylo pozorováno, že lidé bývají nejčastěji nakaženi dvěma odlišnými typy *C. parvum*. Tyto dvě morfologicky podobné kryptosporidie byly následně rozlišeny jako dva samostatné druhy *C. hominis* (dříve genotyp I – lidský), napadající převážně člověka a *C. parvum* (dříve genotyp II – bovinní) infikující člověka a přežvýkavce.

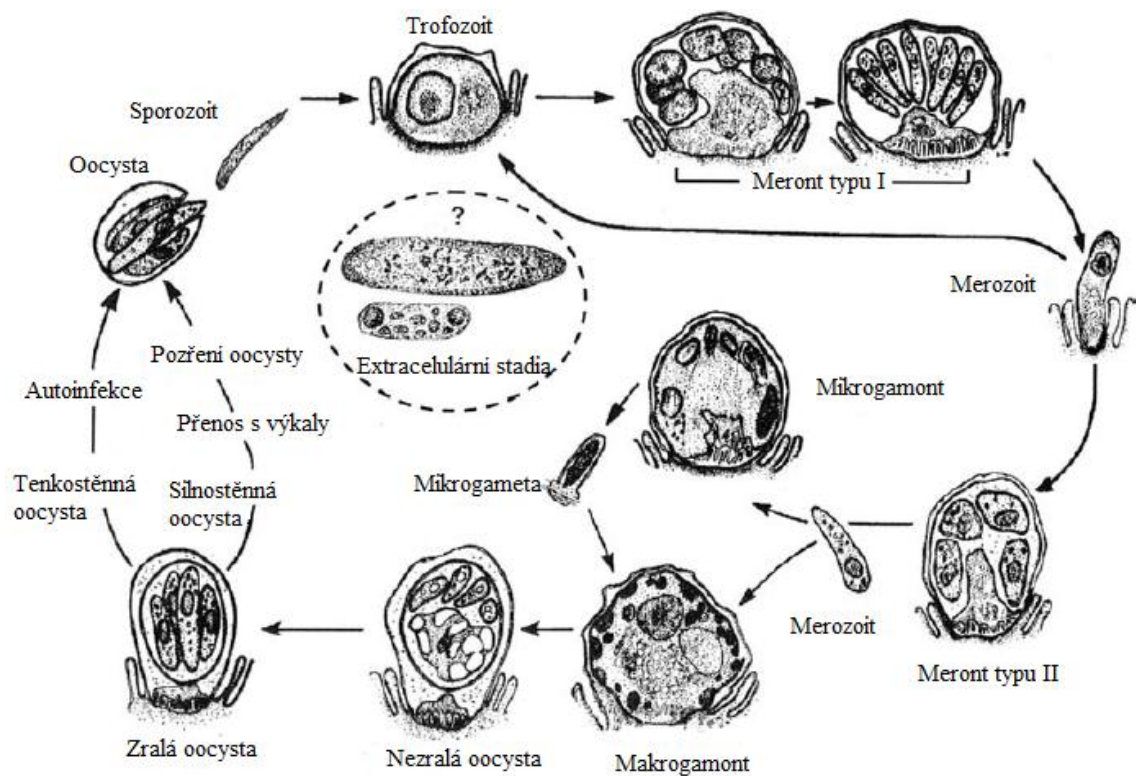
Od roku 1984 bylo zaznamenáno ve světě více než 20 epidemií kryptosporidiózy: mezi největší pak patří epidemie v Carroll County, Georgia roku 1987 (13 tisíc nakažených), v Jackson County, Oregon roku 1992 s 15 tisíci nakaženými a v Saitama Prefecture,

Japonsko v roce 1996 (8,7 tisíc nakažených). Nejznámější však zůstává epidemie kryptosporidiózy z roku 1993 ve městě Milwaukee. Díky své nebývalé závažnosti byla zevrubně popsána v tisku i vědeckých pojednáních. Došlo k nákaze 403 000 osob, 1 000 lidí bylo hospitalizováno a nejméně 100 jí podlehl, většinou jedinců s oslabenou imunitou (Smith a Rose 1998).

### 3.2.3 Vývojový cyklus

Vývojový cyklus kryptosporidií (Obrázek 3) je monoxenní, skládající se z asexuálních i sexuálních stádií a můžeme ho rozdělit na fáze excystace, merogonie, gamogonie a sporogonie. Jediným exogenním stádiem je oocysta, která je tvořena tuhou třívrstvou stěnou a zajišťuje životnost čtyř sporozoitů. U člověka může celý vývojový cyklus proběhnout během 4 dní (DuPont a kol. 2011).

**Obrázek 3: Životní cyklus kryptosporidií (Fayer a Xiao 2007, upraveno)**



- **Excystace**

Endogenní fáze začíná požitím oocysty s vodou nebo potravou. Oocysty se následně dostávají do respiračního nebo trávicího traktu. Ve stěně spory je sutura, která při excystaci praská vlivem nízkého pH v žaludku, pankreatických enzymů a žlučových solí.

Oocysta je otevřena a čtyři sporozoiti opouštějí oocystu. Sporozoiti jsou volně pohybliví a pronikají k cílovým buňkám – enterocytům. Vznikají vývojová stadia – trofozoiti. Na hostitelských buňkách jsou umístěny epicelulárně.

- **Merogonie (asexuální dělení)**

Nepohlavní dělení se nazývá merogonie (schizogonie). Při dělení jádra trofozoitů vznikají dva odlišné typy merontů. Meronti typu I vytvářejí 6-8 merozoitů, které napadají další enterocyty a vyvíjejí se v další meronty typu I nebo II. Meronti typu II vytvářejí čtyři merozoity.

- **Gamogonie (sexuální dělení)**

Merozoiti typu II vstupují do sexuálního dělení a vytvářejí gamonty, samčí mikrogamonty a samičí makrogamonty. Z mikrogamontů vznikají bičíkaté mikrogamety, které oplodňují makrogamety vzniklé z makrogamontů. Pouze oplozené makrogamety se mohou vyvinout v zygotu.

- **Sporogonie**

Zygota prochází sporogonií a vytváří jeden ze dvou typů oocyst – tenkostěnné a tlustostěnné. Tenkostěnné oocysty (20 %) excystují v těle hostitele a způsobují autoinfekci. Silnostěnné oocysty (80 %) opouštějí tělo hostitele s výkaly a mohou infikovat další hostitele.

### **3.2.4 Způsoby přenosu**

Kryptosporidie se přenáší fekálně - orální cestou. Způsoby přenosu mohou být: přímým kontaktem (člověk – člověk, člověk – zvíře, zvíře – zvíře), kontaktem s výkaly nakaženého jedince, vdechnutím, pozřením kontaminované potravy nebo vody (Fayer a Xiao 2007).

- **Horizontální přenos**

Byl pozorován přenos v rodinách, školkách, školách a domech s pečovatelskou službou, nemocnicích (Ribeiro a Palmer 1985, Hannah a Riordan 1988, Ortega a kol. 2006). Popsán byl rovněž přenos u homosexuálních mužů (Pedersen a kol. 1996, Griffiths 1998).

- **Zootonický přenos**

Kryptosporidie mohou být na člověka přeneseny přímým kontaktem se zvířaty nebo infikovaným trusem. Nejvíce ohrožení jsou veterináři, zaměstnanci farem a chovatelé dobytka (Rahman a kol. 1985, Reif a kol. 1989, Mahdi a Ali 2002, Preiser a kol. 2003).

Mnoho druhů kryptosporidií se vyznačuje širokou hostitelskou specifikou a mohou napadat i člověka (Tabulka 3). Nejčastějším druhem přenášeným z dobytka na člověka je *C. parvum*.

**Tabulka 3: Přehled druhů a genotypů rodu *Cryptosporidium* infikujících člověka.**

<b>Druh</b>	<b>Reference</b>
<i>C. parvum</i>	Nime a kol. 1976, Meisel a kol. 1976
<i>C. meleagridis</i>	Pedraza-Díaz a kol. 2000
<i>C. muris</i>	Katsumata a kol. 2000
<i>C. tyzzeri</i>	Xiao a kol. 2001
<i>C. felis</i>	Pedraza-Díaz a kol. 2000
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan a kol. 2002
<i>C. suis</i>	Leoni a kol. 2006
<i>C. canis</i>	Xiao a kol. 2007
<i>C. andersoni</i>	Morse a kol. 2007
<i>C. wrairi</i>	Azami a kol. 2007
<i>C. skunk</i> genotyp	Robinson a kol. 2009
<i>C. horse</i> genotyp	Robinson a kol. 2009
<i>C. rabbit</i> genotyp	Chalmers a kol. 2009
<i>C. chipmunk I</i> genotyp	Jellison a kol. 2009
<i>C. deer</i> genotyp	Jellison a kol. 2009
<i>C. pig II</i> genotyp	Kváč a kol. 2009
<i>C. ubiquitum</i>	Fayer a kol. 2010
<i>C. fayeri</i>	Waldron a kol. 2010
<i>C. cuniculus</i>	Chalmers a kol. 2011
<i>C. ryanae</i>	Waldron a kol. 2011

- **Přenos vodou**

Přenos vodou patří mezi nejčastější způsoby přenosu. Oocysty kryptosporidií byly nalezeny v odpadní, surové, užitkové, povrchové i pitné vodě (Rose 1997, Johnson a kol. 2000). Znečištění pitné vody oocystami kryptosporidií bývá často zapříčiněno silnými dešti a záplavami, které způsobují prosakování odpadních vod (Bridgman a kol. 1995, Yamamoto a kol. 2000). Častým zdrojem nákazy je také voda na koupalištích (Causer a kol. 2006, Jones a kol. 2006). Oocysty jsou velmi odolné proti nepříznivým podmínkám, přežívají dlouhou dobu ve vodě i při nízkých teplotách (Fayer a Nerad 1996).



Velké množství epidemií kryptosporidiózy ukázalo, že filtrace, flokulace, sedimentace a dezinfekce běžně používané pro úpravu pitné vody nejsou zcela účinné. Na základě těchto informací US EPA (US Environmental Protection Agency) vydala nové předpisy pro úpravu pitné vody (Widmer a kol. 1996).

- **Přenos jídlom**

I když nákazy kryptosporidiiemi z jídla patří mezi méně běžné, jsou dokumentovány už od osmdesátých let dvacátého století. Mezi nejčastější zdroje nákazy patří mořské plody, ovoce, zelenina (nejspíše protože mohou přicházet do kontaktu s kontaminovanou vodou a jsou často konzumovány nedostatečně tepelně upravené) a nepasterizované mléčné výrobky (Djuretic a kol. 1997, Dawson 2005, Robertson a kol 2005).

### **3.2.5 Projevy infekce**

Nákazy kryptosporidiiemi byly dokumentovány u imunodeficientních i u imunokompetentních osob. Projevy infekce záleží na druhu kryptosporidie, imunitním stavu hostitele a lokalizaci infekce. U imunodeficientních jedinců má mnohem závažnější průběh, může u nich způsobit chronickou a život ohrožující infekci, dochází rovněž k rozšíření infekce do dalších tkání. Nejčastějším projevem nákazy je silný vodnatý průjem, který může být doprovázen bolestmi břicha, nevolností, zvracením, úbytkem hmotnosti, zvýšenou teplotou, bolestí svalů a celkovou slabostí (Current a Garcia 1991, MacKenzie a kol. 1994, Mathieu a kol. 2004). Méně časté jsou infekce dýchacího traktu (Brady a kol. 1984, Egger a kol. 1990, Clavel 1996). Kryptosporidióza převažuje u HIV pozitivních pacientů, zejména těch s nízkou hladinou CD4+ T-lymfocytů. Častá je také u imunosuprimovaných osob podstupujících chemoterapii, příjemců darovaných orgánů a kostní dřeně, pacientů na hemodialýze a osob vystavených rizikovým sexuálním praktikám (Sreedharan a kol. 1996, Hunter a Nichols 2002, Turcpar a kol. 2002, Tappeh a kol. 2006). Paraziti rodu *Cryptosporidium* jsou rovněž častou příčinou dlouhotrvajícího průjmu u dětí v rozvojových zemích (Dillingham a kol. 2002).

### **3.2.6 Terapie a preventivní opatření**

Na rozdíl od mikrosporidiózy není léčba kryptosporidiózy příliš efektivní. Testovaná léčiva se ukázala v potřebných množstvích pro organismy jako toxická, částečně nebo zcela neúčinná. Mezi nejčastěji používaná léčiva v humánní medicíně patří paromomycin, spiramycin, azithromycin a nitazoxanid a u HIV pozitivních pacientů antiretrovirální léčba. (Griffiths 1998)

Silnostěnné oocysty jsou odolné vůči nepříznivým podmínkám prostředí a jsou schopny se šířit i přetrvávat v chlorované vodě, proto jsou běžné úpravy vody často neúčinné. Pravděpodobně nejspolehlivějším prostředkem jak inaktivovat oocysty kryptosporidií je jejich ozonizace a úprava UV zářením (Korich a kol. 1990, Betancourt a Rose 2004).

### **3.2.7 Kryptosporidie u opic Starého světa**

Spontánní nákazy kryptosporidiami byly popsány u mnoha opic Starého světa (Tabulka 4). Experimentální nákaza byla pozorována u SIV pozitivního makaka rhesus (*Macaca mulatta*) (Kuhn a kol. 1997, Kaup a kol. 1998).

Výskyt kryptosporidiózy u opic je obvykle vyšší než výskyt u jiných divoce žijících placentálů (Feng 2010). Možným vysvětlením je, že většina studií bývá prováděna v národních parcích a přírodních rezervacích, kde je větší populační hustota a opice přichází do styku s dobyt看kem a člověkem.

**Tabulka 4: Spontánní nákazy *Cryptosporidium* u opic Starého světa.**

Druh	Hostitel	Projevy infekce	Reference
<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Varecia variegata rubra</i> <i>Saguinus oedipus</i>	průjem	Heuschele a kol. 1986
	<i>Cercopithecus aethiops</i> <i>Papio anubis</i>	průjem	Muriuki a kol. 1998
	<i>Eulemur macaco</i> <i>Lemur catta</i> <i>Macaca thibetana</i> <i>Mandrillus leucophaeus</i> <i>Hylobates syndactylus</i>	-	Gomez a kol. 2000
	<i>Papio cyanocephalus anubis</i> <i>Cercopithecus aethiops</i>	-	Leggese a Erko 2004
	<i>Papio anubis</i>	-	Hope a kol. 2004
	<i>Macaca mulatta</i> <i>Callithrix penicillata</i>	-	Da Silva a kol. 2008
	<i>Propithecus coquereli</i>	-	Charles-Smith 2010
	<i>Cryptosporidium muris</i>	<i>Macaca fascicularis</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Propithecus coquereli</i>	průjem	Da Silva a kol. 2003
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Macaca sinica</i> <i>Semnopithecus entellus</i> <i>Trachypithecus vetulus</i>	-	Ekanayake a kol. 2007

### 3.2.8 Kryptosporidie u opic Nového světa

Infekce kryptosporidií byla popsána u chápana dlouhosrstého (*Ateles belzebuth*), kosmana bělovousého (*Calithrix jacchus*), outloňe malého (*Nycticebus pygmeus*), chvostana bělolicého (*Pithecia pithecia*), tamarína pinčího (*Saguinus oedipus*) a kotula veverkovitého (*Saimiri sciureus*) (Fayer a Xiao 2007).

### 3.2.9 Kryptosporidie u lidoopů

Nákaza byla popsána u gorily nížinné (*Gorilla gorilla gorilla*), gorily horské (*Gorilla beringei beringei*), orangutana (*Pongo pygmaeus*) a člověka (Nizeyi a kol. 1999, Graczyk a kol. 2002, Fayer a Xiao 2007).

V národním parku Bwindi v Ugandě bylo zaznamenáno, že 11 ze 100 horských goril je nakaženo, přičemž více nakažených goril (73 %) bylo v částech parku obydlených lidmi (Nizeyi a kol. 1999). V témže parku bylo 21 % nakažených členů správy parku oproti 3 % nakažených u místních obyvatel (Nizeyi a kol. 2002), což ukazuje na nákazy spojené s kontaktem mezi gorilami a člověkem.

Pozorovány byly rovněž gorily nížinné v národních parcích Lopé a Moukalaba-Doudou (Langhout a kol. 2010), kde bylo zdokumentováno 19 % nakažených z 84 zvířat.

### 3.3 Přenos infekcí mezi člověkem a ostatními lidoopy

Lidské nemoci zvířecího původu (zoonózy) zahrnují více než 150 druhů infekcí, které mohou být přenášeny mezi člověkem a zvířaty (Muriuki a kol. 1998) (Tabulka 5).

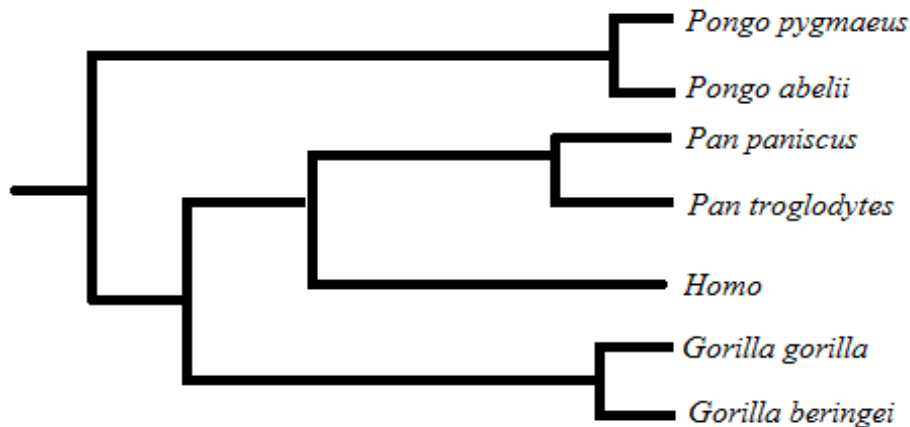
**Tabulka 5: Příklady infekcí přenášných mezi člověkem a ostatními lidoopy (Chapman a kol. 2005, upraveno).**

patogen	způsob přenosu	směr přenosu
Herpes B	kousnutí zvířetem	ostatní lidoopi > člověk
Opičí neštovice	kousnutí zvířetem	ostatní lidoopi > člověk
Poliovirus	fekálně – orální	člověk > ostatní lidoopi
Ebola	lov, porážka zvěře	ostatní lidoopi > člověk
<i>Mycobacterium leprae</i>	nosní sekrety	mezi primáty
Tuberkulóza	kapénková infekce	člověk > ostatní lidoopi
Malárie	vektor	oběma směry
Filárie	vektor	oběma směry
Žlutá zimnice	vektor	oběma směry
Drakunkulóza	voda	člověk > ostatní lidoopi
Schistosomóza	voda	ostatní lidoopi > člověk
SV 40 (Simian virus 40)	vakcinace	ostatní lidoopi > člověk
Gastrointestinální parazitózy	fekálně – orální	oběma směry

Zoonotické infekce se stávají významnými zejména v zemědělských oblastech rozvojových zemí, kde většina lidí žije ve špatných hygienických podmínkách v bezprostředním kontaktu s dobyt看 (Schantz 1991). Díky blízké fylogenetické příbuznosti člověka s ostatními lidoopy je přenos infekcí mezi nimi zvláště pravděpodobný (Obrázek 4). Nejčastěji dochází ke vzniku a přenosu nález na rozhraní

tropických lesů s vysokou diverzitou a zemědělské půdy s vysokou hustotou osídlení a dobytka (Levins a kol. 1994, Wilson a kol. 1994). Přenos nemocí ovlivňuje celá řada faktorů: imunitní a výživový status hostitele, jeho sociální a sexuální chování, stresory, změna klimatu a habitatů, virulence a způsob přenosu patogenu, přítomnost vektorů a dostupnost zdrojů.

**Obrázek 4: Fylogenetická příbuznost žijících zástupců čeledi Hominidae (podle Purvis 1995).**



Významným se stal HIV virus (Human Immunodeficiency Virus), který se vyvinul z blízce příbuzného viru šimpanzů (*Pan troglodytes*) a mangabeje (*Cercocebus atys*) (Hahn a kol. 2000). Fylogenetické analýzy ukazují, že oba viry HIV-1 a HIV-2 jsou blíže příbuzné opičímu viru SIV (Simian immunodeficiency virus) než mezi sebou navzájem (Meyers a kol. 1992, Peeters a kol. 1992). Další závažnou nemocí, kterou sdílí člověk s ostatními primáty, je malárie. Malárie je každoročně zodpovědná až za tři miliony úmrtí a udává se, že každých 40 sekund na ni umírá jedno dítě (Sachs a Malaney 2002). Primáty může infikovat více než 26 druhů plasmodií, přičemž nejčastější původci malárie u člověka (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* a *P. malarie*) jsou často přenášeni mezi různými druhy primátů navzájem (Chapman a kol. 2005). Vedle nich má pro člověka význam i opičí polymavirus SV40 (Simian virus). V roce 1955 v USA došlo ke kontaminaci vakcín proti dětské obrně virem SV40 a touto vakcínou bylo naočkováno několik milionů dětí (při přípravě vakcín byly nejdříve používány kultury buněk pocházející z opičích ledvin).

Přenos infekcí tak může představovat reálné riziko nejen pro člověka, ale i pro ohrožené druhy primátů. Lidé vždy sdíleli habitaty s ostatními primáty, v posledních desetiletích však došlo k jejich radikální a masivní proměně (Chapman a kol. 2001, Wolfe a kol. 2004). Většina primátů dnes žije v člověkem narušených habitatech, složených ze

zemědělské půdy, zlomků lesů a izolovaných chráněných území (Chapman a kol. 2005). K častějšímu přenosu infekcí rovněž přispívá rostoucí lidská populace a záměrná habituace za účelem výzkumu a ekoturismu. Dochází ke stále těsnějšímu a frekventovanějšímu kontaktu lidoopů s člověkem.

Příkladem může být virus eboly, který byl poprvé pozorován v roce 1976 (Johnson a kol. 1977). Od této doby má na svědomí nejen úmrtí několika stovek lidí, ale také desítek tisíc goril a šimpanzů, což v některých regionech vedlo k vymizení celých populací lidoopů (Huijbregts a kol. 2003). Nedávné výzkumy také poukazují na to, že přenos celé řady respiračních onemocnění člověka včetně tuberkulózy, může vážně ohrozit ostatní primáty (Köndgen a kol. 2008, Palacios a kol. 2011).

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 Původ vzorků a charakteristika lokalit

Vzorky trusu lidoopů byly sbírány v letech 2006 až 2010 na 4 lokalitách Centrální Afriky – národních parcích (Dzanga – Ndoki a Volcanoes Virunga) a přírodních rezervacích (Kalinzu a Ugalla) (Obrázek 5). Celkem bylo nasbíráno 727 vzorků pocházejících z lidoopů a 191 vzorků pocházejících z domácích a divokých zvířat. Vzorky byly uchovávány v 96 % alkoholu a následně dopraveny do Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky.

Obrázek 5: Lokality v Centrální Africe.



#### 4.1.1 Národní park Dzanga – Ndoki, Středoafrická republika

Vzorky trusu goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) byly sbírány v části Dzanga (495 km<sup>2</sup>) národního parku Dzanga – Ndoki v listopadu a prosinci v letech 2007 až 2010. Národní park Dzanga – Ndoki, který se nachází v jihozápadním cípu Středoafrické republiky, se vyznačuje bohatou faunou. Má jednu z nejvyšších dokumentovaných hustot goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) (0,60 jedinců/km<sup>2</sup>) a slonů afrických (*Loxodonta Africana cyclotis*) (0,66 jedinců/km<sup>2</sup>) (Blake 2005). Jedná se o přísně chráněné území, dovolující pouze omezený přístup vědcům a turistům (Blom a kol. 2004). Hustota obyvatelstva dosahuje asi 1 osoba/km<sup>2</sup> (Blom a kol. 2001).

Vzorky byly odebírány z okolí lokalit Bai Hokou a Mongambe. Lokalita Bai Hokou byla zkoumána již od roku 1990, kdy byl park Dzanga – Ndoki založen (Popovich a kol.

1997, Goldsmith a kol. 1999, Remis 1997, 1999, 2001, Cipolletta 2004, Klailova a kol. 2010). Od roku 1997 probíhá Primate Habituation Project (PHP) iniciovaný DSPA (Dzanga Sangha Protected Areas), který se snaží o habituaci goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) především za účelem ekoturismu a výzkumu. Pojmem habituace je označován proces navykání na přítomnost člověka. V této oblasti byly zkoumány skupiny goril s odlišnou mírou kontaktu s člověkem – 2 habituované (skupina Makumba a skupina Mayeli), 2 polohabituované (skupiny Finni Makumba a Finni Mayeli) a 8 nehabituovaných skupin.

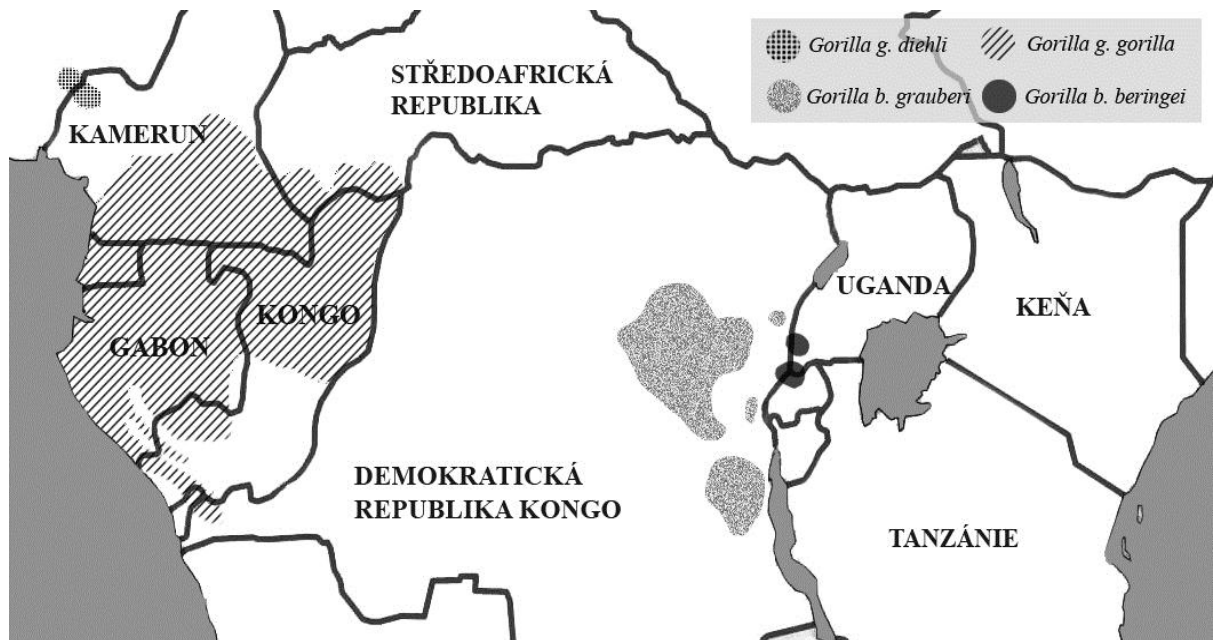
V tropických deštných lesích Středoafričké republiky žije celá řada etnických kmenů. Obyvatelé jsou typicky rozlišováni na dvě skupiny BayAka a non – Aka. BayAka je termín používaný pro etnikum Pygmejů žijících v deštných lesích Centrální africké republiky a severní části Demokratické republiky Kongo. Jedná se polokočovně etnikum lovců a sběračů, kteří se kulturně odlišují od ostatních pygmejských skupin. Vlivem vládních zásahů, ztráty životního prostředí a nových pracovních příležitostí ale došlo k jejich trvalému usídlení v místních vesnicích. BayAka se vyznačují nejen ohromnou znalostí živočichů a rostlin, ale zejména výbornou orientací v prostředí pralesa. Této schopnosti BayAků je využíváno v projektu PHP. Gorily nížinné jsou na rozdíl od goril horských obtížně habitovatelné, bez znalostí a schopností Bayaků by nebylo možné habituace goril dosáhnout.

Pozorované skupiny Makumba a Mayeli byly sledovány od hnízda ke hnízdu týmem sestávajícího se z 2-3 stopařů BayAků, 1-2 asistentů Bantu, turistů nebo výzkumných pracovníků. Byla dodržována minimální vzdálenost 7 metrů od zvířat a počet členů celé skupiny nepřesáhl pět osob. Skupina Mayeli byla sledována pouze týmem Bayaků a místních Bantu. Turisté mohli tuto skupinu pozorovat až od roku 2009, ale počet turistů byl mnohem nižší v porovnání se skupinou Makumba.

Poddruh gorila západní nížinná *Gorilla gorilla gorilla* je jedním ze dvou podruhů gorily západní *Gorilla gorilla* (Sawage a Wyman 1847). Je rozšířena v Kamerunu, Rovnické Guinei, Středoafričké republice, Kongu, Gabonu a Demokratické republice Kongo (Obrázek 6). Tento taxon je od roku 2007 klasifikován jako kriticky ohrožený na seznamu IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources).



**Obrázek 6: Rozšíření goril: gorila nigerijská (*Gorilla gorilla diehli*), gorila západní nížinná (*Gorilla gorilla gorilla*), gorila východní nížinná (*Gorilla beringei grauberi*) a gorila horská (*Gorilla beringei beringei*).**



V letech 2007 až 2010 bylo sbíráno celkem 201 vzorků od goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*), 47 vzorků od lidí (BayAka, Bantu, výzkumných pracovníků a dobrovolníků) a 191 vzorků pocházejících z divokých a domácích zvířat.

#### 4.1.2 Rezervace Ugalla, Tanzánie

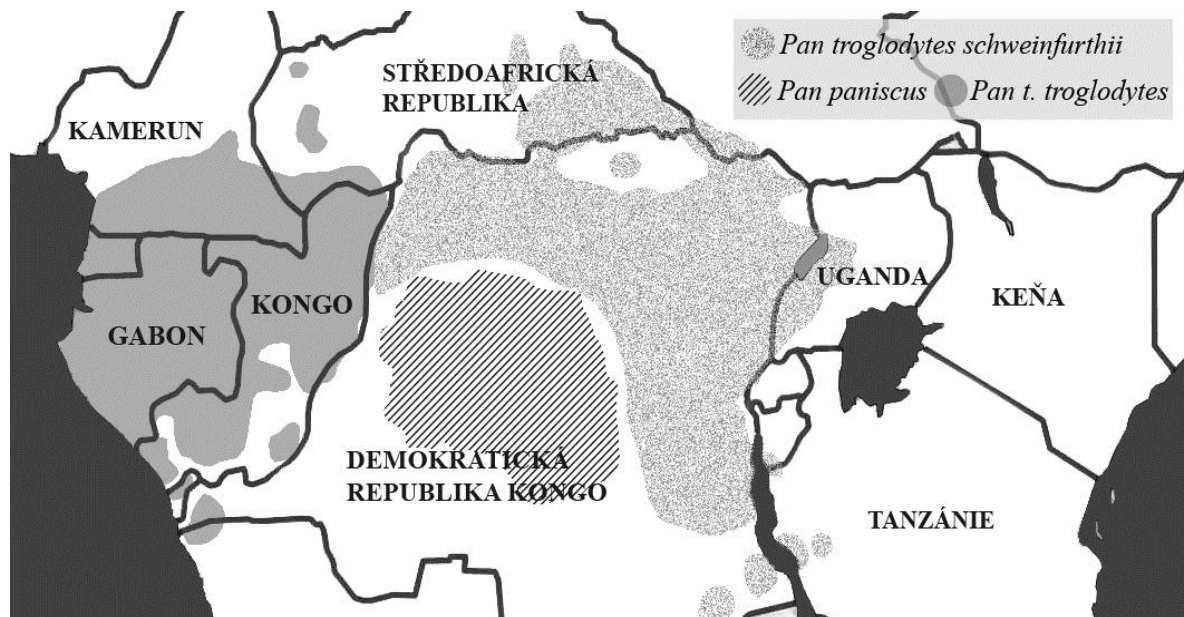
Rezervace Ugalla (3 352 km<sup>2</sup>) leží na břehu jezera Tanganyika v západní Tanzánii a sestává se ze savanových lesů, tropických deštných lesů a travnatých porostů. Dominantními dřevinami jsou *Brachistegia* sp. a *Julbernardia* sp. (*Fabaceae*) (Hernandez-Aguilar 2006). Ugalla nemá žádné trvalé osídlení, ačkoli v šedesátých letech minulého století se zde nacházelo několik vesnic. Avšak krátce poté byli všichni obyvatelé vládou přesídleni. Dnes zde člověk vstupuje zřídka, většinou za účelem sběru medu nebo ilegální těžby dřeva a pytláčení. Odhadovaná hustota šimpanzů (*Pan troglodytes schweinfurthii*) je 0,08 jedinců/km<sup>2</sup> (Hernandez-Aguilar 2006, 2009). Předmětem výzkumu byla zejména část Issa Valley (48 km<sup>2</sup>).

Předchozí výzkumy šimpanzů v oblasti Ugalla se zaměřovaly zejména na jejich ekologii (Nishida 1989, Piel a kol. 2007, Hideshi a kol. 2007, Rudicell a kol. 2011).

Šimpanz východní (*Pan troglodytes schweinfurthii*) je jedním ze čtyř poddruhů šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*) (Giglioli 1872). Je rozšířen ve Sředoafriické

republike, Súdánu, Demokratické republike Kongo, Ugandě, Rwandě, Burundě, Tanzánii a Zambii (Obrázek 7). Tento taxon je od roku 2007 klasifikován jako ohrožený na seznamu IUCN.

**Obrázek 7: Rozšíření šimpanzů: šimpanz učenlivý: šimpanz východní (*Pan troglodytes schweinfurthii*) a šimpanz čego (*Pan troglodytes troglodytes*), šimpanz bonobo (*Pan paniscus*).**



V roce 2009 bylo sbíráno 96 vzorků pocházejících od šimpanzů učenlivých (*Pan troglodytes schweinfurthii*).

#### 4.1.3 Národní park Volcanoes Virunga, Rwanda

Národní park Virunga (450 km<sup>2</sup>) se rozkládá na rozhraní států Rwanda, Keňa a Demokratická republika Kongo. Byl založen roku 1925 a od roku 1979 je součástí světového dědictví UNESCO. Díky proměnlivé nadmořské výšce (680-5 109 m. n. m.) se park vyznačuje obrovskou diverzitou a celou řadou endemických druhů. Je také domovem 22 druhů primátů včetně horských goril (*Gorilla beringei beringei*), goril východních nížinných (*Gorilla beringei grauberi*) a šimpanzů východních (*Pan troglodytes schweinfurthii*). Jejich rozšíření je naznačeno na Obrázku 6.

V roce 2007 bylo sbíráno 99 vzorků pocházejících od goril horských (*Gorilla beringei beringei*).

#### **4.1.4 Rezervace Kalinzu, Uganda**

Rezervace Kalinzu (137 km<sup>2</sup>) se nachází v jihozápadní Ugandě a leží ve výšce 1 200 - 1 500 m. n. m. Vyskytuje se zde 6 druhů primátů (Hashimoto 1995).

Byly pozorovány dvě skupiny šimpanzů (*Pan troglodytes schweinfurthii*). Jedna skupina plně habituovaných šimpanzů za účelem výzkumu čítá asi 60 šimpanzů. Druhá skupina, která má asi 20 jedinců, se vyskytuje v blízkosti vesnice a je habituovaná za účelem turismu. Populace šimpanzů byla již v minulosti zkoumána (Furuichi a Hashimoto 2004, Petrášová a kol. 2011).

V letech 2006 a 2007 bylo sbíráno celkem 283 vzorků pocházejících od šimpanzů (*Pan troglodytes schweinfurthii*).

## **4.2 Zpracování vzorků**

### **4.2.1 Izolace DNA**

Extrakce DNA byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitek).

#### **Pracovní postup:**

- 1) Do mikrozkušavky s 200 mg trusu byly přidány skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) a byl připipetován 1 ml Lysis pufu.
- 2) Vzorky byly homogenizovány po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s (v přístroji MP Fast Prep® - 24 Instrument).
- 3) Mikrozkušavky byly inkubovány v termobloku při 95 °C po dobu 10 minut a centrifugovány 1 minutu při 16 000 g.
- 4) Supernatant byl přenesen do zkumavek InviAdsorb-Tube, 15 s vortexován a inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě.
- 5) Následně byla mikrozkušavka centrifugována 3 minuty při 16 000 g.
- 6) Supernatant byl přepipetován do čistých mikrozkušavek a centrifugován 3 minuty při 16 000 g.
- 7) Do čistých mikrozkušavek bylo napipetováno 25 µl Proteinkinázy K a přidáno 400 µl supernatantu. Obsah zkumavek byl krátce vortexován. Obsah mikrozkušavek byl inkubován 10 minut při 70 °C.
- 8) Do zkumavky bylo přidáno 400 µl Binding Buffer P a následně vortexováno.

- 9) Veškerý objem byl přepipetován na kolonu Spin Filter+Tube a byl inkubován při laboratorní teplotě a následně centrifugován 1 minutu při 16 000 g.
- 10) Ze sběrné zkumavky byl vylit veškerý odpad a na kolonu bylo napipetováno 500  $\mu$ l roztoku Wash I a centrifugováno 1 minutu při 16 000 g.
- 11) Odpad byl opět vylit a na kolonu bylo přidáno 800  $\mu$ l roztoku Wash II a centrifugováno 1 minutu při 16 000 g.
- 12) Odpad byl potřetí vylit a mikrozkuavka centrifugována 3 minuty při 16 000 g.
- 13) Kolona byla vložena do čisté mikrozkuavky a bylo na ni napipetováno 200  $\mu$ l roztoku Elution Buffer D, inkubováno 3 minuty při laboratorní teplotě a centrifugováno 1 minutu při 8 000 g.

Vyizolovaná DNA byla skladována při - 20 °C.

#### 4.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci specifického genu malé ribozomální podjednotky SSU rRNA byla použita nested PCR.

##### Chemikálie:

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

Molekulární charakterizace kryptosporidií byla provedena pomocí nested PCR na malé ribozomální podjednotce (cca 830 bp, Xiao a kol. 1999). Molekulární charakterizace mikrosporidií byla provedena pomocí nested PCR na základě sekvencí ITS (cca 320 bp, 390 bp, Buckholt a kol. 2002). Nukleotidové sekvence primerů jsou uvedeny níže. Požadované úseky byly amplifikovány v termocycleru. Celkový objem reakčních směsí byl pro primární i sekundární reakci 20  $\mu$ l (Tabulka 6).

Amplifikační program pro termocycler zahrnoval počáteční denaturaci při 94 °C po dobu 3 minut, 35 cyklů skládajících se z denaturace při 94 °C po dobu 45 s, specifické

nasedací teploty primerů po dobu 45 s (kryptosporidie a *E. bienersi* 55/55 °C a mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* 58/55 °C), extenze při 60 °C po dobu 60 s a závěrečného dosyntetizování řetězce při 72 °C po dobu 10 minut.

Jako pozitivní kontroly byly použity DNA *Cryptosporidium serpentis* vyizolovaná z užovky červené (*Elaphe guttata*) nebo DNA *E. intestinalis* původně izolovaná z AIDS pacienta, a dlouhodobě kultivovaná *in vitro* v laboratoři humánní a klinické protistologie AV ČR nebo DNA *E. bienersi* vyizolovaná z myši domácí (*Mus musculus musculus*).

### **Sety primerů pro molekulární analýzy**

#### ***Cryptosporidium* spp.**

##### **Primární PCR**

SSU F1 5' - TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG - 3'

SSU R1 5' - CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA - 3'

##### **Sekundární PCR**

SSU F2 5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG - 3'

SSU R2 5' - AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A - 3'

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

##### **Primární PCR**

INT580F 5' - TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT - 3'

INT580R 5' - TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG - 3'

##### **Sekundární PCR**

MSP-3 5'- GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G) (C,T)TAT - 3'

MSP-4A 5'- CCA AGC TTA TGC TTA AGT (C,T)(A,C)A A(A,G)G GGT - 3'

#### ***Enterocytozoon bienersi***

##### **Primární PCR**

EBITS3 5' - GGT CAT AGG GAT GAA GAG - 3'

EBITS4 5' - TTC GAG TTC TTT CGC GCT C - 3'

##### **Sekundární PCR**

EBITS1 5' - GCT CTG AAT ATC TAT GGC T - 3'

EBITS2,4 5' - ATC GCC GAC GGA TCC AAG TG - 3'

**Tabulka 6: Reakční směs pro PCR - *Cryptosporidium* spp., *Encephalitozoon* spp. a *Enterocytozoon bieneusi***

Použitý roztok	Primární reakce	Sekundární reakce
deionizovaná H <sub>2</sub> O	12,30 µl	12,10 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,20 µl	1,20 µl
pufr	2,00 µl	2,00 µl
dNTP's 10 mM	0,40 µl	0,40 µl
Forward 10 µM	0,40 µl	0,40 µl
Reverse 10 µM	0,40 µl	0,40 µl
BSA 10 mg/ ml	0,80 µl	-----
Taq 1 U/ µl	0,50 µl	0,50 µl
DNA	2,00 µl	3,00 µl
<b>Celkem</b>	<b>20,00 µl</b>	<b>20,00 µl</b>

#### 4.2.3 Gelová elektroforéza

Velikost DNA fragmentů byla zjišťována pomocí gelové elektroforézy. Byl použit 2% agarózový gel obsahující 0,2 µg/ml ethidium-bromidu. Gel byl vyvíjen při 70 V po dobu asi 60 minut a vizualizován pomocí transiluminátoru při vlnové délce 320 nm.

#### Chemikálie:

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

#### Pracovní postup:

- 1) Agaróza byla smíchána s 1% TAE pufrem a zahřáta v mikrovlnné troubě.
- 2) Baňka byla ochlazená pod tekoucí studenou vodou na teplotu asi 50 °C.
- 3) Do roztoku byly přidány 2 µl ethidium bromidu.
- 4) Roztok byl nalit do nosiče, byl vložen hřeben a gel byl ponechán ztuhnout.
- 5) Následně byl ztuhlý gel vložen do elektroforetického tanku s 1% TAE pufrem a byl z něj vyjmut hřeben.
- 6) Do první vzniklé jamky v gelu bylo napipetováno 5 µl ladderu, do dalších 20 µl PCR produktu.

- 7) Napětí bylo nastaveno na 70 V a po asi 60 minutách došlo k separaci všech fragmentů.
- 8) DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí transiluminátoru a byl pořízen snímek výsledného gelu.

#### **4.2.4 Příprava vzorků na sekvenaci**

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

#### **Pracovní postup:**

- 1) Fragment DNA byl opatrně vyříznut skalpelem z gelu a vložen do čisté mikrozkušavky.
- 2) Do mikrozkušavky bylo připipetováno 400  $\mu$ l QG pufru a inkubováno při 50 °C po dobu 10 minut v termobloku.
- 3) Veškerý objem byl přepipetován na kolonu a centrifugován minutu při 16 000 g.
- 4) Odpad ze sběrné zkumavky byl vylit a opět použit s kolonou.
- 5) Na kolonu bylo přidáno 500  $\mu$ l OQ pufru a centrifugováno 1 minutu při 16 000 g.
- 6) Odpad ze sběrné zkumavky byl vylit a opět použit s kolonou.
- 7) Na kolonu bylo připipetováno 750  $\mu$ l PE pufru, inkubováno 5 minut při laboratorní teplotě a mikrozkušavka centrifugována minutu při 16 000 g.
- 8) Opět byl vylit odpad ze sběrné zkumavky a centrifugováno minutu při 16 000 g.
- 9) Kolona byla přemístěna do nové 1,5 ml mikrozkušavky a bylo přidáno 30  $\mu$ l EB pufru na střed kolony. Po inkubaci 1 minutu při laboratorní teplotě byla DNA extrahována z kolony centrifugací 1 minutu při 16 000 g.

Získaná DNA byla vysušena ve vakuovém evaporizátoru a uskladněna při 4 °C.

#### **4.2.5 Sekvenace**

Vzorky byly sekvenovány pomocí ABI3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Sekvenace byly upraveny pomocí ChromasPro (Technelysium, verze 1.5) a získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank pomocí programu Clustal X (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>, verze 2.0.12) a BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>, verze 7.0.5.3).

#### **4.2.6 Statistické zpracování výsledků**

Data byla zpracována a vyhodocena pomocí programu Epi Info verze 3.5.3. ([www.cdc.gov/epiinfo](http://www.cdc.gov/epiinfo)). Byl použit test StatCalc, 2 × 2 kontingenční tabulka. Dále byl použit program StatSoft, Inc. (2011) STATISTICA, verze 10 ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)), test ANOVA.

#### **4.2.7 Fylogenetická analýza**

Fylogenetická příslušnost byla posouzena pomocí metody Neighbor – Joining (Saitou a Nei 1987), založené na Kimura-2-parametrickém testu (Kimura 1980). Fylogenetické stromy byly vytvořeny pomocí programu TREECON verze 1.3b (Van de Peer a De Wachter 1994). Získané sekvence nukleotidů 18S rRNA *Cryptosporidium* spp., ITS *Encephalitozoon* spp. a *Enterecytozoon bienewisi* byly porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank (Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI)).



## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Prevalence kryptosporidií a mikrosporidií u goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) s odlišnou mírou habituace

Ze zkoumaných 201 vzorků pocházejících z 89 goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) bylo 24 pozitivních na testované parazity. Celková pozorovaná prevalence byla 27 %. Nejčastěji byly detekovány mikrosporidie, a to *Encephalitozoon* spp. u 16 goril a *E. bieneusi* u 8 goril. Kryptosporidie byly detekovány pouze v 1 případě (Tabulka 7). Jeden případ nákazy byl zaznamenán i u jedné z osob skupiny Bantu (Tabulka 8).

Celková prevalence sledovaných parazitů vzrůstala se stupněm habituace goril. Ve skupinách nehabituovaných goril byly pozorovány 2 nákazy (6,5 %), u polohabituovaných skupin 6 nákaz (18,2 %) a u habituovaných skupin 16 nákaz (64 %). Z celkového srovnání vyplývá, že habituované gorily jsou oproti nehabituovaným vystaveny vyššímu riziku infekce (OR=8,86;  $\chi^2=10,17$ ;  $p<0,005$ ). Tyto výsledky ovšem nemusí být průkazné. Pokud v testu zohledníme opakované vzorkování u habituovaných a polohabituovaných skupin, dospějeme k závěru, že mezi jednotlivými skupinami není žádný statistický rozdíl, tedy že zvýšený kontakt lidoopů s člověkem nemá vliv na výši prevalence. ( $\chi^2=3,4185$ ;  $p<0,181$ ).

**Tabulka 7: Mikrosporidie a kryptosporidie u skupin goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) s odlišnou mírou habituace.**

habituace	Skupina	Skupina	Rok	n1	n2	<i>Encephalitozoon</i> spp.	<i>Enterocytozoon</i> <i>bieneusi</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	
nehabituované	Bai Hoku	1	2009	8	8	-	-	-	
		2	2009	7	7	-	-	-	
		3	2009	3	3	-	-	-	
		4	2009	2	2	-	-	-	
		5	2010	3	3	-	1× gorilla 1	-	
		6	2010	6	6	-	-	-	
		7	2010	1	1	-	-	-	
		8	2010	1	1	1× EC II	-	-	
polohabituované	Mongambe	Finni MG	2009	14	14	1× EC I 1× EC II	1× D 1× gorilla 3	-	
			2010	5	5	-	-	-	
	Bai Hoku	Finni BH	2009	24	8	2× EC I	-	-	
			2010	4	4	-	-	-	
			Mayeli <sup>a</sup>	2007	11	11	-	-	-
	habituované	Bai Hoku	Makumba	2007	21	14	2× EC I	-	1× <i>C. bovis</i>
2008				10	10	2× EC I	-	-	
2009				33	11	4× EC I	1× D	-	
2010				13	8	-	1× gorilla 3	-	
			Mayeli <sup>a</sup>	2009	24	11	1× EC I	1× D 1× gorilla 2	-
				2010	11	11	1× EC II	1× gorilla 2	-
<b>celkem</b>				<b>201</b>	<b>89</b>	<b>15</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	

**n1** - počet odebraných vzorků, **n2** - počet jedinců, **a** - stejná skupina zvířat, **EC I** - *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I, **EC II** - *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II, **D** - *Enterocytozoon bieneusi* genotyp D

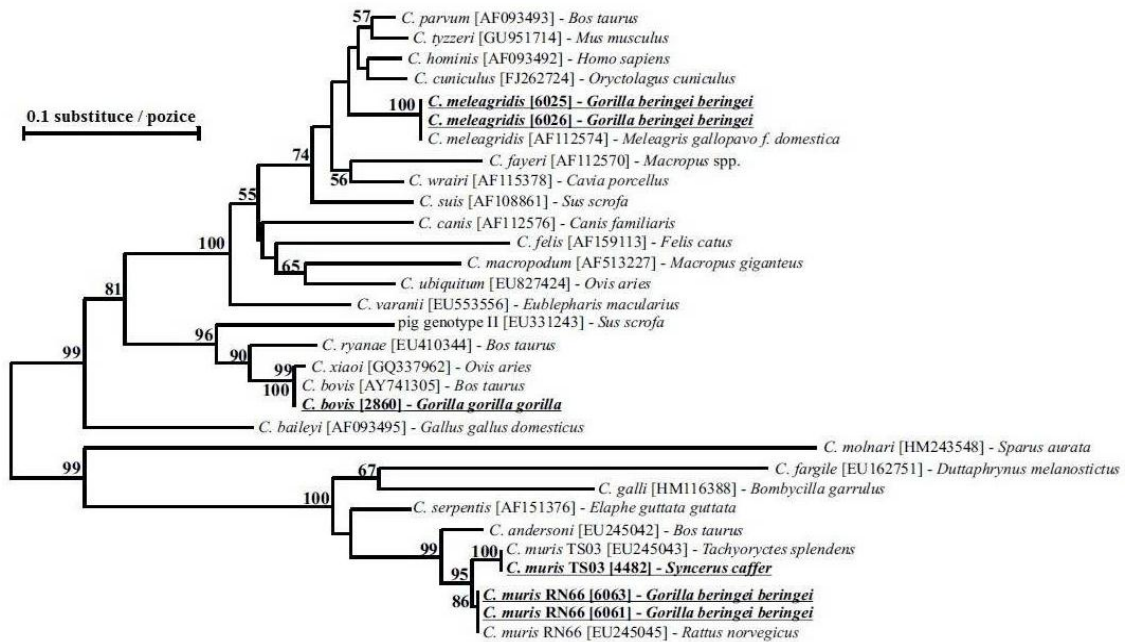
**Tabulka 8: Mikrosporidie a kryptosporidie u člověka.**

	<b>Rok</b>	<b>n1</b>	<b>n2</b>	<i>Encephalitozoon</i> spp.	<i>Enterocytozoon</i> <i>bieneusi</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
výzkumní pracovníci dobrovolníci	2010	9	9	-	-	-
Bantu	2010	20	19	1× EC I	-	-
BayAka	2010	19	19	-	-	-

**n1** - počet odebraných vzorků, **n2** - počet jedinců, **EC I** - *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I

Fylogenetická analýza kryptosporidií byla provedena na základě porovnání sekvencí malé ribozomální podjednotky 18S rRNA (Obrázek 8). Výsledky ukázaly 100 % homologii sekvence získané z plně habituované gorily nížinné (*Gorilla gorilla gorilla*) (izolát 2860) se sekvencí *Cryptosporidium bovis* uvedenou v databázi GenBank (AY741305).

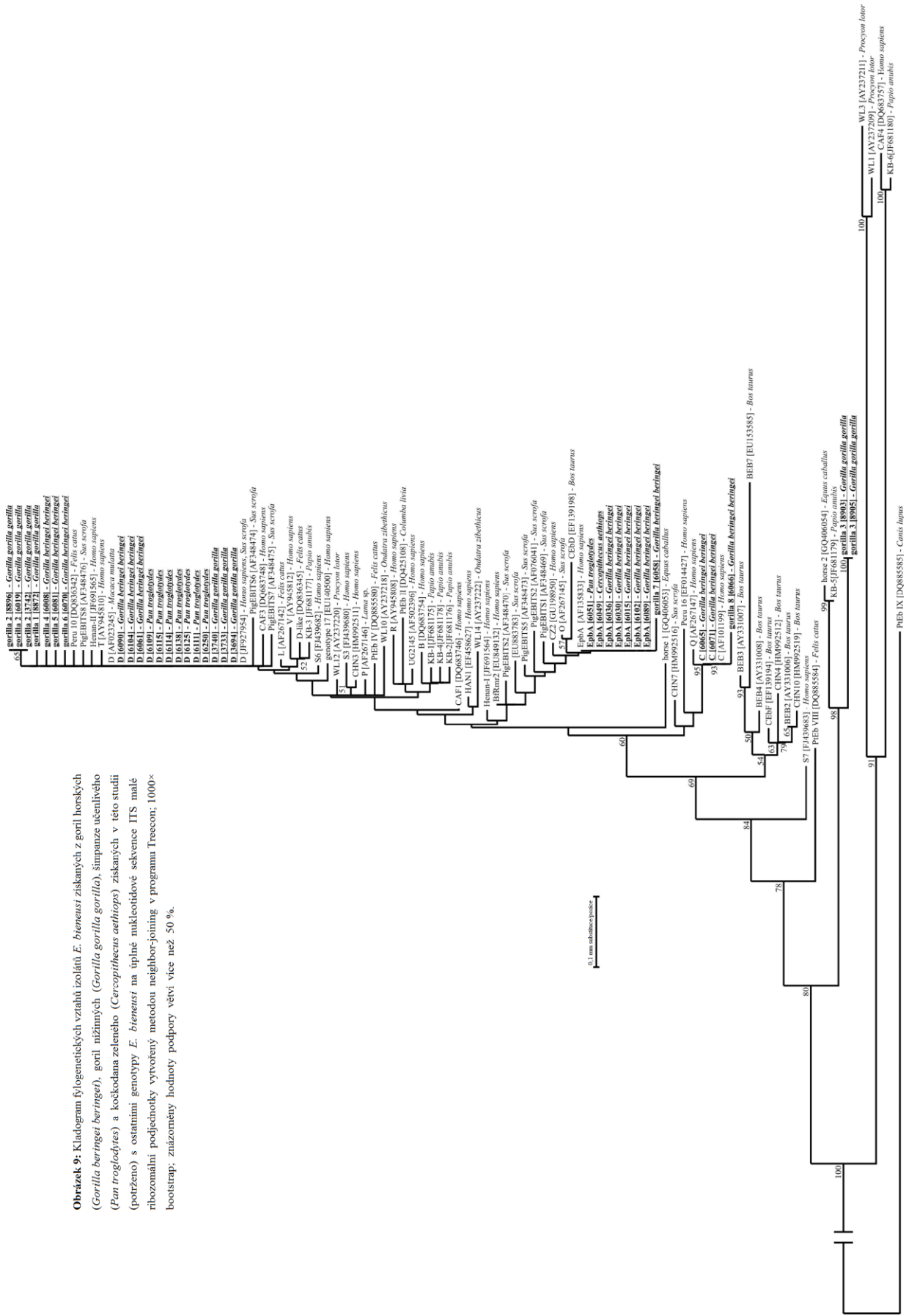
**Obrázek 8:** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií z goril horských (*Gorilla beringei beringei*), goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) a buvola afrického (*Syncerus caffer*), získaných v této studii (podtrženo), s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genů kódujících malou ribozomální podjednotku (SSU), vytvořený metodou neighbor-joining v programu Treecon; 1000× bootstrap; znázorněny hodnoty podpory větví více než 50 %.



Fylogenetická analýza mikrosporidií byla provedena na základě porovnání ITS sekvencí malé ribozomální podjednotky. V rámci rodu *Encephalitozoon* byl ve 13 případech nalezen *E. cuniculi* genotyp I (AF338410) a ve 3 případech *E. cuniculi* genotyp II (GQ422153).

Osm jedinců bylo pozitivních na *Enterocytozoon bieneusi*. Ve třech případech se jednalo o dříve popsány *E. bieneusi* genotyp D (AF101200). Celkem u 5 jedinců byly nalezeny tři nové genotypy: genotyp Gorilla 1, Gorilla 2 a Gorilla 3 (obrázek 9). Genotyp Gorilla 1 byl zjištěn v jednom případě (izolát 8872), genotyp Gorilla 3 ve dvou případech (izoláty 8903, 8905) a Gorilla 2 ve třech případech u gorily nížinné (*Gorilla gorilla gorilla*) (izoláty 8896, 6019, 3742). Fylogenetická analýza ukázala, že genotypy Gorilla 1 a Gorilla 2 jsou shodné z 99,1 % a 99,5 % s genotypem D, jak můžeme vidět na obrázku 9. Genotyp Gorilla 3 tvoří dobře podpořenou větev, která je nejbližší příbuzná ke genotypu KB-5 (93,6 % shoda s JF681179), který byl izolován z paviána anubi (*Papio anubis*) a s genotypem horse 2 (93,2 % shoda s GQ406054) izolovaného z koně (*Equus caballus*).

**Obrázek 9:** Kládogram fylogenetických vztahů izolátů *E. bienersi* získaných z goril horských (*Gorilla beringei beringei*), goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*), šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*) a koskodana zeleného (*Cercopithecus aethiops*) získaných v této studii (potřeno) s ostatními genotypy *E. bienersi* na úplné nukleotidové sekvenci ITS malé ribozomální podjednotky vytvořeny metodou neighbor-joining v programu Treecon; 1000× bootstrap; zřazoměny hodnoty podpory větví více než 50 %.



## 5.2 Prevalence kryptosporidií a mikrosporidií u šimpanzů učenlivých (*Pan troglodytes schweinfurthii*) s odlišnou mírou habituace

Ze zkoumaných 96 vzorků, pocházejících z 67 jedinců nehabituované skupiny šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes schweinfurthii*) na lokalitě Ugalla, nebyl žádný pozitivní na zkoumané skupiny parazitů (Tabulka 9).

Z 283 vzorků, pocházejících ze 43 jedinců habituované skupiny stejného druhu na lokalitě Kalinzu, bylo 10 pozitivních na mikrosporidie. Žádný nebyl pozitivní na kryptosporidie. Celková prevalence sledovaných parazitů byla 15,2 %.

Z mikrosporidií byl nalezen *E. cuniculi* genotyp I u 3 šimpanzů a *E. bieneusi* genotyp D u 7 šimpanzů (izoláty 6109, 6111, 6114, 6115, 6125, 6138 a 6250) (Obrázek 9).

Z celkového srovnání vyplývá, že habituovaní šimpanzi jsou oproti nehabituovaným vystaveni vyššímu riziku infekce (OR=20,3;  $\chi^2=14$ ;  $p<0,001$ ). Ovšem vzhledem k rozdílné povaze podmínek, ve kterých zmíněné dvě skupiny zvířat žijí, nemusí být tento závěr průkazný.

**Tabulka 9: Mikrosporidie a kryptosporidie u šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes schweinfurthii*).**

Lokalita habituace	Rok	n1	n2	<i>Encephalitozoon</i> spp.	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
Ugalla nehabituované	2009	96	67	-	-	-
Kalinzu habituované	2006	50	16	1 × EC I	6 × D	-
	2007	233	41	2 × EC I	1 × D	-
	celkem	283	43			

n1 - počet odebraných vzorků, n2 - počet jedinců, EC I - *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I, EC II - *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II, D - *Enterocytozoon bieneusi* genotyp D

## 5.3 Prevalence kryptosporidií a mikrosporidií u skupiny goril horských (*Gorilla beringei beringei*)

Ze zkoumaných 99 goril horských (*Gorilla beringei beringei*) bylo 20 pozitivních na přítomnost vyšetřovaných parazitů (Tabulka 10). Kryptosporidie byly nalezeny u čtyř jedinců, *E. bieneusi* byl detekován u 15 jedinců. Celková prevalence sledovaných parazitů byla 20,2 %.

Z kryptosporidií byly nalezeny *C. meleagridis* u dvou goril (izoláty 6025 a 6026) (100 % shoda s AF112574) a u dvou dalších jedinců *C. muris* RN 66 (izoláty 6063 a 6061) (100 % shoda s EU245045) (Obrázek 8).

Genotyp EpbA (AF135833), který byl původně nalezen u člověka, byl pozorován u jedné z goril (Obrázek 8). Byl detekován také jemu velmi příbuzný genotyp Gorilla 7 (izolát 6058) (98,7 % shoda s EpbA). U tří různých jedinců byl popsán genotyp Gorilla 4 (izolát 6008), Gorilla 5 (izolát 6081) a Gorilla 6 (izolát 6070), které jsou shodné z 99,1%, 95,8% a 95,5% s genotypem D, popsáným původně u makaka (*Macaca mulatta*). U jedné z goril byl také nalezen genotyp Gorilla 8 (izolát 6066), který se z 99,1 % shoduje s genotypem C (AF101199), nalezeným dříve u člověka. U dalších tří goril byl nalezen genotyp D (AF023245) a u dvou genotyp C (AF101199).

**Tabulka 10: Mikrosporidie a kryptosporidie u goril horských (*Gorilla beringei beringei*).**

	Rok	n1	n2	<i>Encephalitozoon</i> spp.	<i>Enterocytozoon bienersi</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
habituované	2007	99	99	-	1× Gorilla 4, 6× EbpA, 2× C, 1× Gorilla 7, 3× D, 1× Gorilla 5, 1× Gorilla 8	2× <i>C. meleagridis</i> , 2× <i>C. muris</i>

D - *Enterocytozoon bienersi* genotyp D, C - *Enterocytozoon bienersi* genotyp C

#### 5.4 Prevalence mikrosporidií a kryptosporidií u divokých a domácích zvířat

Z celkového počtu 175 vyšetřených domácích a divokých zvířat bylo pouze 5 (2,9 %) pozitivních na přítomnost sledovaných parazitů (Tabulka 11). Nejčastěji detekovaný byl *E. cuniculi* genotyp I, po jednom případě nalezený u chocholátky západní (*Cephalophus callipygus*), chocholátky černohřbeté (*Cephalophus dorsalis*) a buvola afrického (*Syncerus caffer*). U dvou jedinců buvolů afrických (*Syncerus caffer*) byl nalezen také *E. cuniculi* genotyp II a *C. muris*. Sekvence kryptosporidie získaná z buvola afrického (*Syncerus caffer*) byla shodná se sekvencí *C. muris* TS03 (EU245043).

**Tabulka 11: Mikrosporidie a kryptosporidie u divokých a domácích zvířat.**

Hostitel	Rok	n	<i>Encephalitozoon</i> spp.	<i>Enterocytozoon</i> <i>bieneusi</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<b>Divoká zvířata</b>					
<i>Loxodonta Africana</i>	2010	52	-	-	-
<i>Potamochoerus porcus</i>	2010	23	-	-	-
<i>Hylochoerus meinertzhageni</i>	2010	2	-	-	-
<i>Cephalophus callipygus</i>	2010	15	1× EC I	-	-
<i>Cephalophus dorsalis</i>	2010	12	1× EC I	-	-
<i>Cephalophus monticola</i>	2010	10	-	-	-
<i>Cephalophus silvicultor</i>	2010	2	-	-	-
<i>Tragelaphus euryceros</i>	2010	6	-	-	-
<i>Syncerus caffer</i>	2010	20	1×EC I 1× EC II	-	1× <i>C. muris</i> TS03
	2008	6	-	-	-
<i>Cercocebus agilis</i>	2009	10	-	-	-
	2010	17	-	-	-
<b>Domácí zvířata</b>					
<i>Ovis ammon</i>	2010	2	-	-	-
<i>Capra aegagrus</i>	2010	9	-	-	-
<i>Sus scrofa</i>	2010	5	-	-	-

EC I - *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I, EC II - *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II

## 5.5 Vliv habituace na prevalenci mikrosporidií a kryptosporidií

Všichni jedinci byli rozděleni do skupin podle stupně habituace nezávisle na druhu (Tabulka 12). U habituovaných jedinců byla zjištěna celková prevalence 37,2 %, u polohabituovaných 23 % a u nehabituovaných 2,3 %. Ze srovnání všech vzorků vyplývá, že habituovaní a polohabituovaní lidoopi jsou oproti nehabituovaným vystaveni většímu riziku infekce (OR=15,03;  $\chi^2=58,18$ ;  $p=0,000$ ).

**Tabulka 12: Přítomnost kryptosporidií a mikrosporidií u různých stupňů habituace.**

Stupeň habituace	počet negativních jedinců	počet pozitivních jedinců
habituovaní	121	45
polohabituovaní	26	6
nehabituovaní	260	6
<b>celkem</b>	<b>407</b>	<b>57</b>



## 6. DISKUZE

### 6.1 Vliv různých úrovní habituace na prevalenci mikrosporidií a kryptosporidií u volně žijících lidoopů

Lidoopi sdílejí nejen značnou část genomu a společné předky, ale také celou řadu infekcí, které mezi nimi mohou být přenášeny (Wolfe a kol. 1998, Chapman a kol. 2005, Köndgen a kol. 2008). Tento přenos může představovat reálné riziko jak pro člověka, tak i pro ostatní hominidy, kteří jsou v současné době klasifikováni jako ohrožené a kriticky ohrožené druhy. Ačkoli mikrosporidie a kryptosporidie patří mezi významné oportunní patogeny, jejich mechanismus přenosu mezi lidoopy nebyl zcela objasněn. Zatímco vliv habituace lidoopů na šíření řady bakteriálních a virových nákaz byl zkoumán v mnoha publikacích, vliv různých úrovní habituace na prevalenci mikrosporidií a kryptosporidií u volně žijících lidoopů byl zkoumán jen okrajově (Feber 2000, Woodford a kol. 2002, Leroy a kol. 2004). Výzkum komplikuje nejen obtížnost proveditelnosti srovnání, ale zejména chybějící metodika vhodného určování prevalence. Mikrosporidie jsou vylučovány intermitentně, tudíž nepřítomnost parazita v trusu při jednom či několika málo odběrech neznamená, že daný jedinec není infikován (Clarridge a kol. 1996). Určování prevalence vyžaduje opakovaný odběr vzorků z téhož jedince v delších časových úsecích, což je u volně žijících lidoopů jen velmi těžko proveditelné. Současně s častějším odebráním vzorků a dalším opakováním vzrůstá pravděpodobnost detekce nákazy u daného jednotlivce (Sak a kol. 2011a). Častější detekce mikrosporidií u habituovaných jedinců může být také způsobena stresem, který na zvířata v těchto podmínkách působí.

Celkové srovnání prevalencí sledovaných parazitů u nehabituovaných, polohabituovaných a plně habituovaných jedinců ukázalo, že habituovaná zvířata oproti nehabituovaným vylučují častěji a ve větší míře infekční stádia mikrosporidií a kryptosporidií. Tyto výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými pracemi různých autorů (Graczyk a kol. 2001, 2002, Nizeyi a kol. 2002, Langhout a kol. 2010).

Nákazy kryptosporidiiemi v souvislosti s habituací byly zkoumány u goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) v národních parcích Lopé a Moukalaba-Doudou (Langhout a kol. 2010). Gorily v Moukalaba-Doudou nebyly na rozdíl od goril v Lopé v kontaktu s člověkem. Celkové prevalence sledovaných parazitů *Cryptosporidium* spp. a *Giardia* spp. byly v Moukalaba-Doudou nižší (0 % a 9,1 %) než v Lopé (19 % a 22,6 %). Právě

možnou příčinou rozdílů v prevalencích je odlišný stupeň habituace goril. V národním parku Bwindi v Ugandě byly naopak popsány prevalence u lidí (Nizeyi a kol. 2002). Tito zaměstnanci parku přicházejí do těsného kontaktu s gorilami horskými (*Gorilla beringei beringei*) a jejich trusem. Srovnávání byli zaměstnanci parku s místními obyvateli, kteří s gorilami do styku nepřicházeli. Výsledky ukázaly jednoznačně vyšší prevalenci *C. parvum* u zaměstnanců parku oproti místním obyvatelům (3% vs. 21%). Možný přenos kryptosporidiové infekce z gorily na člověka nebo naopak v národním parku Bwindi naznačuje také jedna dřívější publikace (Graczyk a kol. 2001).

Nákazy mikrosporidii v souvislosti s habituací byly popsány ve dvou publikacích. Nákaza *E. intestinalis* byla detekována u tří plně habituovaných goril horských (*Gorilla beringei beringei*) a dvou lidí v Ugandě, kteří se s gorilami dostávají do blízkého kontaktu (Graczyk a kol. 2002). Vzhledem k tomu, že se jednalo o stejný genotyp, je pravděpodobné, že došlo k přenosu z člověka na gorily nebo naopak. Celková prevalence nákaz u člověka i goril byla nízká (3% u člověka i goril). V nedávné době byla publikovaná práce, která rovněž naznačuje možný zoonotický přenos mikrosporidií mezi člověkem a ostatními lidoopy (Sak a kol. 2011b). Bylo vyšetřeno 217 lidoopů chovaných v zajetí (*Pan troglodytes*, *Pan paniscus* a *Gorilla gorilla*) ve 13 evropských zoologických zahradách a dvou afrických záchranných stanicích. Současně bylo odebráno i 20 vzorků od členů personálu v záchranné stanici Limbe. Celková prevalence *E. bienersi* a *Encephalitozoon* spp. byla 36,7 % a u lidí byla popsána prevalence 65%. Zajímavým faktem je, že pozorovaná prevalence v zoologických zahradách byla mnohem nižší ve srovnání se záchrannými stanicemi (53,1% vs. 20,2%;  $p < 0,001$ ;  $\chi^2 = 25,55$ ). Vzhledem k tomu, že v obou zařízeních je epidemiologická situace a hygienické standardy obdobné a v obou dochází k velmi těsnému kontaktu zvířat s člověkem, je obtížné rozdíl v prevalencích vysvětlit. Možnou příčinou je rozdíl v klimatu a dalších podmínkách prostředí.

## 6.2 Genetická variabilita

Infekce mikrosporidií a kryptosporidií byly podrobně zkoumány u člověka, v mnohem menší míře však u ostatních lidoopů. Z mikrosporidií byl u goril a šimpanzů detekován *Encephalitozoon hellem*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis* a *Encephalitozoon bienersi* (Graczyk a kol. 2002, Sak a kol. 2011b). Z kryptosporidií byl u ostatních lidoopů popsán *Cryptosporidium parvum* (Nizeyi a kol. 2002).

U dvou jedinců gorily horské (*Gorilla beringei beringei*) jsme našli *C. meleagridis* a u dvou dalších jedinců *C. muris*. Zatímco typickými hostiteli *C. muris* jsou hlodavci, *C. meleagridis* je druh, který se typicky vyskytuje u ptáků (Lindsay a kol. 1991, Xiao a kol. 1999, Morgan a kol. 2000). Oba zmíněné druhy byly také popsány jako patogeny napadající člověka (Pedraza-Díaz 2000, Katsumata a kol. 2000). U ostatních lidoopů zatím tyto druhy popsány nebyly. *Cryptosporidium meleagridis* byl pravděpodobně na gorily přenesen z některého z divokých ptáků nebo se jednalo o pasáž zaživacím traktem. Tato možnost však není příliš pravděpodobná vzhledem k tomu, že nákaza byla prokázána nezávisle u dvou různých jedinců stejné skupiny.

U jedné gorily nížinné (*Gorilla gorilla gorilla*) jsme našli *Cryptosporidium bovis*. Tento druh běžně infikuje dobytek a původně byl popsán u tura domácího (*Bos taurus*) (Fayer a kol. 2005). Nabízí se proto vysvětlení, že infekce byla přenesena z buvola afrického (*Syncerus caffer*), kteří jsou v Dzanga Ndoki oblasti sympatričtí s gorilami. Ale v této oblasti byla současně s lidoopy vyšetřována i domácí a divoká zvířata a u žádného z nich nebyl druh *C. bovis* pozorován. *C. bovis* byl ale popsán u dobytka v Nigérii a Zambii jinými autory (Geurden a kol. 2006, Ayinmode a kol. 2010).

U goril horských (*Gorilla beringei beringei*) a goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) jsme našli celkem 8 nových genotypů *Enterocytozoon bieneusi*, které byly pojmenovány Gorilla 1-8. Genotypy Gorilla 1-2 a Gorilla 4-6 jsou velmi podobné zoonotickému genotypu D, který byl nalezen u imunokomprimovaného makaka (*Macaca mulatta*) (Chalifoux a kol. 2000), prasat (Buckholt a kol. 2002), telat (Santin a kol. 2005), koček (Santín a kol. 2006) a osob v Thajsku, Gabonu a Kamerunu (Leelayoova a kol. 2006, Breton a kol. 2007). Genotyp Gorilla 7 je příbuzný genotypu EpbA, který byl popsán u člověka a je běžně nacházený u dobytka (Rinder a kol. 2000, Dengjel a kol. 2001) a genotyp Gorilla 8 byl podobný genotypu C, který byl rovněž pozorován u člověka (Ligoury a kol. 1998). Genotyp Gorilla 3, pozorovaný u gorily horské, se jen málo liší od genotypu KB-5, který byl poprvé zaznamenán u paviána (Li a kol. 2011).

## 7. ZÁVĚR

- 1) Bylo popsáno 8 nových genotypů *Enterocytozoon bieneusi* Gorilla 1-Gorilla 8.
- 2) U goril horských (*Gorilla beringei beringei*) byla nově popsána infekce druhů *Cryptosporidium muris* a *Cryptosporidium meleagridis*, které patří mezi druhy infekční pro člověka.
- 3) U goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) byla detekována infekce druhem *Cryptosporidium bovis*.
- 4) Celkové srovnání prevalencí sledovaných parazitů u nehabituovaných a habituovaných jedinců naznačuje, že habituovaná zvířata oproti nehabituovaným vylučují spory mikrosporidií s vyšší pravděpodobností a jsou častěji infikovány kryptosporidii, což nasvědčuje tomu, že habituace má vliv na prevalenci těchto parazitů. Potvrzení tohoto závěru však vyžaduje další výzkum.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adamu H., Petrosa B., Hailub A., Petryc F. 2010.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolate. *Acta Tropica*. 115: 77-83.
- Ashton N., Wirasinha P. A. 1973.** Encephalitozoonosis (Nosematosis) of the cornea. *British Journal of Ophthalmology*. 57: 669-674.
- Ayinmode A. B. Olakunle F. B., Xiao L. 2010.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native calves in Nigeria. *Parasitology Research*. 107: 1019-1021.
- Azamu M., Moghaddam D. D., Salehi R., Salehi M. 2007.** The identification of *Cryptosporidium* species in Isfahan, Iran by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene. *Molecular Biology*. 41:851-856.
- Betancourt W. Q., Rose J. B. 2004.** Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology*. 126: 219-234.
- Birthing K., Moore P., Hay P. 1996.** Microsporidia: a new sexually transmissible cause of urethritis. *Genitourin Medicine Journal*. 72: 445.
- Blake S. 2005.** Long term system for monitoring the illegal killing of elephants (MIKE). Central African forests: Final report on population surveys (2003-2004). Wildlife conservation society - USA. 122.
- Blom A., Almasi A., Heitkoning I. M. A., Kpanou J. B., Prins H. H. T. 2001.** A survey of the apes in the Dzanga - Ndoki National Park, Central African Republic: a comparison between the census and survey methods of estimating the gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) and chimpanzee (*Pan troglodytes*) nest group density. *African Journal of Ecology*. 39: 98-105.
- Blom A., Zalinge R., Mbea E., Heitkönig I. M. A., Prins H. H. T. 2004.** Human impact on wildlife populations within a protected Central African forest. *African Journal of Ecology*. 42: 23-31.
- Bornay-Llinares F. J., Da Silva A. J., Moura H. Schwarts D. A., Visvesvara G. S., Pieniazek N. J., Cruz-Lopez A., Hernandez-Jaurequi P., Guerrero J., Enrique F. J. 1998.** Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis*

*(Septata intestinalis)* infection in mammals other than humans. Journal of Infectious Diseases 178: 820-826.

**Brady E., Margolis M. L., Korzeniowski. 1984.** Pulmonary cryptosporidiosis in acquired immune deficiency syndrome. JAMA. 252: 89-90.

**Breton J., Bart-Delabesse E., Biligui S., Carbone A., Seiller X., Okome-Nkoumou M., Nzamba C., Kombila M., Accoceberry I., Thellier M. 2007.** New highly divergent rRNA sequence among biodiverse genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. Journal of Clinical Microbiology. 45: 2580-2589.

**Bridgman S. A., Robertson R. M., Syed Q., Speed N., Andrews N., Hunter P. R. 1995.** Outbreak of cryptosporidiosis associated with a disinfected groundwater supply. Epidemiology and Infection. 115: 555-556.

**Brown R. J. Hinkle D. K., Trevethan W. P., Kupper J. L., McKee A. E. 1973.** Nosematosis in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). Journal of Medical Primatology. 2: 114-123.

**Bryan, R. T., D. A. Schwartz. 1999.** Epidemiology of microsporidiosis. In The microsporidia and microsporidiosis, M. Wittner and L. M. Weiss (Eds.). ASM Press, Washington, D. C. 502-516.

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

**Cali A., Meisler D. M., Lowder C. Y., Lembach R., Ayers L., Takvorian P. M., Rutherford I., Longworth D. L., McMahon J., Bryan R. T. 1991.** Corneal microsporidiosis: characterization and identification. Journal of Protozoology. 38: 215S - 217S.

**Cali A., Kotler D. P., Orenstein J. M. 1993.** *Septata intestinalis* n. g., n. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. The Journal of Eukaryotic Microbiology. 40: 101-112.

**Cali A., Takvorian P. M., Lewin S., Rendel M., Sian C. S., Wittner M., Tanowitz H. B., Keohane E., Weiss L. M. 1998.** *Brachiola vesicularum*, n. g., n. sp., a new

microsporidium associated with AIDS and myositis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 45: 240-251.

**Canning E. U., Hollister W. S. 1992.** Human infections with microsporidia. *Reviews in Medical Microbiology*. 3: 35-42.

**Canning E. U., Refardt D., Vossbrinck C. R., Okamura B., Curry A. 2002.** New diplokaryotic mikrosporidia (Phylum Microsporidia) from fresh water bryozoans (Bryozoa, Phylactolaemata). *European Journal of Protistology*. 38: 247-256.

**Carreno A. R., Martin S. D., Bárta 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. *Parasitology Research*. 85: 899-904.

**Causer L. M., Handzel T., Welch P., Carr M., Culp D., Lucht R., Mudahar K., Robinson D., Neavear E., Fenton S., Rose C., Craig L., Arrowood M., Wahlquist S., Xiao L., Lee Y. M., Mirel L., Levy D., Beach M. J., Poquette G., Dworkin M. S. 2006.** An outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection at an Illinois recreational waterpark. *Epidemiology and Infection*. 134: 147-156.

**Cipolletta C. 2004.** Effects of group dynamics and diet on the ranging patterns of a western gorilla group (*Gorilla gorilla gorilla*) at Bai Hokou, Central African Republic. *American Journal of Primatology*. 64: 193-205.

**Clarridge J. E., Karkhanis S., Rabeneck L., Marino B., Foote L. W. 1996.** Quantitative light microscopic detection of *Enterocytozoon bienersi* in stool specimens: a longitudinal study of human immunodeficiency virus-infected microsporidiosis patients. *Journal of Clinical Mikrobiology*. 34: 520-523.

**Clavel A., Arnal A. C., Sánchez E. C., Cuesta J., Letona S., Amiguet J. A., Castillo F. J., Varea M., Gómez-Lus R. 1996.** Respiratory cryptosporidiosis: case series and review of the literature. *Infection*. 24: 341-346.

**Conteas, C. N., Berlin, O. G., Ash L. R., Pruthi, J. S. 2000.** Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 63: 121-127.

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

**Creplin J. G. H. 1842.** Beschreibung der Psorospermien des Kaulbarsches nebst einigen Bemerkungen über die der Plötze u. a. *Archiv für Naturgeschichte*. Berlin. 8: 61-66.

**Current W. L., García L. S. 1991.** Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology reviews*. 4: 325-358.

**da Silva A. S., Coradini G. P., Gressler L. T., Soares J. F., Lara V. M., Carregaro A. B., Monteiro S. G. 2008.** Occurrence of gastrointestinal protozoa in primates kept in captivity in the Southern region of Brazil. *Ciencia Rural*. 38: 2658-2661.

**Davis R. M., Font R. L., Keisler M. S., Shadduck J. A. 1990.** Corneal microsporidiosis. A case report including ultrastructural observations. *Ophthalmology* 97: 953-957.

**Dawson, D. 2005.** Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology*. 103: 207-227.

**del Aguila C., Rueda C., De la Camara C., Fenoy S. 2001.** Seroprevalence of anti – *Encephalitozoon* antibodies in Spanish immunocompetent subject. *The Journal of Microbiology*. 75-78.

**del Aguila C., Izquierdo F., Navajas R., Pieniazek N. J., Miró G., Alonso A. I., Da Silva A. J., Fenoy S. 2002.** Enterocytozoon bienewisi in animals: rabbits and dogs as new hosts. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46: 8S-9S.

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

**Dengjel B., Zahler M., Hermanns W., Heinritzi K., Spillmann T., Thomschke A., Löscher T., Gothe R., Rinder H. 2001.** Zoonotic potential of *Enterocytozoon bienewisi*. *Journal of Clinical Microbiology*. 12: 4495-4499.



- Deplazes P., Mathis A., Weber R. 2000.** Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contributions to Microbiology*. 6: 236-260.
- Desportes I., Le Charpentier Y., Galian A., Barnard F., Cochand-Priollet B., Lavergne A., Ravisse P., Modigliani R. 1985.** Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bienewisi* n. g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *Journal of Protozoology*. 32: 250-254.
- Didier E. S., Didier J. P., Friedberg D. N., Stenson S. M., Oresteijn J. M., Yee R. W., Tio F. O., Davis R. M., Vossbrinck C., Millichamp N., Shadduck J. A. 1991.** Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratokonjunctivitis. *Journal of Infection Disease*. 163: 617-621.
- Didier E. S., Varner P. W., Didier P. J., Aldras A., Millichamp N. J., Murphey-Corb M., Bohm R., Shadduck J. A. 1994.** Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitologica*. 41: 1-11.
- Didier E. S., Snowden K. F., Shadduck J. A. 1998.** Biology of microsporidian species infecting mammals. *Advances in Parasitology*. 40: 283-320.
- Didier E. S., Didier P. J., Snowden K. F., Shadduck J. A. 2000.** Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection*. 2: 709-720.
- 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. *Veterinary Parasitology*. 126: 145-166.
- Didier E. S. 2005.** Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in human and animals. *Acta Tropica*. 94: 61-76.
- Dillingham R. A., Lima A. A., Guerrant R. L. 2002.** Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*. 4: 1059-1066.
- Djuretic T., Wall P. G., Nichols G. 1997.** General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. *Communicable Disease Report*. 7: 41-45.

- Dowd S. E., Gerba C. P., Pepper, I. L., 1998.** Confirmation of the human-pathogenic microsporidia, *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3332-3335.
- Dubey J. P., Markovits J. E., Killary K. A. 2002.** *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Veterinary Pathology*. 39: 363-371.
- Dunn A. M., Terry R. S., Smith J. E. 2001.** Transovarial transmission in the Microsporidia. *Advances in Parasitology*. 48: 57-101.
- DuPont H. L., Chappell C. L., Sterling C. R., Okhuysen P. C., Rose J. B., Jakubowski W. 2011.** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *The New England Journal of Medicine*. 332: 855-859.
- Egger M., Mausezahl D., Odermatt P., Marti H. P., Tanner M. 1990.** Symptoms and transmission of intestinal cryptosporidiosis. *Archives of Disease in Childhood*. 65: 445-447.
- Ekanayake D. K., Welch D. M., Kieft R., Hajduk S., Dittus W. P. J. 2007.** Transmission dynamics of *Cryptosporidium* infection in a natural population of non-human primates at Polonnaruwa, Sri Lanka. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77: 818-822.
- Enriquez F. J., Taren D., Cruz-Lopez A., Muramoto M., Palting J. D., Cruz P., 1998.** Prevalence of intestinal encephalitozoonosis in Mexico. *Clinical Infectious Diseases*. 26: 1227-1229.
- Fay J. M. 1989.** Partial completion of a census of the western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla* (Savage and Wyman)) in south-western Central African Republic. *Mammalia*. 53: 203-215.
- Fayer R., Nerad T. 1996.** Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1431-1433.
- Fayer R., Santin M., Trout J. M. 2003.** First detection of microsporidia in dairy calves in North America. *Parasitology Research*. 90: 383-386.

- Fayer R., Santin M., Xiao L. H. 2005.** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology*. 91: 624-629.
- Fayer R., Xiao L. 2007.** *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. CRC Press. 560.
- Fayer R., Santin M., Macarasin D. 2010.** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*. 172: 23-32.
- Feber D. 2000.** Human diseases threaten great apes. *Science*. 289: 1277-1278.
- Feng Y. 2010.** *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Experimental parasitology*. 124: 128-137.
- Feng Y., Zhao X., Chen J., Jin W., Zhou X., Li N., Wang L., Xiao L. 2011.** Occurrence, source, and human infection potential of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in source and tap water in Shanghai, China. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 3609-3616.
- Fokin S. I., Di Guiseppe G., Erra F, Dini F. 2008.** *Euplotespora binucleata* n. gen., n. sp. (protozoa: Microsporidia), a parasite infecting the hypotrichous ciliate *Euplotes woodruffi*, with observations on microsporidian infections in Ciliophora. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 55: 214-228.
- Font R. L., Su G. W., Matoba A. Y. 2003.** Microsporidial stromal keratitis. *Archives of Ophthalmology*. 121: 1045-1047.
- Franzen C., Müller A. 2001.** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection*. 3: 389-400.
- Franzen C. 2008.** Microsporidia: A review of 150 years of research. *The Open Parasitology Journal*. 2: 1-34.
- Furuichi T., Hashimoto C., 2004.** Botanical and topographical factors influencing nesting-site selection by chimpanzees in Kalinzu Forest, Uganda. *International Journal of Primatology*. 25: 755-765.
- Geurden T., Goma F. Y., Siwila J., Phiri I. G., Mwanza A. M., Gabriel S., Claerebout E., Vercruyse J. 2006.** Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. *Veterinary Parasitology*. 138: 217-222.

**Gillespie T. R., Morgan D., Deutsch J. C., Kuhlenschmidt M. S., Salzer J. S., Cameron K., Reed T., Sanz C. 2009.** A Legacy of low-impact logging does not elevate prevalence of potentially pathogenic protozoa in free-ranging gorillas and chimpanzees in the Republic of Congo: Logging and parasitism in African apes. *EcoHealth* 6: 557-564.

**Gluge G. 1838.** Notice sur quelques points d'anatomie pathologique comparée, suivie de quelques observations sur la structure des branchies dans épinoches. *Bulletin des Académie Royale des Sciences*. 5: 771-85.

**Goldsmith M. L., Nkurunungi J. B., Stanford C. B. 1999.** Gorilla behavioral ecology: effects of altitudinal changes on highland/lowland populations. *American Journal of Physical Anthropology*. 28: 137.

**Gómez M. S., Torres J., Gracenea M., Fernandez - Morán J., Gonzales - Morano. 2000.** Further report on *Cryptosporidium* in Barcelona zoo mammals. *Parasitology Research*. 86: 318-323.

**Graczyk T. K., DaSilva A. J., Cranfield M. R., Nizeyi J. B., Kalema G. R., Pieniazek N. J. 2001.** *Cryptosporidium parvum* Genotype 2 infections in free-ranging mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. 87: 368-370.

**Graczyk T. K., Bosco-Nizeyi J., da Silva A. J., Moura I. N. S., Pieniazek N. J., Cranfield M. R., Lindquist H. D. A. 2002.** A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. *Parasitology Research*. 88: 926-931.

**Graczyk T. K., Conn D. B., Lucy F., Minchin D., Lucy F., Minchin D., Tamang L., Moura L. N. S., DaSilva A. J. 2004.** Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitology Research*. 93: 385-391.

**Green L. C., Didier P. J., Bowers L. C., Didier E. S. 2004.** Natural and experimental infection of immunocompromised rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* genotype D. *Microbes and Infection*. 6:996-1002.

- Griffiths J. K. 1998.** Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Advances in Parasitology*. 40: 37-86.
- Gross U. 2003.** Treatment of microsporidiosis including abendazole. *Parasitology Research*. 90: 14-18.
- Guscetti F., Mathis A., Hatt J. M., Deplazes P. 2003.** Overt fatal and chronic subclinical *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis in a colony of captive emperor tamarins (*Saguinus imperator*). *Journal of Medical Primatology*. 32: 111-119.
- Hahn B. H., Shaw G. M., De Cock K. M., Sharp P. M. 2000.** AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 287: 607-614.
- Hannah J., Riordan T. 1988.** Case to case spread of cryptosporidiosis: evidence from a day nursery outbreak. *Public Health*. 102: 539-544.
- Haro M., Izquiero F., Henriques-Gil N., Alonso A. F., Fenoy S., del Aquila C. 2005.** First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 3153-3157.
- Hashimoto C. 1995.** Population census of the chimpanzees in the Kalinzu Forest, Uganda - comparison between methods with nest counts. *Primates* 36: 477- 488.
- Hernandez-Aguilar R. A. 2006.** Ecology and nesting patterns of chimpanzees (*Pan troglodytes*) in Issa, Ugalla, Western Tanzania. Ph.D. Thesis. University of Southern California, Los Angeles.
- Hernandez-Aguilar R. A. 2009.** Chimpanzee nest distribution and site reuse in a dry habitat: implications for early hominin rating. *Journal of Human Evolution*. 57: 350-364.
- Heuschele W. P., Oosterhuis J., Janssen D., Robinson P. T., Ensley P. K., Meier J. E., Olson T., Anderson M. P., Benirschke K. 1986.** Cryptosporidial infections in captive wild animals. *Journal of Wildlife Diseases*. 22: 493-496.
- Hideshi O., Idani G., Moore J., Pintea L., Hernandez-Aguilar A. 2007.** Sleeping parties and nest distribution of chimpanzees in the savanna woodland, Ugalla, Tanzania. *International Journal of Primatology*. 28: 1397-1412.

- Hollister W. S., Canning E. U., Weidner E., Field A. S., Kench J., Marriott D. J. 1996.** Development and ultrastructure of *Trachipleistophora hominis* n. g., n. sp. after *in vitro* isolation from an AIDS patient and inoculation into athymic mice. *Parasitology* 112: 143-154.
- Hope K., Goldsmith M. L., Graczyk T. 2004.** Parasitic health of olive baboons in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Veterinary Parasitology*. 122: 165-170.
- Huijbregts B., De Wachter P. 2003.** Ebola and the decline of gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) and chimpanzee (*Pan troglodytes*) populations in the Minkebe Forest, north-eastern Gabon. *Orynx*. 37: 437-443.
- Hunter P. R., Nichols G. 2002.** Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Review*. 15: 145-154.
- Hutin Y. J., Sombardier M. N., Liguory O., Sarfati C., Derouin F., Modai J., Molina J. M. 1998.** Risk factors for intestinal microsporidiosis in patient with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *Journal of Infection Disease*. 178: 904-907.
- Chalifoux L. V. MacKey J. Carville A., Shvetz D., Lin K. C., Lackner A., Mansfield K. G. 1998.** Ultrastructural morphology of *Enterocytozoon bienersi* in biliary epithelium of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Veterinary Pathology*. 35: 292-296.
- 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*). *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 124: 1480-1484.
- Chalmers R. M., Robinson G., Elwin K., Hadfield S. J., Xiao L., Ryan U., Modha D., Mallaghan C. 2009.** *Cryptosporidium* sp. rabbit genotype, a newly identified human pathogen. 15:829-830.
- Chalmers R. M., Elwin K., Handfield S. J., Robinson G. 2011.** Sporadic human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium cuniculus*, United Kingdom, 2007-2008. *Emerging infectious diseases*. 17: 536-538.

- Chapman C. A., Peres C. A. 2001.** Primate conservation in the new millenium: the role of scientist. *Evolution Antropology*. 10: 16-33.
- Chapman C. A., Gillespie T. R., Goldberg T. L. 2005.** Primates and the ecology of their infectious diseases: How will anthropogetic chase affect host-parasite interactions? *Evolution Anthropology*. 14: 134-144.
- Charles-Smith L. E. Cowen P., Schopler R. 2010.** Environmental and physiological factors contributing to outbreaks of cryptosporidium in Coquerel's sifaka (*Propithecus coquereli*) at the Duke Lemur Center: 1999-2007. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 41: 438-444.
- Cheney S. A., Lafranchi-Tristem N. J., Canning E. U. 2000.** Phylogenetic relationships of *Pleistophora*-like mikrosporidia based on small subunit ribosomal DNA sequences and implications for the source of *Trachiopleistophora hominis* infection. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47: 280-287.
- Childs-Sanford S. E., Garner M. M., Raymond J. T., Didier E. S., Kollias G. V. 2006.** Disseminated microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem* in an Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*). *Journal of Comparative Pathology*. 134: 370-373.
- Chupp G. L., Alroy J., Adelman L. S., Breen J. C. Skolnik P. R. 1993.** Myositis due to *Pleistophora* (Microsporidia) in a patient with AIDS. *Clinical Infectious Diseases*. 16: 15-21.
- Jellison K. L., Lynch A. E., Ziemann J. M. 2009.** Source tracking identifies deer and geese as vectors of human-infectious *Cryptosporidium* genotypes in an urban/suburban watershed. *Environmental science and technology*. 43: 4267-4272.
- Johnson K. M., Webb P. A., Lange J. V., Murphy F. A. 1977.** Isolation and characterisation of a new virus (Ebola virus) causing acute hemorrhagic fever in Zaire. *Lancet*. 1: 569-571.
- Johson D. C., Reynolds K. A., Gerba C. P., Pepper I. L., Rose J. B. 2000.** Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. *Water Science and Technology*. 31: 439-442.

**Jones M., Boccia D., Kealy M., Salkin B., Ferrero A., Nichols G., Stuart J. M. 2006.** *Cryptosporidium* outbreak linked to interactive water feature, U. K.: importance of guidelines. *Eurosurveillance*. 11: 126-128.

**Juan Sallés C., Garner M. M., Didier E. S., Serrato S., Acevedo L. D., Ramos-Vara J. A., Nordhausen R. W., Bowers L. C., Parás A. 2006.** Disseminated encephalitozoonosis in captive, juvenile, cotton-top (*Saguinus oedipus*) and neonatal emperor (*Saguinus imperator*) tamarins in North America. *Veterinary Parasitology*. 43: 438-446.

**Kašičková D., Sak B., Kváč M., Ditrich O. 2007.** 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. *Veterinary Parasitology*. 165: 125-130.

**Katmasuta T., Hosea D., Ranuh I. G., Uga S., Yanagi T., Kohno S. 2000.** Short report: Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *American journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 60: 70-72.

**Kaup F., Mätz-Rensing K., Kuhn E., Hünnerbein P., Stahl-Hennig C., Hunsmann G. 1998.** Gastrointestinal pathology in rhesus monkeys with experimental SIV infection. *Pathobiology*. 66: 159-164.

**Keeling P. J., Luker M. A., Palmer J. D. 2000.** Evidence from  $\beta$  - tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 23-31.

**Keeling P. J., Fast N. M. 2002.** Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review Microbiology*. 56: 93-116.

**Klailova M., Hodgkinson C., Lee P. C. 2010.** Behavioral responses of one western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) group at Bai Hokou, Central African Republic, to tourists, researchers and trackers. *American Journal of Primatology*. 72: 897-906.

**Köndgen S., Kühl H., N'Goran P. K., Walsh P. D., Schenk S., Ernst N., Biek R., Formenty P., Mätz-Rensing K., Schweiger B., Junglen S., Ellerbrok H., Nitsche A., Briese T., Lipkin W. I., Pauli G., Boesch C., Leendertz F. H. 2008.** Pandemic human viruses cause death of endangered great apes. *Current Biology*. 18: 260-264.



- Korich D. G., Mead J. R., Madore M. S., Sinclair N. A., Sterling C. R. 1990.** Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*. 5: 1423-1428.
- Kotler D. P., Oresteijn J. M. 1998.** Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Advances in Parasitology*. 40: 321-349.
- Koudela B., Didier E. S., Rogers L. B., Modrý D., Kučerová S. 1998.** Intestinal microsporidiosis in African skink (*Mabuya perrotetii*). *Folia Parasitologica*. 45: 149-155.
- Kuhn E. M., Mätz-Rensing K., Stahl-Hennig C., Makoschey B., Hunsmann G., Kaup F. J. 1997.** Intestinal manifestations of experimental SIV-infection in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a histological and ultrastructural study.
- Kváč M., Květoňová D., Sak B., Ditrich O. 2009.** *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. *Emerging Infectious Diseases*. 15:982-983.
- Langhout M. Z., Reed P., Fox M. 2010.** Validation of multiple diagnostic techniques to detect *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. in free-ranging western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) and observations on the prevalence of these protozoan infections in two populations in Gabon. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 41: 210-217.
- Ledford D. K., Overman M. D., Gonzalo A., Cali A., Mester W., Lockey R. F. 1985.** Microsporidiosis myositis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of Internal Medicine*. 102: 628-630.
- Leggese M., Erko B. 2004.** Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia. *Acta Tropica*. 90: 231-236.
- Leoni F., Amar C., Nichols G., Pedraza-Díaz S., McLauchin J. 2006.** Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology*. 55: 703-707.
- Leroy E. M., Rouquet P., Formenty P., Souquière S., Kilbourne A., Froment J. M., Bermejo M., Smit S., Karesh W., Swanepoel R., Zaki S. R., Rollin P. E. 2004.** Multiple ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science*. 303: 387-390.

- Levins R., Awerbuch T., Binkmann U., Eckardt I., Epstein P., Makhoul N., de Possas C. A., Puccia Ch., Spielman A., Wilson M. E. 1994.** The emergence of new diseases. *American Scientist*. 82: 52-60.
- Li W., Kiulia N. M., Mwenda J. M., Nyachio A., Taylor M. B., Zhang X., Xiao L. 2011.** *Cyclospora papionis*, *Cryptosporidium hominis* and human - pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* in captive baboons in Kenya. *Journal of Clinical Microbiology*. 12: 4326-4329.
- Lindsay D. S., Blagburn B. L., Hoerr F. J., Smith P. C. 1991.** Cryptosporidiosis in zoo and pet birds. *Journal of Protozoology*. 38: 180-181.
- Lom J., Nilsen F. 2003.** Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *International Journal for Parasitology*. 33: 107-127.
- Lopez-Velez R., Turrientes M. C., Garron C., Montilla P., Navajas R., Fenoy S., del Aguila C. 1999.** Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *Journal of Travel Medicine*. 6: 223-237.
- Lores B., Lopez-Miragaya I., Arias C., Fenoy S., Torres J., del Aguila C. 2002.** Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo. Spain. *Clinical Infectious Diseases* 34: 918-921.
- MacKenzie W. R., Hoxie N. J., Proctor M. E., Gradus M. S., Blair K. A., Peterson D. E., Kazmierczak J. J., Addiss D. G., Fox K. R., Rose J. B., Davis J. P. 1994.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The new England Journal of Medicine*. 331: 161-167.
- Mahdi N. K., Ali N. H. 2002.** Cryptosporidiosis among animal handlers and their livestock in Basrah, Iraq. *East African Medical Journal*. 79: 550-553.
- Mansfield K. G., Carville A., Shvetz D., Mackey J., Tzipori S., lackner A. A. 1997.** Identification of an *Enterocytozoon bieneusi*-like microsporidian parasite in simian-immunodeficiency-virus-inoculated macaques with hepatobiliary disease. *The American Journal Pathology*. 150: 1395-1405.

- Mansfield K. G., Carville A., Herbert D., L. Chalifoux, Shvetz D., Lin K. C., Tzipori S., Lackner A. A. 1998.** Localization of persistent *Enterocytozoon bieneusi* infection in normal rhesus macaques (*Macaca mulatta*) to the hepatobiliary tree. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 2336-2338.
- Margileth A. M., Strano A. J., Chandra R., Neafie R., Blum M., McCully R. M. 1973.** Disseminated nosematosis in an immunologically compromised infant. *Archives of Pathology*. 67: 73-79.
- Mathieu E., Levy D. A., Veverka F., Parrish M. K., Sarisky J., Shapiro N., Johnston S., Handzel T., Hightower A., Xiao L., Lee Y. M., York S., Arrowood M., Lee R., Jones J. L. 2004.** Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. *The American Journal of Tropical Medicine*. 71: 582-589.
- Mathis A., Michel M., Kuster H., Muller C., Weber R., Deplazes P. 1997.** Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology*. 114: 29-35.
- Mathis A., Breitenmoser A. C., Deplazes P. 1999.** Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal sample of farm dogs and a cat. *Parasitology*. 6: 189-193.
- Mathis A. 2000.** Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *International Journal of Parasitology*. 30:795-804.
- Mathis A., Weber R., Deplazes P. 2005.** Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*. 18: 423-445.
- Matsubayashi H., Koide T., Mikata T., Hagiwara S. 1959.** A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Archives of Pathology*. 67: 181.
- 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.
- Mertens R. B., Didier E. S., Fishbein M. C., Bertucci D., 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. *Modern Pathology*. 10: 68-77.

**Meyers W. M., MacInnes K., Korber B. 1992.** The emergence of simian/human immunodeficiency viruses. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 8: 373-86.

**Morgan U. M., Xiao L., Limor J., Gelis S., Raidal S. R., Fayer R., Lal A., Elliot A., Thompson R. C. 2000.** *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). *Australian Veterinary Journal*. 78: 182-183.

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

**Morris D. J., Terry R. S., Ferguson K. B., Smith J. E., Adams A. 2005.** Ultrastructural and molecular characterization of *Bacillidium vesiculiformis* n. sp. (Microspora: Mrazekiidae) in the freshwater oligochaete *Nais simplex* (Oligochaeta: Naididae). *Parasitology*. 130: 31-40.

**Morse T. D., Nichols R. A., Grimason A. M., Campbell B. M., Tembo K. C., Smith H. V. 2007.** Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiology and Infection*. 135: 1307-1315.

**Müller A., Bialek R., Kamper A., Fatkenheuer G., Salzberger B., Franzen C. 2001.** Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 39:1630-1632.

**Müller J. 1841.** Über eine eigentümliche krankhafte parasitische Bildung mit spezifisch organisierten Samenkörperchen. *Bericht der Preußischen Akademie der Wissenschaft*: 246-250.

**Müller M. 1997.** What are the microsporidia? *Parasitology Today*. 13: 455-456.

**Mungthin M., Suwannasaeng R., Naaglor T., Areekul W., Leelayoova S. 2001.** Asymptomatic intestinal microsporidiosis in Thai orphans and child-care workers. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 95: 304-306.

**Muriuki S. M. K., Murugu R. K., Munene E., Karere G. M., Chai D. C. 1998.** Some gastro-intestinal parasites of zoonotic (public health) importance commonly observed in old world non-human primates in Kenya. *Acta Tropica*. 71: 73-81.

**Murphy T. M., Walochnik J., Hassl A., Moriarty J., Mooney J., Toolan D., Sanchez-Miguel C., O'Loughlin A., McAuliffe A. 2006.** Study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* and molecular evidence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infections in red foxes (*Vulpes vulpes*) in rural Ireland. *Veterinary Parasitology*. 146: 227-234.

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

**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.

**Nimmo J. S., Snowden K., O'Dongue P. 2007.** Fatal encephalitozoonosis in two koalas. *Australian Environmental Journal*. 85: 428-432.

**Nishida T. 1989.** A note on the chimpanzee ecology of the Ugalla Area, Tanzania. *Primates*. 30: 129-138.

**Nizeyi J. B., Mwebe R., Nanteza A., Cranfield M. R., Kalema G. R. N. N., Graczyk T. K. 1999.** *Cryptosporidium sp.* and *Giardia sp.* infections in mountain Gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *The Journal of Parasitology*. 85: 1084-1088.

**Nizeyi J. B., Sebunya D., Cranfield M. R., Cranfield M. R., Pieniazek N. J., Graczyk T. K. 2002.** Cryptosporidiosis in people sharing habitats with free-ranging mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*), Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 66: 442-444.

**Orenstein J. M., Dietrich D. T., Kotler D. P. 1992.** Systemic dissemination by a newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS. *AIDS (London, England)*. 6: 1143-1150.

- Ortega M. T., Vergara A., Guimbago J., Clavel A., Gavín P., Ruíz A. 2006.** Brote de diarrea y transmisión de *Cryptosporidium hominis* asociados al uso de pañal en niños. *Medicina Clínica*. 127: 653-656.
- Palacios G., Lowenstine L. J., Cranfield M. R., Gilardi K. V., Spelman L., Lukasik-Braum M., Kinani J. F., Mudakikwa A., Nyirakaragire E., Bussetti A. V., Savji N., Hutchison S., Egholm M., Lipkin W. I. 2011.** Human metapneumovirus infection in wild mountain gorillas, Rwanda. *Emerging Infectious Diseases*. 17: 711-713.
- Palmer C. J., Xiao L., Terashima A., Guerra H., Gotuzzo E., Saldias G., Bonilla J. A., Zhou L., Lindquist A., Upton S. J. 2003.** *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Peru. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 1174-1176.
- Pedersen C., Danner S., Lazzarin A., Glauser M. P., Weber R., Katlama C., Barton S. E., Lundgren J. D. 1996.** Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients. *Genitourinary Medicine*. 72: 128-131.
- Pedraza-Díaz S., Amar C., McLaughlin J. 2000.** The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiology Letters*. 189: 189-194.
- Peeters M., Fransen K., Delaporte E., Haesevelde M., Gershy-Damet G. M., Kestens L. 1992.** Isolation and characterization of a new chimpanzee antiviral (simian immunodeficiency virus isolate) from a wild-captured chimpanzee. *AIDS*. 6: 447-451.
- Petrášová J., Uzlíková M., Kostka M., Petrželková K. J., Huffman M. A., Modrý D. 2011.** Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania. *International Journal for Parasitology* 41: 1113- 1120.
- Piel A. K., Moore J. M. 2007.** Locating elusive animals: Using a passive acoustic system to study savanna chimpanzees at Ugalla, Western Tanzania. *American Journal of Physical Anthropology*. 44: 189.
- Pinnolis, M., Egbert P. R., Font R. L., Winter F. C. 1981.** Nosematosis of the cornea. *Archives of Ophthalmology*. 99: 1044- 1047.
- Plutzer, J., Karanis, P., 2009.** Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: update. *Veterinary Parasitology*. 165: 187- 199.

- Pomajbíková K., Petrželková K., Křížek J., Tokiwa T., Imai S., Šlapeta J. R., Modrý D. 2009.** The occurrence of *Troglodytella abrossarti* (Brumpt and Joyeux, 1912) in captive gorillas: morphological and molecular proof and evidence for ape to ape transmission. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 56: 83-87.
- Popovich D. G., Jenkins D. J. A., Kendall C. W. C., Dierenfeld E. S., Carroll R. W., Tariq N., Vidgen E. 1997.** The western lowland gorilla diet has implications for the health of humans and other hominoids. *The Journal of Nutrition*. 27: 2000-2005.
- Pourrut X., Sarfati C., Liguory O., Moyou-Somo R., Derouin F. 2002.** Search for *Enterocytozoon bieneusi* infection in wild monkeys in Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 96: 56- 57.
- Preiser G., Preiser L., Madeo L. 2003.** An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. *Veterinary record*. 51: 213- 215.
- Profousová I., Modrý D., Hashimoto C., 2007.** Parasites of chimpanzees in Kalinzu Forest Reserve, Uganda, with emphasis on comensal protozoans. *Proceedings of 2nd Congress of the European Federation for Primatology, Prague, Czech Republic, 3<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> September 2007.*
- Purvis A. 1995.** A composite estimate of primate phylogeny. *Folia Primatology*. 348: 405-421.
- Rahman A. S., Sanyal S. C., Al Mahmud K. A., Sobhan A. 1985.** *Cryptosporidium* diarrhea in calves and their handlers in Bangladesh. *The Indian Journal of Medical Research*. 82: 510-516.
- Reetz J., Wiedemann M., Aue A., Wittstatt U., Ochs A., Thomschke A., Manke H., Schwebs M., Rinder H. 2004.** Disseminated lethal *Encephalitozoon cuniculi* (genotype III) infections in cotton-top tamarins (*Oedipomidas oedipus*) a case report. *Parasitology International*. 53: 29-34.
- Reetz J., Rinder H., Thomske A., Manke H., Schwebs M., Bruderek A. 2002.** First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *International Journal of Parasitology*. 32:785-787.

- Reif J. S., Wimmer L., Smith J. A., Dargatz D. A., Cheney J. M. 1989.** Human cryptosporidiosis associated with an epizootic in calves. *American Journal of Public Health*. 79: 1528-1530.
- Remis M. J. 1997.** Ranging and grouping patterns of a western lowland gorilla group at Bai Hokou, Central African Republic. *American Journal of Primatology*. 43: 111-133.
- Remis M. J. 1999.** Tree structure and sex differences in arboreality among western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at Bai Hokou, Central African Republic. *Primates*. 40: 383-396.
- Remis M. J., Dierenfeld E. S., Mowry C. B., Carroll R. W. 2001.** Nutritional aspects of western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) diet during seasons of fruit scarcity at Bai Hokou, Central African Republic. *International Journal of Primatology*. 22: 807-836.
- Ribeiro C. D., Palmer S. R. 1985.** Family outbreak of cryptosporidiosis. *British Medical Journal*. 292: 377.
- Rinder H., Thomschke A., Dengjel B., Gothe R., Loschner T., Zahler M. 2000.** Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. *Journal of Parasitology*. 86: 185-188.
- Robertson L. J., Greig J. D., Gjerde B., Fazil, A. 2005.** The potential for acquiring cryptosporidiosis or giardiasis from consumption of mung bean sprouts in Norway, a preliminary step-wise risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*. 98: 291-300.
- Robinson G., Elwin K., Chalmers R. M. 2009.** Unusual Cryptosporidium Genotypes in Human Cases of Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*. 14: 1800-1802.
- Rose J. B. 1997.** Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annual Review of Public Health*. 18: 135-171.
- Rudicell R. S., Piel A. K., Stewart F., Moore D. L., Learn G. H., Li Y., Takehisa J., Pinteá L., Shaw G. M., Moore J., Sharp P. M., Hahn B. H. 2011.** High prevalence of simian immunodeficiency virus infection in a community of savanna chimpanzees. *Journal of Virology*. 85: 9918-9928.



- Sachs J., Malaney P. 2002.** The economic and social burden of malaria. *Nature*. 415: 680-685.
- Saitou N., Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular and Evolution Biology*. 4: 406-425.
- Sak B., Kváč M., Hanzlíková D., Carna V. 2008.** First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*. 153: 3-4.
- Sak B., Kváč M., Kučerová Z., Květoňová D., Saková K. 2011a.** Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals, a longitudinal study. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5: e1162.
- Sak B., Kváč M., Petrželková K., Květoňová D., Pomajbíková K., Mulama M., Kiyang J., Modrý M. 2011b.** Diversity of microsporidia (Fungi: Microsporidia) among captive great apes in European zoos and African sanctuaries: evidence for zoonotic transmission? *Folia Parasitologica*. 58: 81-86.
- Santín M., Trout J. M., Fayer R. 2005.** *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in dairy cattle in the eastern United States. *Parasitology Research*. 97: 535-538.
- Santín M., Trout J. M., Vecino J. A. C., Dubey J. P., Fayer R. 2006.** *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Veterinary Parasitology*. 141: 334-339.
- Santín M., Fayer R. 2011.** Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Research in Veterinary Science*. 90: 363-371.
- Seibold H. R., Fussell E. N. 1969.** Intestinal microsporidiosis in *Callicebus moloch*. *Laboratory Animal Science*. 23: 115-118.
- Sestak K., Aye P. P., Buckholt M., Mansfield K. G., Lackner A. A., Tzipori S. 2003.** Quantitative evaluation of *Enterocytozoon bieneusi* infection in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *Journal of Medical Primatology*. 32: 74-81.
- Shadduck J. A. 1969.** *Nosema cuniculi*: *in vitro* isolation. *Science*. 166: 516-517.
- Shadduck J. A., Pakes S. P. 1971.** Encephalitozoonosis (nosematosis) and toxoplasmosis. *American Journal of Pathology*. 64: 657-671.

- Shadduck J. A., Polley M. B. 1978.** Some factors influencing their *in vitro* infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Protozoology*. 25: 491-496.
- Shadduck J. A., Bendele R., Robinson G. R. 1978.** Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. *Veterinal Pathology*. 15: 449-460.
- Shadduck J. A., Baskin G. 1989.** Serologic evidence of *Encephalitozoon cuniculi* infection in a colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Laboratory Animal Science*. 39: 328-330.
- Shadduck J. A., Greeley E. 1989.** Microsporidia and human infections. *Clinical microbiology reviews*. 2: 158-165.
- Schantz P. M. 1991.** Parasitic zoonic perspectives. *International Journal of Parasitology*. 21: 161-170.
- Schwartz D. A., Bryan R. T., Hewan-Lowe K. O., Visvesvara G. S., Weber R., Cali A, Angritt P. 1992.** Disseminated microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) and acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 116: 660-668.
- Silveira H., Canning E. U. 1995.** *Vittaforma corneae* n. comb. For the human microsporidium *Nosema corneum* Shadduck, Meccoli, Davis & Font, 1990, based on its ultrastructure in the liver of experimentally infected athymic mice. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 42: 158-165.
- Slavin, D. 1955.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Jornal of Comparative Pathology*. 65: 262-270.
- Slifko T. R., Smith H. V., Rose J. B. 2000.** Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal of Parasitology*. 30: 1379-1393.
- Ślodka-wicz-Kowalska A., Graczyk T. K., Tamang L., Girouard A. S., Majewska A. C. 2006a.** Asymptomatic *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in captive mammals. *Parasitology Research*. 100: 505-509.
- Ślodka-wicz-Kowalska A., Graczyk T. K., Tamang L., Jedrzejewski S., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A. S., Majewska A. C. 2006b.** Microsporidian

species known to infect humans are present in aquatic birds: Implications for transmission via water? Applied and Environmental Microbiology. 72: 4540-4544.

**Smith H. V., Rose J. B. 1998.** Waterborne cryptosporidiosis: current status. Parasitology Today 14: 14-22.

**Smith J. E. 2009.** The ecology and evolution of microsporidian parasites. Parasitology. 136: 1901-1914.

**Snowden K. F., Didier E. S., Orestein J. M. Shadduck J. A. 1998.** Animal models of human microsporidial infections. Laboratory Animal Science. 48: 589-592.

**Snowden K. F., Shadduck J. A. 1999.** Microspora of higher vertebrates. In: Wittner M., Weiss L. The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society of Microbiology, Washington, D. C.. 393-419.

**Sprague V. 1974.** *Nosema connori* n. sp., microsporidian parasite of man. American Microscopical Society. 93: 400-403.

**Sprague V., Becnel J. J., Hazard E. I. 1992.** Taxonomy of phylum Microspora. Critical Reviews in Microbiology. 18:285-395.

**Sreedharan A., Jayshree R. S., Sridhar H. 1996.** Cryptosporidiosis among cancer patients: an observation. Journal of Diarrhoeal Diseases Research. 14: 211-213.

**Sulaiman I. M., Fayer R., Yang C. F., Santin M., Matos O., Xiao L. H. 2004.** Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. Parasitology Research. 4: 328-334.

**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. Journal of Clinical Mikrobiology. 48: 2651-2653.

**Tappeh K. H., Gharavi M. J., Makhdoui K., Rahbar M., Taghizadeh A. 2006.** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. Infection in Renal Transplant and Hemodialysis Patients. Iranian Journal of Public Health. 35: 54-57.

- Thurston-Enriquez J. A., Watt P., Dowd S. E. Enriquez R., Pepper I. L. Gerba C. P. 2002.** Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *Journal of Food Protection*. 65: 378-382.
- Troemel E. R., Felix M.-A., Whiteman N. K., Barriere A., Abusel F. M. 2008.** Microsporidia are natural intracellular parasites of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biology*. 6: 2736-2752.
- Tumwine J. K., Kekitiinwa A., Nabukeera N., Akiyoshi D. E., Buckholt M. A., Tzipori S. 2002.** *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhoea attending Mulago Hospital in Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 67: 299-303.
- Turkcapar N., Kutlay S., Nergizoglu G., Atli T., Duman N. 2002.** Prevalence of cryptosporidium infection in hemodialysis patients. *Nephron*. 90: 344-346.
- Tyzzar E. E. 1907.** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 5: 12-13.
- Tyzzar E. E. 1912.** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archives of Protistenkd*. 26: 394-412.
- Tzipori S. 1983.** Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiological reviews*. 135: 84-96.
- Tzipori S., Carville A., Widmer G., Kotler D., Mansfield K., Lackner A. 1997.** Transmission and establishment of a persistent infection of *Enterocytozoon bieneusi*, derived from human with AIDS, in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *Journal of Infectious Diseases*. 175: 1016-1020.
- Valperga S. M., de Jogna Prat S. A., de Valperga G. J., Lazarte S. G., de Trejo A. V., Diaz N., Huttman H. M. 1999.** Microsporidian spores in the stool specimen of toddlers, with and without diarrhoea, from Tucuman. Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 31: 157-164.
- Van Dellen A. F., Steward C. G., Botha W. S. 1989.** Studies of encephalitozoonosis in vervet monkeys (*Cercopithecus pygerythrus*) orally inoculated with spores of

*Encephalitozoon cuniculi* isolated from dogs (*Canis familiaris*). American Journal of Veterinary Research. 56: 1-22.

**Van de Peer Y., De Wachter R. 1994.** TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Computer applications in the Biosciences. 5: 569-570.

**Van Gool T., Vetter J. C., Weinmayr B., Van Dam A., Derouin F., Dankert J. 1997.** High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. Journal of Infectious Diseases. 175: 1020-1024.

**Vávra J., Yachnis A. T., Shadduck J. A., Orenstein J. M. 1998.** Microsporidia of the genus *Trachipleistophora* - causative agents of human microsporidiosis: description of *Trachipleistophora anthropophthera* n. sp. (Protozoa: Microsporidia). Journal of Eukaryotic Microbiology. 45: 273-283.

**Vávra J., Larrison J. I. R. 1999.** Structure of microsporidia in: Wittner M. Weiss L. M. (Eds.), The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 7-84.

**Visvesvara G. S., Belloso M., Moura H., Da Silva A. J., Moura I. N., Leitch G. J., Schwartz D. A., Chevez-Barrios P., Wallace S., Pieniazek N. J., Goosey J. D. 1999.** Isolation of *Nosema algerae* from the cornea of an immunocompetent patient. Journal of Eukaryotic Microbiology. 46: 10.

**Waldron S. L., Cheung-Kwok-Sang C., Power M. L. 2010.** Wildlife-associated *Cryptosporidium fayeri* in Human, Australia. Emerging Infectious Diseases. 16: 2006-2007.

**Waldron L. S., Dimeski B., Beggs P. J., Ferrari B. C., Power M. L. 2011.** Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. Applied and Environmental Microbiology. 77: 7757-7765.

**Wasson K., Peper R. L. 2000.** Mammalian Microsporidiosis. Veterinary Pathology. 37: 113-128.

**Weber R., Bryan R. T., Schwartz D. A., Owen R. L. 1994.** Human microsporidial infections. Clinical Microbiology Reviews. 7: 426-461.

- Weber R., Deplazes P., Schwartz D. 2000.** Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contributions Microbiology*. 6: 166-192.
- Weidner E. 1972.** Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 40: 227-242.
- Weiss L. M. 2001.** Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Topica*. 78: 89-102.
- Wheeler C., Vugia D. J., Thomas G., Beach M. J., Carnes S., Maier T., Gorman J., Xiao L., Arrowood M. J., Gilliss D., Werner S. B. 2007.** Outbreak of cryptosporidiosis at a California waterpark: employee and patron roles and the long road towards prevention. *Epidemiology and Infection*. 135: 302-310.
- Widmer G., Carraway M., Tzipori S. 1996.** Water-borne *Cryptosporidium*: A perspective from the USA. *Parasitology Today* 7: 286-290.
- Wilson M. E. Levins R. Spielman A. 1994.** Disease in evolution: global ganges and emergence of infectious diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 740.
- Wittner M., Weiss L. 1999.** The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society for Microbiology Washington, D. C. 553 pp.
- Wolfe N. D., Escalante A. A., Keresh W. B., Kilbourn A., Spielman A., Lal A. A. 1998.** Wild primate populations in emerging infectious disease research: The missing Link? *Emerging Infectious Diseases*. 18: 260-264.
- Wolfe N. D., Switzer W. M., Carr J. K., Bhullar V. B., Shanmugam V., Tamoufe U., Prosser A. T., Torimiro J. N., Wright A., Mpoudi-Ngole E., McCutchan F. E., Birt D. L., Folks T. M., Burke D. S., Heneine W. 2004.** Naturally acquired simian retrovirus infections in Central Africa hunters. *Lancet*. 363: 932-937.
- Woodford M. H., Butynski T. M., Karesh W. B. 2002.** Habituating the great apes: the disease risk. *Oryx* 36: 153-160.
- Wright J. H., Craighead E. M. 1922.** Infectious motor paralysis in young rabbits. *Journal of Experimental Medicine*. 36: 135-141.

- 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. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3386-3391.
- Xiao L., Bern C., Limor J., Sulaiman I. M., Roberts J., Checkley W., Cabrera L., Gilman R. H., Lal A. A. 2001.** Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases*. 183: 492-497.
- Xiao L., Sulaiman I. M., Ryan U. M., Zhou L., Atwill E. R., Tischler M. L., Zhang X., Fayer R., Lal A. A. 2002.** Host adaptation and host – parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology* 32: 1773-1785.
- Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S. J. 2004.** *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews*. 17: 72-97.
- Xiao L., Feng Y. 2007.** Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 52: 309-323.
- Xiao L., Cama V. A., Cabreta L., Ortega Y., Pearson J., Gilman R. H. 2007.** Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. *Journal of Clinical Microbiology*. 45:2014-2016.
- Yamamoto N., Urabe K., Takaoka M., Nakazawa K., Gotoh A., Haga M., Fuchigami H., Kimata I., Iseki, M. 2000.** Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. *Kansenshogaku Zasshi*. 74: 518-526.
- Zeman D. H., Baskin G. 1985.** Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Veterinary Pathology*. 22: 24-31.