

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Biologie a diverzita kryptosporidií suchozemských želv

Bakalářská práce

Jana Ježková

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

České Budějovice, 2015

Ježková J., (2015): Biologie a diverzita kryptosporidií suchozemských želv [Biology and diversity of tortoise *Cryptosporidium*, Bc. Thesis, in Czech] – 43 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation

The study was focused on biology and diversity of *Cryptosporidium* infecting tortoise from family Testudines. Presence of *Cryptosporidium* oocyst and specific DNA in faecal samples was screened by microscopy and molecular tools. Infection intensity and oocyst morphology was described in both naturally and experimentally infected hosts.

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 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 15. 4. 2015

.....
Jana Ježková

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat zejména svému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za jeho trpělivost, odborné vedení, ochotu a cenné rady. Dále všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i. za jejich cenné rady a ochotu.

Velký dík patří všem chovatelům a lidem, kteří byli ochotni poskytnout biologický materiál, bez kterého by tato práce nemohla být uskutečněna. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za obrovskou podporu při studiu a při psaní této práce.

Práce je součástí programu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem MSMT Kontakt II - LH11061 a GAČR 15-01090S (řešitel doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1	Obecné rozdělení zástupců rodu <i>Cryptosporidium</i>	8
2.2	Historie.....	8
2.3	Vývojový cyklus.....	9
2.4	Hostitelská specifita.....	11
2.5	Patogenita a klinické příznaky.....	11
2.6	Kryptosporidie a kryptosporidióza želv.....	12
2.6.1	Druhy a genotypy kryptosporidií parazitujících u želv.....	13
3	CÍLE PRÁCE	16
4	MATERIÁL A METODIKA	17
4.1	Materiál.....	17
4.1.1	Paraziti.....	17
4.1.2	Zdroj biologického materiálu.....	17
4.1.3	Experimentální zvířata.....	17
4.2	Metody.....	17
4.2.1	Zpracování vzorku.....	17
4.2.2	Purifikace.....	17
4.2.3	Specifické barvení oocyst kryptosporidií.....	19
4.2.4	Hodnocení intenzity infekce.....	21
4.2.5	Izolace DNA.....	21
4.2.6	Genotypizace.....	22
4.2.7	Gelová elektroforéza.....	23
4.2.8	Izolace z gelu.....	24
4.2.9	Sekvenování.....	25
4.2.10	Fylogenetické analýzy.....	25
4.2.11	Design experimentálních prací.....	25
5	VÝSLEDKY	26
5.1	Mikroskopické vyšetření.....	26
5.2	Morfologie oocyst.....	27
5.3	Klinické příznaky.....	28
5.4	Genotypizace.....	28

5.5	Hostitelská specifita	31
6	DISKUSE	32
7	ZÁVĚRY	34
8	LITERATURA.....	35

1 ÚVOD

Kryptosporidie jsou jednobuněční, jednohostitelští, epicelulární paraziti. Vyskytují se v trávicím traktu ryb, obojživelníků, plazů, ptáků, savců a jejich hostitelem může být i člověk (O' Donghue 1995; Ziegler a kol. 2007). Tato práce se zabývá kryptosporidii u suchozemských želv, kterým bylo dosud věnováno velmi málo studií, a proto se o jejich biologii a diverzitě prozatím příliš neví.

Kryptosporidie jsou řazeny do kmene Apicomplexa. Na základě svého vývojového cyklu byly kryptosporidie dříve řazeny mezi kokcidie (Fayer a kol. 1997). Díky molekulárním analýzám byla odhalena bližší příbuznost s gregarinami než s kokcidiemi (Carreno a kol. 1999). Podobnost s gregarinami lze pozorovat i ve stavbě jejich organel, které slouží k přichycení k hostitelské buňce (Valigurová a kol. 2007).

K rozlišování mnoha druhů je nezbytné použití molekulárních metod. Pouze na morfologii oocyst nelze spoléhat. Pro identifikaci se obvykle používá nested PCR za použití specifických primerů pro různé geny (Sulaiman a kol. 1999). U želvích kryptosporidií nebyla morfologie oocyst dosud popsána a to je jedním z cílů této práce. Dalším cílem je pomocí molekulárních metod popsat diverzitu a biologii kryptosporidií suchozemských želv.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Obecné rozdělení zástupců rodu *Cryptosporidium*

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření paraziti, kteří infikují gastrointestinální trakt svých hostitelů. Podle místa infekce lze kryptosporidie rozdělit do dvou monofyletických, morfologicky odlišných linií. První, méně početnou skupinu tvoří žaludeční kryptosporidie infikující epitelální buňky žláznatého žaludku svých hostitelů. Druhá skupina je tvořena střevními kryptosporidii, které infikují tenké a tlusté střevo svého hostitele. Poté mluvíme o střevních nebo žaludečních kryptosporidiiích (Xiao a kol. 2002). U ptáků byla popsána i další místa výskytu jako jsou plíce a lymfatický orgán Fabriciho burza. Kryptosporidie *C. baileyi*, která infikuje tyto orgány je současně lokalizována ve střevě a v kloace (Current a kol. 1986).

Střevní kryptosporidie mají oocysty kulaté a menší. Velikost oocyst se u každého druhu více či méně liší, například *C. parvum* má velikost oocyst $5,00 \times 4,50 \mu\text{m}$ (Tyzzer 1912). Nejmenší oocysty o velikosti $2,94 \times 4,41 \mu\text{m}$ byly popsány u *C. ryanae* (Fayer a kol. 2008).

Žaludeční kryptosporidie jsou oválné a větší než většina střevních kryptosporidii (Kvác a kol. 2013). Velikost oocyst *C. andersoni* je $7,40 \times 5,50 \mu\text{m}$ (Lindsay a kol. 2000), *C. muris* jsou velké $7,75 \times 5,55 \mu\text{m}$ (Katsumata a kol. 2000) a velikost *C. galli* je udávána $8,25 \times 6,30 \mu\text{m}$ (Ryan a kol. 2003).

2.2 Historie

Již z roku 1907 pochází první zmínka o kryptosporidiiích. V žláznaté části žaludku myši byl nalezen druh pojmenovaný *Cryptosporidium muris* a detailně byl popsán v roce 1910 (Tyzzer 1910). Dalším popsáným druhem, nalezeným v tenkém střevě, bylo *C. parvum* (Tyzzer 1912). Následně byla popsána řada dalších střevních i žaludečních druhů. V současné době je všeobecně uznáváno 27 druhů kryptosporidii (Ryan a kol. 2015). Výčet platných druhů je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*.

Druh	Reference	Hostitel	Lokalizace
<i>C. andersoni</i>	Lindsay a kol. 2000	skot	slez
<i>C. baileyi</i>	Current a kol. 1986	drůbež	bursa Fabricii
<i>C. bovis</i>	Fayer a kol. 2005	skot	tenké střevo
<i>C. canis</i>	Fayer a kol. 2001	psi	tenké střevo
<i>C. cuniculus</i>	Robinson a kol. 2010	králík	střevo
<i>C. erinacei</i>	Kváč a kol. 2014	ježek	střevo
<i>C. fayeri</i>	Ryan a kol. 2008	klokani	střevo
<i>C. felis</i>	Iseki 1989	kočky	tenké střevo
<i>C. fragile</i>	Jirků a kol. 2008	obojživelníci	žaludek
<i>C. galli</i>	Ryan a kol. 2003	ptáci	žláznatý žaludek
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan a kol. 2002	člověk	tenké střevo
<i>C. huwi</i>	Ryan a kol. 2015	ryby	žaludek
<i>C. macropodum</i>	Power a Ryan 2008	klokani	střevo
<i>C. meleagridis</i>	Sréter a kol. 2000	krocan	tenké střevo
<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero a Sitjá-Bobadilla 2002	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. muris</i>	Tyzzzer 1910	hlodavci	žaludek
<i>C. parvum</i>	Tyzzzer 1912	savci	tenké střevo
<i>C. ryanae</i>	Fayer a kol. 2008	skot	střevo
<i>C. scrofarum</i>	Kváč a kol. 2013	prasata	střevo
<i>C. serpentis</i>	Levine 1980	plazi	žaludek
<i>C. suis</i>	Ryan a kol. 2004	prasata	žaludek, tlusté střevo
<i>C. tyzzeri</i>	Ren a kol. 2012	myš	tenké střevo
<i>C. ubiquitum</i>	Li a kol. 2014	ovce, kozy	střevo
<i>C. varanii</i>	Pavlásek a Ryan 2008	plazi	střevo
<i>C. viatorum</i>	Elwin a kol. 2012	člověk	střevo
<i>C. wrairi</i>	Vetterling a kol. 1971	morčata	tenké střevo
<i>C. xiaoi</i>	Fayer a kol. 2009	ovce	střevo

2.3 Vývojový cyklus

Kryptosporidie jsou jednohostitelské se složitým vývojovým cyklem, který je rozdělován na sexuální a asexuální fázi. Cyklus začíná požitím oocyst. U jednotlivých hostitelů se liší velikost infekční dávky a u některých jedinců velmi malé množství oocyst může způsobit onemocnění (Zambriski a kol. 2013).

Oocysty excystují v trávicím nebo dýchacím traktu, uvolní se čtyři sporozoiti a ti napadají epiteliální buňky (Hijjawi a kol. 2002). Dále dochází k merogonii (asexuální rozmnožování) za vzniku dvou typů merontů (Hijjawi a kol. 2004). U merontů I. typu se merogonie opakuje a meronti obsahují 6–8 merozoitů. Meronti II. typu obsahují pouze 4

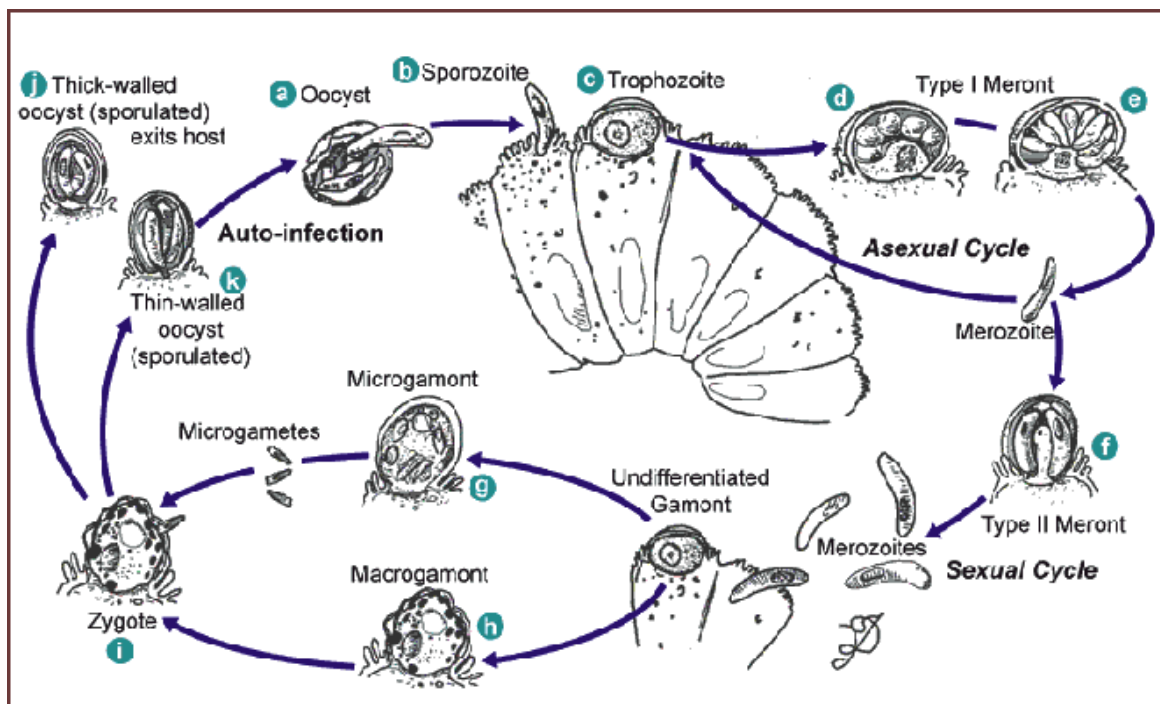
merozoity a ti dávají vzniknout mikrogametocytům a makrogametocytům. Tímto vývojový cyklus přechází dále do sexuální fáze (Sunntel a kol. 2006).

Při gametogonii (pohlavní množení) vznikají gamonti, samčí mikrogamonti a samičí makrogamonti. Dále dochází ke vzniku mikrogamet a makrogamet a po následném oplození dochází ke vzniku zygoty (Sunntel a kol. 2006). Zygota podléhá meióze a uvnitř vznikají čtyři sporozoiti (Liu a kol. 2009). U druhu *C. parvum* byl prokázán vznik dvou typů oocyst. Tenkostěnné oocysty, které způsobují autoinfekci a silnostěnné oocysty, které jsou vylučovány společně s trusem do vnějšího prostředí (Sunntel a kol. 2006). Vývojový cyklus je názorně demonstrován na obrázku 1.

Odlišný vývojový cyklus byl popsán u *C. molnari* a *C. huwi* vyskytujících se u kostnatých ryb. Na histologických řezech byly oocysty detekovány uvnitř střevního epitelu nebo žaludeční sliznice. Z toho vyplývá, že část vývojového cyklu probíhá uvnitř epiteliálních buněk (Alvarez-Pellitero a Sitja-Bobadilla 2002; Ryan a kol. 2004).

Kryptosporidie jsou přenášeny fekálně orální cestou. K přenosu může docházet přímým kontaktem, kontaktem s výkaly, vdechnutím a pozřením kontaminované potravy či vody (Fayer a Xiao 2007).

Obrázek 1: Životní cyklus kryptosporidií (Current 1991, upraveno).



2.4 Hostitelská specifita

Za nejméně hostitelsky specifické druhy jsou považovány *C. parvum* a *C. ubiquitum*, kterými byla jak přirozeně, tak experimentálně infikována řada hostitelů včetně člověka. (DuPont a kol. 1995; Fayer 2004, 2010; Li a kol. 2014; Rašková a kol. 2013). Úzká hostitelská specifita je typická pro druhy *C. hominis*, *C. suis*, *C. ryanae*, *C. scrofarum* nebo *C. wairi*. (Kváč a kol. 2013; Morgan-Ryan a kol. 2002) I hostitelsky specifický druh kryptosporidií může vzácně najít vhodné podmínky v nesespecifickém hostiteli. Názorným příkladem byl nález druhově specifického *C. erinacei* (dříve *Cryptosporidium hedgehog genotype*), který byl jedenkrát detekován u imunokompetentního muže (Kváč a kol. 2014).

2.5 Patogenita a klinické příznaky

Onemocnění, které je způsobeno zástupci rodu *Cryptosporidium*, je označováno jako kryptosporidióza. Klinické projevy hostitele závisí na jeho imunitě a na lokalizaci parazita.

Imunokompetentní i imunodeficientní jedinci mohou být postiženi silným vodnatým průjmem, způsobeným střevními kryptosporidii způsobující poškození střevního epitelu (Sterling a kol. 1986). Vodnatý průjem se ale ne vždy musí nutně objevit (Houpte a kol. 2005, Pettoelo-Mantovani a kol. 1995; Turkcapar a kol. 2002). Jako další příznaky kryptosporidiózy jsou popisovány bolesti břicha, zvracení a nechutenství, malátnost, únava, horečka a nadměrné pocení (Fayer 2003; Rašková a kol. 2013; Thompson a kol. 2005).

Délka průběhu nemoci u imunokompetentního člověka je uváděna průměrně 12 dní. Příznaky nemoci může jedinec vykazovat od 3 až do 26 dní. Typické symptomy pro kryptosporidiózu nemusí jedinec vůbec mít, pokud je místem infekce tlusté střevo (Kváč a kol. 2013, 2014; Vítovec a kol. 2006). Bez příznaků probíhá obvykle také onemocnění způsobené žaludečnými kryptosporidii, jen v několika případech bylo popsáno, že u jedinců došlo ke kachexii (Anderson 1987; Pospischil a kol. 1987).

Při akutních příznacích střevní kryptosporidiózy bývá obrovským problémem dehydratace, zapříčiněná silnými průjmy. U jedince dochází k úbytku na váze a především k velké ztrátě živin a tekutin. Střevní epitel je porušen a tím je omezena

absorpce živin (Mason a kol. 1981). Pokud tělo vyčerpá své zásoby živin, zejména minerální látky a bílkoviny, nastává smrt (Thamsborg a kol. 1990a,b).

Chronické onemocnění je problémem imunodeficitních jedinců a je spojováno s rozšiřováním do dalších tělních orgánů, jako například do dýchacího traktu, slinivky nebo močového měchýře (Current a Garcia 1991; Fayer a kol. 1997). Dále se šíří do dalších částí trávicího traktu – jícen, žaludek, duodenum, kolon a rektum. Postihuje i sliznice žlučovýchodů a vývody pankreatu. Průběh infekce a její orgánové rozšíření závisí na míře imunodeficiencie (Flanigan a kol. 1992).

2.6 Kryptosporidie a kryptosporidióza želv

Želvy patří do třídy plazi a jejich zvláštností je, že mají kostěný krunýř, který se dělí na dvě části a to na karapax (hřbetní) a plastron (břišní). Želvy neboli řád Testudines se dělí na dva podřády a ty dále na 14 čeledí (Zych 2006). Rozdělení do jednotlivých podřádů je popsáno v Tabulce 2.

Tabulka 2. Výčet čeledí želv v řádu Testudines.

Řád TESTUDINES	
Podřád PLEURODIRA – skrytohlaví	Podřád CRYPTODIRA - skrytohrdlí
Čeledi	
Chelidae – dlouhokrčkovití	Carettochelyidae – karetovití
Pelomedusidae – terekovití	Cheloniidae – mořské želvy
Podocnemidae – terekovití	Chelydridae – kajmankovití
	Dermatemydidae – dlouhohlávkovití
	Dermochelyidae – kožatkovití
	Bataguridae – batagurovití
	Emydidae – emydovití
	Kinosternidae – klapavkovití
	Platysternidae – hlavcovití
	Testudinidae – suchozemské želvy
	Trionychidae – kožnatkovití

Želvy studované v této práci patří do čeledi Testudinidae. Tato čeleď je rozšířena na všech kontinentech kromě Austrálie a Antarktidy. Většina volně žijících želv je ohrožena z důvodu úbytku jejich vhodného přírodního prostředí. V zajetí se jejich množení poměrně daří, a proto poptávku jsou schopné pokrýt odchovy. Mezi nejznámější rody čeledi Testudinidae patří *Testudo*, *Indotestudo*, *Kinixys*, *Geochelone*, *Gopherus*, *Manouria*, *Malacochersus*, *Psammobates*, *Homopus*, *Pyxis* a *Chersina* (Ferri 2002).

Zajímavostí želv je, že nemají zuby a potravu ukusují pomocí ostrých silných čelistí. V ústní dutině se nachází jazyk a slinné žlázy. Potrava putuje glottisem (štěrbina mezi hlasivkami) a krátkým jícnem do žaludku, dále do tenkého a tlustého střeva. Vylučována je kloakou. Suchozemské želvy jsou zpravidla býložravé, některé druhy nepohrdnou různými červy, nebo hmyzem (Zych 2006).

2.6.1 Druhy a genotypy kryptosporidií parazitujících u želv

Na úvod této kapitoly je důležité vyjasnit používání názvů jednotlivých druhů, respektive genotypů kryptosporidií detekovaných u želv. Dosud byly ve všech studiích týkajících se želvích kryptosporidií pouze dva genotypy kryptosporidií. Jedná se o žaludeční *Cryptosporidium* tortoise genotype I a střevní *Cryptosporidium* tortoise genotype II. Přestože *Cryptosporidium* tortoise genotype II, označovaný dříve také jako *Cryptosporidium* genotype CrIT-20, byl v roce 2010 popsán jako samostatný druh *Cryptosporidium* ducismarci (Traversa 2010), tento druh není vědeckou komunitou uznáván za platný (Ryan a Xiao 2014). Oba výše zmíněné genotypy byly detekovány nejen u želv, ale i u řady dalších plazů. V tabulce 3 je výčet druhů želv a dalších plazů, které měly kryptosporidie, u nichž je známa sekvence malé ribozomální podjednotky (SSU).

Tabulka 3. Seznam hostitelů, u nichž byl molekulárně potvrzen výskyt *Cryptosporidium* tortoise genotype I a *Cryptosporidium* tortoise genotype II.

Genotyp	Hostitel	Citace
tortoise genotype I	<i>Geochelone elegant</i>	Xiao a kol. 2004; Alves a kol. 2005
	<i>Testudo hermanni</i>	Pedraza-Díaz a kol. 2009; Richter a kol. 2012
	<i>Python regius</i>	Pedraza-Díaz a kol. 2009
	<i>Testudo horsfieldi</i>	Griffin a kol. 2010
tortoise genotype II	<i>Testudo marginata</i>	Traversa a kol. 2008
	<i>Python regius</i>	Pedraza-Díaz a kol. 2009
	<i>Chamaeleo calyptratus</i>	Pedraza-Díaz a kol. 2009
	<i>Malacochersus tornieri</i>	Griffin a kol. 2010
	<i>Testudo horsfieldi</i>	Griffin a kol. 2010
	<i>Testudo hermanni</i>	Richter a kol. 2012

Do současné doby bylo publikováno deset studií zaměřených na kryptosporidie a kryptosporidiózu u suchozemských želv. Ve třech studiích byla přítomnost kryptosporidií detekována pouze mikroskopickými metodami a v sedmi byly pro determinaci použity molekulární analýzy. V následujícím textu jsou chronologicky popsány dosavadní poznatky ve studované oblasti.

První záznam o výskytu kryptosporidií u želv pochází z roku 1986, kdy byly vyšetřeny dvě želvy *Geochelone elegans* s příznaky gastritidy. Detekce byla provedena mikroskopicky a vzorky byly barveny auraminem (Heuschele a kol. 1986).

Ve studii provedené roku 1997 ve spojených státech byly nalezeny pozitivní vzorky ze želv *Geochelone radiata*, *Geochelone elegans*, *Indotestudo* sp. a *Geochelone polyphenus*. Vzorky byly vyšetřeny mikroskopicky a pomocí imunofluorescenčního testu (Raphael a kol. 1997).

Jeden z dalších výskytů byl zaznamenán u druhu *Testudo kleinmanni*. Dvě želvy byly léčeny na pneumonii. Po pěti týdnech od začátku léčby obě želvy uhynuly. Poprvé zde byla provedena histologická dokumentace tenkého střeva u želv a IFAT. Oocysty měřily 4,40–6,30 μm (průměr = 5,10 μm ; n = 30) (Graczyk a kol. 1998).

Poprvé v roce 2004 byl u tří želv *Geochelone elegans* pomocí molekulárních metod popsán nový genotyp *Cryptosporidium* tortoise genotype. Tento genotyp byl analyzován pomocí PCR-RFLP a na základě sekvenční analýzy genu kódujícího SSU. Z fylogenetické analýzy vyplynulo, že tento genotyp klastruje mezi žaludeční kryptosporidie (Xiao a kol. 2004). Později byl tento genotyp nazván *Cryptosporidium* tortoise genotype I.

V následujícím roce byl opět u želvy *Geochelone elegans* nalezen *Cryptosporidium* tortoise genotype I. Vzorek z této želvy byl mikroskopicky pozitivní a byla provedena genotypizace genu SSU. Želva byla zabavena na černém trhu v Singapuru, žila ve špatných podmínkách, měla špatný příjem potravy a po dvou týdnech v Zoo zemřela (Alves a kol. 2005).

V roce 2008 byla provedena studie zaměřená na kryptosporidiové infekce u želv chovaných v zajetí, konkrétně *Testudo graeca*, *T. hermanni* a *T. marginata*. Genotypizace kryptosporidií byla provedena na základě SSU a COWP genů. Celkem 6 izolátů vykazovalo 100 % homologii s *C. parvum* (bovinní genotyp). U jedné želvy *Testudo marginata* byl nalezen nový genotyp *Cryptosporidium* sp. označovaný jako CrIT-20 – *Cryptosporidium* tortoise genotype II. Celkem 38 % sledovaných želv vykazovalo

symptomy jako je průjem a nechutenství, nicméně nebyla zjištěna žádná korelace mezi těmito příznaky a kryptosporidiovými infekcemi (Traversa a kol. 2008).

V roce 2009 byl detekován *Cryptosporidium* tortoise genotype I ve dvou želvách *Testudo hermanni* a v jednom hadovi *Royal python* na základě sekvencí genů SSU a HSP70. Želvy v této studii nevykazovaly žádné klinické příznaky kryptosporidiózy (Pedraza-Díaz a kol. 2009).

Ve studii provedené v roce 2010 byla poprvé popsána patologie a lokalizace v zažívacím traktu *Testudo horsfieldi* a *Malacochersus tornieri* přirozeně infikovaných *Cryptosporidium* tortoise genotype I, respektive *Cryptosporidium* tortoise genotype II. Genotypy kryptosporidií byly determinovány na základě sekvencí genu pro SSU. Histologická vyšetření prokázala lokalizaci *Cryptosporidium* tortoise genotype I v žaludku, zatímco *Cryptosporidium* tortoise genotype II ve střevě infikovaných želv. První želva *Testudo horsfieldi* po krátké době letargie a deprese zemřela. Druhá želva *Testudo horsfieldi* vykazovala letargii a byla utracena. Želva *Malacochersus tornieri* byla letargická a krátce před smrtí trpěla edémem hlavy a krku a slabostí předních končetin (Griffin a kol. 2010).

V roce 2012 byla vyšetřena skupina želv druhu *T. hermanni*. U tří jedinců se vyskytoval *Cryptosporidium* tortoise genotype II a v jednom případě *Cryptosporidium* tortoise genotype I. Vzorky byly vyšetřovány metodami ELISA, barvením karbol-fuchsinem (CST) a byla provedena genotypizace (SSU). Vyšetřované želvy v této studii trpěly průjmem a byly léčeny paromomycinem, Lactated Ringer's a imunostimulanty. Zdánlivě všechny želvy byly vyléčeny po dvou týdnech. Byla provedena kontrola pomocí CST, EIA a PCR a pouze jedna želva byla pozitivní na PCR. Devět měsíců po léčbě se u třech želv začal znovu rozvíjet průjem. Vzorky trusu z těchto želv byly negativní na CST, ale u dvou želv byly prokázány kryptosporidie pomocí EIA. Želvy byly znovu léčeny, což vedlo ke zlepšení klinických příznaků všech zvířat (Richter a kol. 2012).

Poslední studie věnovaná želvám pochází z roku 2013. Želvy nebyly vyšetřovány pouze na kryptosporidie, ale i na další gastrointestinální parazity. Kryptosporidie byly detekovány pouze v jednom vzorku (*Testudo hermanni*) z celkového počtu 113 bez bližší genotypizace (Hedley 2013).

3 CÍLE PRÁCE

- Kriticky zpracovat literární rešerši k tématu.
- Pomocí molekulárních metod popsat diverzitu kryptosporidií suchozemských želv.
- Popsat morfologii a morfometrii oocyst nalezených druhů a genotypů.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Paraziti

- *Cryptosporidium* tortoise genotype I
- *Cryptosporidium* tortoise genotype II

4.1.2 Zdroj biologického materiálu

Bylo odebráno 235 vzorků z různých lokalit. Jednalo se o soukromé chovy, zoologické zahrady, zverimexy a drobné chovatele. Vzorky byly skladovány v roztoku dvojchromanu draselného.

4.1.3 Experimentální zvířata

Suchozemská želva (*Testudo horsfieldi*), vodní želvy (*Chinemys reevesii*), laboratorní myš SCID, užovka proužkovaná (*Thamnophis sirtalis*) a zebříčka pestrá (*Taeniopygia guttata*).

4.2 Metody

4.2.1 Zpracování vzorku

Z čerstvě odebraných vzorků trusu, případně ze vzorků skladovaných ve dvojchromanu draselném byla provedena purifikace, barvení a izolace DNA.

4.2.2 Purifikace

Trus s oocystami *Cryptosporidium* tortoise genotype I a *Cryptosporidium* tortoise genotype II (genotypováno – viz kapitoly 4.2.6–4.2.9) byl homogenizován ve třetí misce a přečištěn na sacharózovém gradientu a poté dočištěn pomocí cesium chloridového gradientu.

Sacharózový gradient (Arrowood a Stearling 1987)

Použité chemikálie:

- Sheaterův roztok (259 ml deionizované vody; 405 g cukru; 7,29 g fenolu)
- PBS Tween (1% roztok)
- Pracovní Sheaterovy roztoky
1+2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween)
1+4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

Postup čištění:

1. Trus byl zbaven příměsí a přecezen přes sítko.
2. Do 4 skleněných zkumavek (objem 100 ml) byl navrstven pomocí pasturovy pipety gradient
 1. vrstva: 30 ml Sheaterova roztoku 1+2
 2. vrstva: 30 ml Sheaterova roztoku 1+4
 3. vrstva: 15 ml vzorku trusu
3. Zkumavky s gradientem byly centrifugovány při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
4. Horní zbarvená vrstva (přibližně 1/3) byla odsáta a zbylý supernatant byl přenesen do čistých zkumavek.
5. Zkumavky byly doplněny deionizovanou vodou a centrifugovány opět při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
6. Polovina objemu byla odsáta a vzorky byly doplněny deionizovanou vodou. Poté byly vzorky centrifugovány při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
7. Krok č. 6 byl zopakován ještě jednou.
8. Sedimenty byly přeneseny do 1 zkumavky a uchovány při 4 °C s přidavkem antibiotik nebo zalité 5% dichromanem sodným.

Cesium chloridový gradient

Použité chemikálie:

- Roztok cesium chloridu ($1,15 \text{ g.ml}^{-1}$)
- PBS (0,025M; pH 7,2)

Postup čištění:

1. Po čištění na cukrovém gradientu byl vzorek centrifugován při $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut při 1450 g.
2. Všechny supernatant byl odsán, dále bylo přidáno 0,5 ml PBS a vzorek byl rozsuspendován.
3. Do čisté 1,7 ml mikrozkuhavky bylo napipetováno 1 ml CsCl.
4. Na CsCl bylo opatrně navrstveno 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
5. Vzorek byl centrifugován při $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 minuty při 16 000 g.
6. Byl odebrán 1 ml supernatantu s oocystami a poté naředěno pomocí PBS.
7. Vzorek byl centrifugován při $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 minuty při 16 000 g.
8. Supernatant byl odebrán a vzorek opět centrifugován při $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 minuty při 16000 g.
9. Supernatant byl odebrán a vzorek skladován v dichromanu draselném.

4.2.3 Specifické barvení oocyst kryptosporidií

Na podložním skle byl proveden tenký nátěr trusu a zafixován pomocí methanolu v plameni. Vzorky byly barveny metodami anilin-karbol-methyl violetí a byla provedena detekce pomocí protilátek.

Metoda anilin-karbol-methyl violet' (Miláček a Vítovec 1985)

Použité chemikálie:

- Roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleť; 1 ml anilin; 1 g fenol; 30 ml 90% alkohol; 70 ml deionizovaná voda)
- Roztok 2% H_2SO_4
- Roztok tartrazinu (1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové)

Postup barvení:

1. Fixované vzorky byly barveny v roztoku methylvioleti po dobu 30 minut.
2. Vzorky byly opláchnuty pod tekoucí vodou.
3. Dále byly diferencovány v 2% H₂SO₄ po dobu 2 minut.
4. Vzorky byly opláchnuty pod tekoucí vodou.
5. Vzorky byly dobarveny v roztoku tartrazinu po dobu 4 minut.
6. Vzorky byly opláchnuty pod tekoucí vodou.
7. Vzorky byly ponechány oschnout při laboratorní teplotě a následně byly prohlíženy mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Detekce pomocí specifických protilátek

Pro detekci byl použit komerční kit Crypto Cel (Cellabs Pty Ltd, Brookvale, NSW 2100 Australia).

Součásti kitu:

- Crypto Cel Reagent
- Positive Control Slide
- Mounting Fluid

Postup:

1. Na podložní sklo bylo nanášeno 20 µl vzorku přečištěného na cesium chloridovém gradientu.
2. Vzorek byl ponechán oschnout při laboratorní teplotě.
3. Vzorek byl fixován po dobu 5 minut v metanolu a ponechán oschnout při laboratorní teplotě.
4. Bylo přidáno 25 µl Crypto Cel Reagent k fixaci vzorku a Positive Control Slide, ponecháno ve vlhké komůrce.
5. Vzorek byl inkubován při 37 °C ve vlhké komůrce po dobu 30 minut.
6. Vzorek byl opatrně opláchnut v roztoku PBS po dobu 1 minuty.
7. Vzorek byl ponechán oschnout.
8. Byla přidána kapka Mounting Fluid na vzorek. Vzorek byl přikryt krycím sklem a byly odstraněny bubliny.

9. Vzorky byly prohlíženy mikroskopem s UV lampou při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.
10. Vzorek bylo možné uchovávat při 2–8 °C ve tmě po dobu 24 hodin.

4.2.4 Hodnocení intenzity infekce

U mikroskopicky pozitivních vzorků byla odhadnuta intenzita infekce a vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu (OPG, oocysts per gram) (Kváč a kol. 2007).

4.2.5 Izolace DNA

Izolace byla provedena pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA kit (Invitex).

Součásti kitu:

- Elution Buffer D
- Lysis Buffer P
- Proteináza K
- Promývací pufir Wash I
- Promývací pufir Wash II
- Binding Buffer P
- InviAdsorb zkumavka
- Kolona se sběrnou zkumavkou

Postup:

1. Do zkumavky bylo vloženo 200 mg trusu se skleněnými kuličkami (0,5 mm). Poté bylo přidáno 0,8–1,2 ml Lysis Bufferu P, zvortexováno a rozbíjeno 1 minutu při max. rychlosti přístrojem Fast Prep 24 Instrumnet (MP Bio).
2. Zkumavka byla inkubována v termobloku při teplotě 95 °C po dobu 10 minut.
3. Vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty při 13 400 g.
4. Supernatant byl přepipetován do InviAdsorb zkumavek, zvortexován a 1 minutu inkubován při laboratorní teplotě. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 3 minut při 13 400 g.
5. Supernatant byl přepipetován do nových 1,5 ml mikrozukumavek a dále centrifugován po dobu 3 minut při 13 400 g.

6. Do nových 1,5 ml mikrozkušavek byla napipetována proteináza K (25 μ l) a dále přidáno 400 μ l supernatantu. Vzorek byl zvortexován.
7. Vzorek byl inkubován v termobloku při teplotě 70 °C po dobu 10 minut.
8. Ke vzorku bylo připipetováno 400 μ l Binding Bufferu P a zvortexováno.
9. Veškerý objem byl přenesen na kolonu se sběrnou zkumavkou a vzorek byl inkubován po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě. Poté byl centrifugován po dobu 1 minuty při 13 400 g.
10. Odpad ze sběrné zkumavky byl vylit a na kolonu bylo napipetováno 500 μ l promývacího roztoku Wash I a vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty při 13 400 g.
11. Odpad ze sběrné zkumavky byl vylit a na kolonu bylo napipetováno 800 μ l promývacího roztoku Wash II a vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty při 13 400 g.
12. Odpad ze sběrné zkumavky byl vylit a vzorek byl centrifugován po dobu 3 minut při 13 400 g.
13. Kolona byla přenesena na čistou 1,5 ml mikrozkušavku a bylo napipetováno 200 μ l přehřáté dH₂O.
14. Vzorek byl inkubován 3 minuty při laboratorní teplotě a poté centrifugován 1 minutu při 8 000 g.

4.2.6 Genotypizace

Pro amplifikaci genu kódujícího malou ribozomální podjednotku rRNA (SSU), aktin a *Cryptosporidium* oocysts wall protein (COWP) byla použita vyizolovaná DNA. Samotné reakce byly uskutečněny v PCR mikrozkušavkách o objemu reakce 20 μ l a byla provedena nested PCR. Jako pozitivní kontroly byly použity vzorky vyizolované DNA *C. parvum* a *C. muris* a jako negativní kontrola dH₂O. Primární reakce byla provedena ve 20 μ l obsahující 10 \times pufr (Top Bio), 3 mM MgCl₂, 200 nM dNTPs, 200 mM každého primeru, 1U Taq polymerázy, 400 ng/ml BSA a 2 μ l genomové DNA. Sekundární reakce byla shodná s předpisem primární reakce vyjma přidání BSA a jako templát byly použity 2 μ l primární reakce.

Primární a sekundární PCR reakce probíhaly v 35 cyklech. Nejprve došlo k denaturaci DNA při 95 °C po dobu 45 sekund. Dále následoval krok nasedání primerů (annealing) při specifické teplotě pro každou reakci po dobu 45 sekund. Následně se teplota zvýšila

na 72 °C, při které se prodlužoval řetězec DNA (extension) po dobu 1 minuty. Prvnímu cyklu předcházela počáteční denaturace při teplotě 95 °C po dobu 5 minut a poslední cyklus byl následován finální extenzí při 72 °C po dobu 10 minut.

Pro amplifikaci každého genu byly použity specifické primery. Tyto primery a jejich nasedací teploty jsou popsány v tabulce 4.

Tabulka 4: Nukleotidové sekvence specifických primerů pro různé geny.

SSU

Primární reakce 55 °C**F1** 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'**R1** 3'-AGGACAAAGTCCCTTTACCC-5'**Sekundární reakce 55 °C****F2** 5'-GGAAGGGTGTATTTATTAGATAAAG-3'**R2** 3'-ATGAAGGTGACGTAGGATACTC-5'

Aktin

Primární reakce 50 °C**F1** 5'-ATGRGWAAGAAGWARYWCAAGC-3'**R1** 3'-TAACAAGTGTCTTTYACRAAGA-5'**Sekundární reakce 45 °C****F2** 5'-CAAGCWTRGTTGTTGAYAA-3'**R2** 3'-GGTWSWTAACAAGTGTCTTT-5'

COWP

Primární reakce 45 °C**F1** 5'-GAATGTCCTCCTGGGACTGTA-3'**R1** 3'-GTCATACAGGTGGTCCTAGT-5'**Sekundární reakce 50 °C****F2** 5'-TCCTCCTGGGACTGTATTGGA-3'**R2** 3'-GTTGTGTTGGTCATACAGGTGG-5'

4.2.7 Gelová elektroforéza

PCR produkt byl analyzován na 1% agarózovém gelu. Pro detekci byl použit EtBr a vizualizace byla provedena pomocí UV záření transiluminátorem (Ultra-Lum Inc, USA) a dokumentace (Gel Logic 112, program Carestream 1-877-747-HELP, USA).

Roztoky:

- 50× TAE pufr (242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA o pH = 8,00)

- Agarosa (Serva Electrophoresis, Germany)
- Ethidium bromid (10 mg/ml. Sigma Aldrich, USA)
- DNA Ladder – 100 bp (Fermentas International Inc., Canada)

Postup:

1. TAE pufr byl smíchán s agarózou (0,8 g agarózy + 80 ml TAE pufru).
2. Pufr s agarózou byl rozpouštěn v mikrovlnné troubě a poté ochlazen pod tekoucí vodou.
3. Do roztoku byl připipetován EtBr a roztok byl opatrně promíchán.
4. Gel byl nalit do předem připravené formy s hřebeny a nechán ztuhnout.
5. Po ztuhnutí byly hřebeny vyndány a gel byl vložen do elektroforetické vany s TAE pufrem.
6. Do první jamky byl napipetován Ladder a do dalších jamek produkty sekundární PCR.
7. Elektroforéza probíhala při napětí 90 V po dobu potřebnou k separaci jednotlivých fragmentů DNA.
8. Výsledek elektroforézy byl vizualizován pomocí UV transiluminátoru.

4.2.8 Izolace z gelu

Produkty z gelové elektroforézy vhodné k osekvenování byly vyizolovány pomocí QIAquick Gel Extraction kitu (Qiagen) podle doporučení od výrobce.

Postup izolace:

1. Fragment byl vyříznut z gelu, vložen do 1,5 ml zkumavky a bylo připipetováno 400 μ l QG pufru.
2. Vzorek byl inkubován a rozpouštěn po dobu 10 minut při 50 °C.
3. Vzorek byl přepipetován na kolonu a byla provedena centrifugace 1 minutu při 13 400 *g*.
4. Odpad byl vylit ze sběrné zkumavky a bylo připipetováno 500 μ l QG pufru.
5. Odpad byl vylit ze sběrné zkumavky a vzorek byl promyt 700 μ l PE pufru. Vzorek byl inkubován po dobu 5 minut při laboratorní teplotě.
6. Odpad byl vylit ze sběrné zkumavky a byla provedena centrifugace po dobu 3 minuty při 13 400 *g*, poté byla zkumavka otočena v centrifuze o 180° a opět byl vzorek centrifugován po dobu 3 minuty při stejném *g*.

7. Kolona byla dána na čistou mikrozkušavku a bylo připipetováno 30 μ l PCR vody, která byla předehřátá na 50 °C. Vzorek byl inkubován při laboratorní teplotě a poté byl centrifugován 3 minuty při 13 400 g.

4.2.9 Sekvenování

Sekvenování sekundárních PCR produktů bylo provedeno pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů. Nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí online dostupného programu Chromas Pro v 1.32 (www.technilysium.com.au/chromas.html) a dále pomocí programů ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/SlustalIX/>) a BioEdit porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank.

4.2.10 Fylogenetické analýzy

Metodou Neighbor-Joining byly vypočteny fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií (Saitou et Nei 1987). Byl použit dvouparametrový distanční model dle Kimury (1980). Na základě 1000 opakování byl získán bootstrapový konsenzus výsledných stromů. Ke konstrukci fylogenetických stromů byl použit program MEGA 6.

4.2.11 Design experimentálních prací

Byla získána přirozeně infikovaná želva, od které byl odebírán trus a ten následně přečištěn na cesium chloridovém gradientu. Takto přečištěný vzorek byl infekční dávkou pro pokusná zvířata (viz kapitola 4.1.3). Všechna experimentální zvířata byla infikována jícni sondou *Cryptosporidium* tortoise genotype I v dávce 1×10^4 oocyst/zvíře v 1000 μ l dH₂O.

Všechna zvířata byla denně odebírána po dobu 30 dní po infekci a následně 1 \times týdně. Vzorky byly vyšetřeny mikroskopicky pomocí barvicí metody anilin-karbol-methyl violet a z každého vzorku byla vyizolovaná DNA a byla provedena amplifikace genu SSU.

5 VÝSLEDKY

5.1 Mikroskopické vyšetření

Z celkového počtu 235 individuálních vzorků trusu suchozemských želv byly pomocí barvení anilin-karbol-methyl violetí detekovány oocysty kryptosporidií v 10 vzorcích trusu u sedmi různých druhů želv (tabulka 5).

Tabulka 5: Seznam přirozeně infikovaných druhů suchozemských želv v této práci včetně lokality jejich odběru, výsledků mikroskopické detekce a genotypizace.

Číslo vzorku	Hostitel	Lokalita	SSU	Genotypizace	
				Aktin	COWP
15093	<i>Testudo hermanni</i>	Hluboká nad Vltavou	genotype II	ND	ND
15094	<i>Testudo hermanni</i>	Hluboká nad Vltavou	genotype II*	ND	ND
15111	<i>Testudo horsfieldi</i>	České Budějovice	genotype II*	NS	NS
15119	<i>Testudo hermanni</i>	České Budějovice	genotype II	ND	ND
15120	<i>Testudo hermanni</i>	České Budějovice	genotype II	ND	ND
15176	<i>Stigmochelys pardalis</i>	České Budějovice	genotype III*	genotype III	NS
15177	<i>Testudo horsfieldi</i>	České Budějovice	genotype II	NS	NS
15573	<i>Testudo marginata</i>	Vrbová Lhota	genotype II	NS	genotype II
15575	<i>Testudo marginata</i>	Vrbová Lhota	genotype II	ND	ND
15576	<i>Testudo marginata</i>	Vrbová Lhota	genotype II	ND	ND
15581	<i>Testudo graeca</i>	Vrbová Lhota	genotype I	ND	ND
15585	<i>Testudo graeca</i>	Vrbová Lhota	genotype I*	NS	genotype II
15591	<i>Testudo graeca</i>	Vrbová Lhota	genotype II	NS	NS
15661	<i>Testudo marginata</i>	Kroměříž	genotype II*	genotype II	NS
15666	<i>Testudo kleinmanni</i>	Kroměříž	genotype II	ND	ND
15842	<i>Testudo horsfieldi</i>	České Budějovice	genotype II	genotype II	NS
15849	<i>Stigmochelys pardalis</i>	České Budějovice	genotype II	NS	NS
16744	<i>Geochelone radiata</i>	Brno	genotype II*	ND	ND
16745	<i>Testudo kleinmanni</i>	Brno	genotype II*	ND	ND
16746	<i>Testudo kleinmanni</i>	Brno	genotype II*	ND	ND
16750	<i>Testudo kleinmanni</i>	Brno	genotype II	ND	ND
16920	<i>Chelonoidis chilensis</i>	Nové Hradky	genotype I	NS	NS
18032	<i>Astrochelys radiata</i>	Vrbová Lhota	genotype I*	NS	NS
18394	<i>Geochelone pardalis</i>	Horní Lomnice	genotype I	NS	NS
18638	<i>Testudo horsfieldi</i>	České Budějovice	genotype I	ND	ND
18788	<i>Testudo kleinmanni</i>	České Budějovice	genotype II	ND	ND
19006	<i>Testo horsfieldi</i>	České Budějovice	genotype I*	genotype I	genotype I

* mikroskopická detekce oocyst barvením anilin-karbol-methyl violetí; **ND** neděláno; **NS** neosekvenováno.

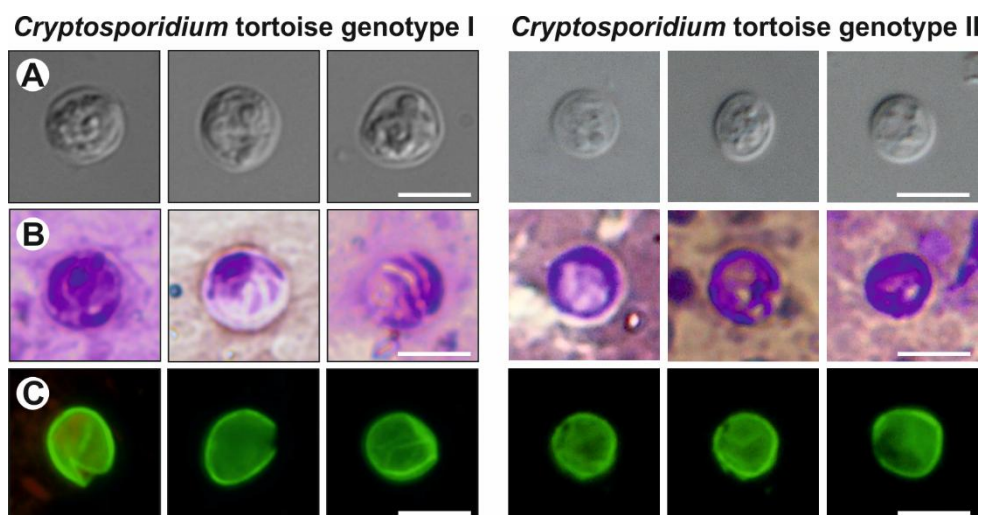
Intenzita infekce byla zjištěna pouze u mikroskopicky pozitivních vzorků. Ve všech případech byla detekována velmi nízká intenzita v rozmezí 1000–4000 OPG.

5.2 Morfologie oocyst

Pro morfologii byl použit nativní preparát. Tento preparát byl zhotoven z přečištěného vzorku trusu na cesium chloridovém gradientu, uchovávaném v dichromanu draselném.

Cryptosporidium tortoise genotype I má větší oválnější oocysty o velikosti 5,80–6,90 μm (průměr = 6,35) \times 5,30–6,50 μm (průměr = 5,92) s indexem tvaru $1,07 \pm 0,05$ ($n = 30$). Oocysty *Cryptosporidium* tortoise genotype II jsou velké 4,40–5,40 μm (průměr = 5,04) \times 4,30–5,30 μm (průměr = 4,84) s indexem tvaru $1,04 \pm 0,03$ ($n = 30$). Oocysty *Cryptosporidium* tortoise genotype I a *Cryptosporidium* tortoise genotype II jsou zobrazeny na obrázku 2.

Obrázek 2: Oocysty *Cryptosporidium* tortoise genotype I a *Cryptosporidium* tortoise genotype II zobrazeny **A)** diferenciálním interferenčním kontrastem, **B)** barvení anilin-karbol methyl violetí a **C)** specifickými protilátkami proti stěně oocysty (Crypto Cel). Měřítko 5 μm .



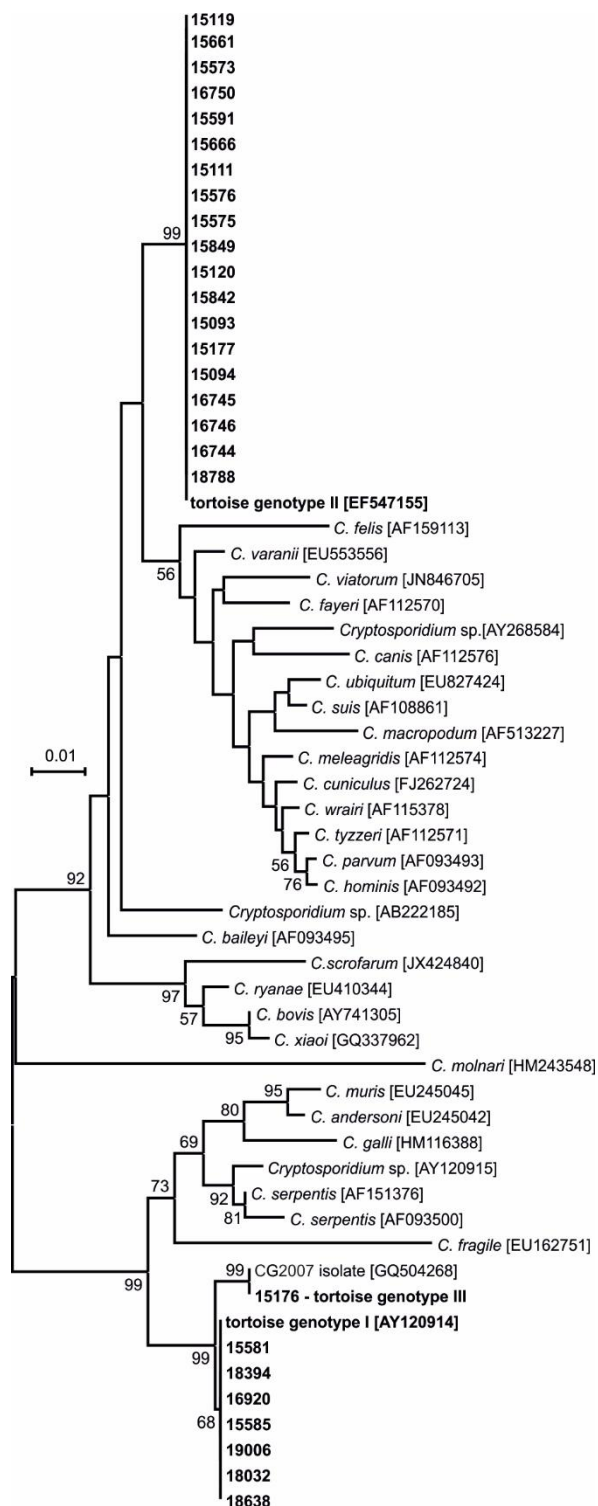
5.3 Klinické příznaky

Žádné z pozorovaných zvířat nevykazovalo klinické příznaky kryptosporidiózy. Nevyskytoval se u nich průjem, zvířata měla chuť k jídlu, nebyla malátná ani nadměrně unavená.

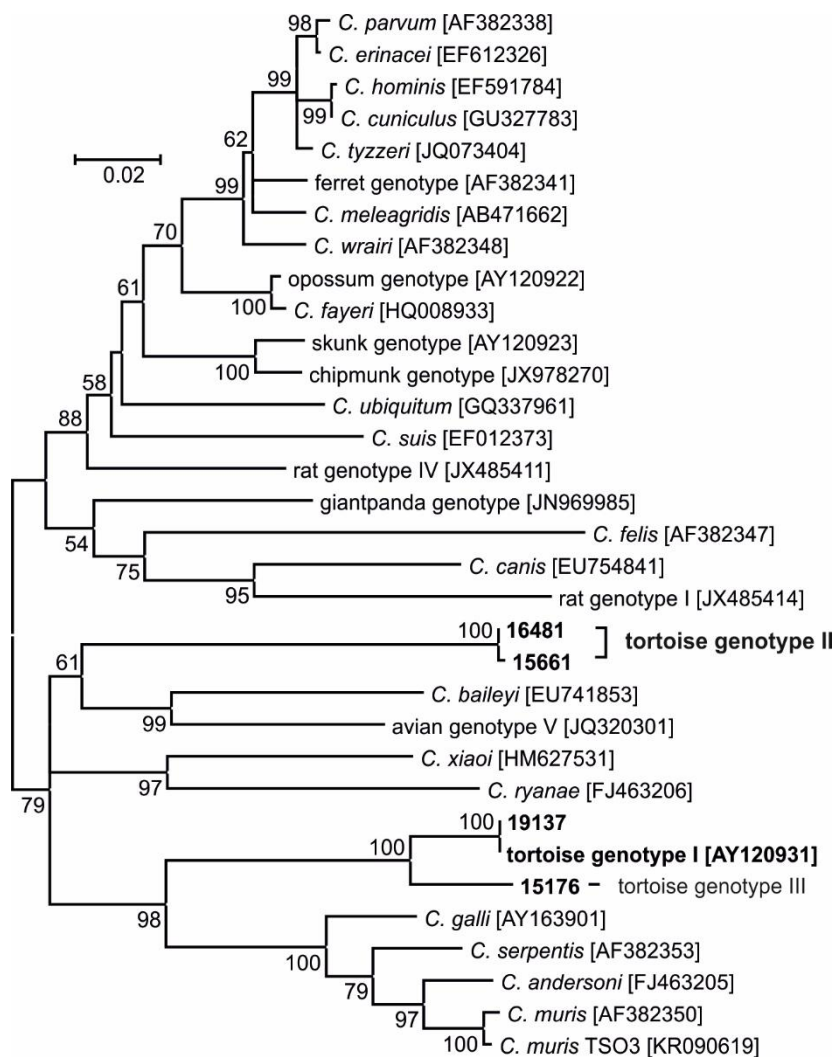
5.4 Genotypizace

Z celkového počtu 235 vzorků trusu byla specifická DNA kryptosporidií kódující gen pro malou ribozomální podjednotu rRNA (SSU) prokázána ve 27 vzorcích. Všechny mikroskopicky pozitivní vzorky byly současně i PCR pozitivní. Fylogenetická analýza SSU prokázala přítomnost tří odlišných sekvencí. V 19 případech byl detekován *Cryptosporidium* tortoise genotype II. Všechny sekvence byly 100 % shodné se sekvencí získanou z *Testudo marginata* [EF547155]. V sedmi případech byly sekvence identické s *Cryptosporidium* tortoise genotype I [AY120914]. V jednom případě, ze vzorku pocházejícího ze *Stigmochelys pardalis* byla detekována sekvence SSU identická s izolátem CG2007 [GQ504268] získaného z *Testudo horsfieldi* (obrázek 3). S ohledem na výsledky fylogenetických analýz dalších genů (dále) jsme tento izolát pojmenovali *Cryptosporidium* tortoise genotype III.

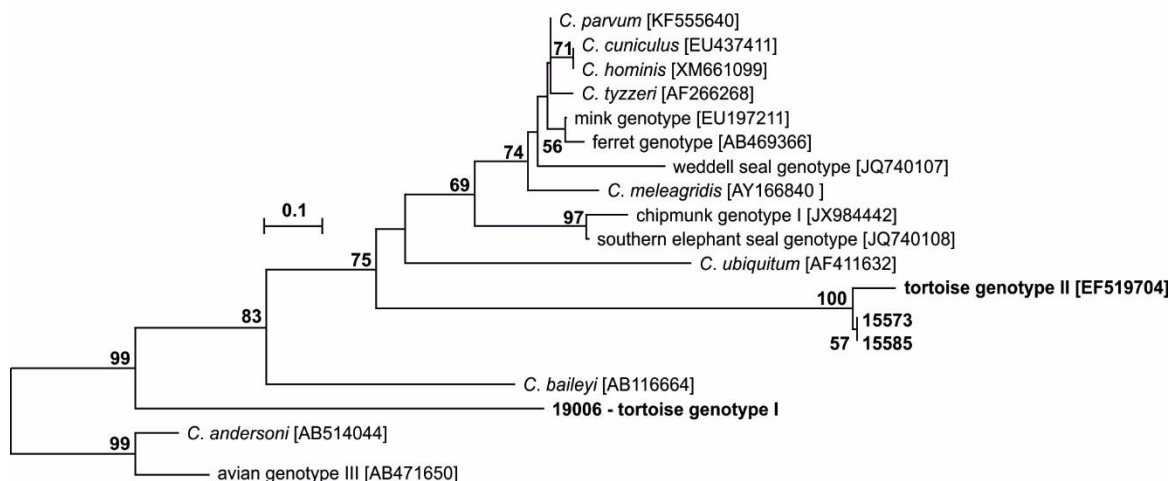
Následné fylogenetické analýzy genů pro aktin a COWP u vybraných izolátů potvrdily samostatné fylogenetické pozice všech detekovaných genotypů (obrázky 4 a 5).



Obrázek 3: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných ze želv s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU), vytvořený metodou neighbor-joining (1000× bootstrap). Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny.



Obrázek 4: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných ze želv s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro aktin, vytvořený metodou neighbor-joining (1000× bootstrap). Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny.



Obrázek 5: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných ze želv s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro *Cryptosporidium* oocysts wall protein (COWP), vytvořený metodou neighbor-joining (1000× bootstrap). Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny.

5.5 Hostitelská specifita

Vzhledem k omezenému množství získaných životaschopných oocyst z přirozeně infikovaných želv byla hostitelská specifita testována pouze u *Cryptosporidium* tortoise genotype I. Výsledky dlouhodobých sledování přirozeně infikovaných želv a experimentálních pokusů prokázaly, že *Cryptosporidium* tortoise genotype I bylo infekční pouze pro suchozemské želvy, včetně přirozeně infikované *Testudo horsfieldi* a naopak mikroskopické ani molekulární vyšetření neprokázalo přítomnost oocyst nebo specifickou DNA v trusu infikovaných SCID myši, vodních želv (*Chinemys reevesii*), užovky proužkované (*Thamnophis sirtalis*) ani zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*).

První záchyt specifické DNA u *Testudo horsfieldi* infikované *Cryptosporidium* tortoise genotype I byl 11. den po infekci (DPI). Oocysty byly mikroskopicky detekovány pouze 35. DPI. Přítomnost oocyst v trusu byla ověřována molekulárními metodami, specifická DNA byla detekována v trusu intermitentně. Vyjma 15., 16., 25. a 29. DPI byly všechny vzorky pozitivní.

6 DISKUSE

Procento pozitivních zvířat v této studii bylo 11,5 %. Naše výsledky odpovídají studii Pedraza-Díaz a kol. (2009) kteří detekovali kryptosporidie u 11,8 % želv chovaných ve Španělsku. Naopak poměrně vysoký, respektive nízký počet pozitivních zvířat byl zjištěn v Itálii a Anglii to 22,6 %, respektive 0,9 % (Hedley a kol. 2013; Traversa a kol. 2008). Promořenost zvířat v jednotlivých studiích může být do značné míry ovlivněna typem chovu a množstvím chovaných zvířat. Ve všech případech se jednalo o v zajetí držená zvířata od chovatelů, případně ze zoologických zahrad.

Na základě velikosti a tvaru oocyst lze v rámci rodu *Cryptosporidium* rozlišit dva morfotypy oocyst (Kváč a kol. 2014; Upton a Curent 1985; Vítovec a kol. 2006). V jednotlivých skupinách (žaludeční a střevní druhy) jsou si oocysty jednotlivých druhů velmi podobné a mikroskopicky je téměř nemožné je od sebe rozlišit. Velikost oocyst je charakteristickou vlastností daného druhu a nezávisí na typu hostitele (Kváč a kol. 2013a). Výsledky této studie potvrdily, že střevní kryptosporidie želv *Cryptosporidium* tortoise genotype II jsou menší a kulaté zatímco žaludeční *Cryptosporidium* tortoise genotype I má oocysty větší a oválné. Námí popsaná morfometrie oocyst *Cryptosporidium* tortoise genotype II odpovídá popisu kryptosporidií z přirozeně infikované želvy *Testudo kleinmanni* (4,4–6,3 μm ; průměr = 5,1 μm) (Graczyk a kol. 1998). Nicméně vzhledem k tomu, že Graczyk a kol. (1998) negenotypovali nalezené kryptosporidie, nelze vyloučit, že se jednalo o jiný, zatím nepopsaný druh/genotyp.

Na rozdíl například od *C. parvum* u telat (Naciri a kol. 1999), *C. hominis* u člověka (Chappell a kol. 2015), *C. canis* (Scorza a Tangtrongsup 2010) nezpůsobuje celá řada druhů a genotypů kryptosporidií žádné klinické příznaky (Johansen a kol. 2014; Kváč a kol. 2013; Morgan-Ryan a kol. 2002; Pettoelo-Mantovani a kol. 1995). U žádné z námí vyšetřených želv nebyly pozorovány klinické příznaky typické pro kryptosporidiové infekce a to ani u experimentálně infikované želvy. Naše výsledky odpovídají zjištění, že kryptosporidóza želv není spojena s žádnými stupni gastroenteritid (Hedley 2013; Pedraza-Díaz a kol. 2009; Traversa a kol. 2008). Naopak v řadě klinický studií zaměřených pouze na nemocné želvy byla popsána celé škála symptomů (gastritidy, pneumonie, omezený příjem potravy, letargie, edémem hlavy a krku a slabost předních končetin, průjem) doprovázejících kryptosporidiové infekce želv infikovaných jak genotypem I, tak genotypem II (Alves a kol. 2005; Graczyk a kol. 1998; Griffin a kol. 2010; Heuschele a kol. 1986; Richter a kol. 2012). S ohledem na to, že všechny tyto

studie byly zaměřeny na nemocné želvy, lze předpokládat, že primární příčinou zdravotních problémů želv bylo jiné agens než kryptosporidie.

Provedené fylogenetické analýzy založené na SSU, aktin a COWP genech prokázaly přítomnost tří různých genotypů a to dříve popsaných *Cryptosporidium* tortoise genotype I, *Cryptosporidium* tortoise genotype II a jednoho nového genotypu nazvaného *Cryptosporidium* tortoise genotype III. Na lokusu SSU byly všechny tři genotypy identické s dříve popsanými izoláty. Na aktinovém lokusu byla poprvé získána sekvence z *Cryptosporidium* tortoise genotype I a III. Fylogenetická analýza potvrdila jejich samostatnou pozici. Stejně tak v na lokusu pro COWP byla získána první sekvence pro *Cryptosporidium* tortoise genotype I. Všechny námi získané sekvence *Cryptosporidium* tortoise genotype II byly identické a z 98,7 % příbuzné k izolátu získaného z *Testudo marginata* a identifikovaného jako tortoise genotype II (Traversa a kol. 2008).

Prepatentní perioda se v závislosti na druhu a genotypu kryptosporidie pohybuje od 3 do 26 dnů po infekci (Vítovec a kol. 2006) a není závislá na infekční dávce (Rhee a kol. 1995; Zambriski a kol. 2013). Obecně lze konstatovat, že žaludeční kryptosporidie mají delší prepatentní periodu než ty, které infikují střevní epitel (Enemark a kol. 2003; Kváč a kol. 2013). Délka prepatentní periody *Cryptosporidium* tortoise genotype I, tedy žaludečního druhu, byla 11 DPI.

Délka patentní doby je taktéž velmi variabilní, v řadě případů dochází k tzv. self-cure fenomenu, tedy samovyléčení jedince (DuPont a kol. 1995; Enemark a kol. 2003; Matsui a kol. 1999; Tzipori a kol. 1983). Naopak například u žaludečních druhů infikujících savce je velmi často pozorována chronická dlouhodobá, až celoživotní infekce (Wilhelm a Yarovinsky 2014). Obdobně v naší práci jsme zaznamenali chronickou infekci vyvolanou *Cryptosporidium* tortoise genotype I o délce více než 5 měsíců.

Z výsledků této i ostatních studií lze usuzovat, že všechny nalezené genotypy detekované u želv jsou pravděpodobně hostitelsky specifické, což částečně potvrdily i experimentální infekce různých obratlovců *Cryptosporidium* tortoise genotype I (Xiao a kol. 2004). Nicméně Pedraza-Díaz a kol. (2009) detekoval *Cryptosporidium* tortoise genotype I a II u krajty *Python regius* a chameleona *Chamaeleo calypttratus*. S ohledem na ojedinělost nálezů těchto genotypů u jiných plazů nelze věrohodně posoudit, zda se jednalo o probíhající infekci nebo pouhou pasáž oocyst zažívacím traktem.

7 ZÁVĚRY

- Bylo prokázáno, že oocysty *Cryptosporidium* tortoise genotype I a *Cryptosporidium* tortoise genotype II jsou morfologicky odlišné.
- *Cryptosporidium* tortoise genotype II je nejčastěji se vyskytující genotyp kryptosporidií u suchozemských želv v České republice.
- Byl detekován nový genotyp - *Cryptosporidium* tortoise genotype III u suchozemských želv.
- Byl popsán průběh infekce *Cryptosporidium* tortoise genotype I.
- *Cryptosporidium* tortoise genotype I není infekční pro vodní želvy (*Chinemys reevesii*), laboratorní myš SCID, užovku proužkovanou (*Thamnophis sirtalis*) ani zebříčku pestrou (*Taeniopygia guttata*).
- *Cryptosporidium* tortoise genotype I a II nezpůsobují klinické onemocnění želv.

8 LITERATURA

- Alvarez-Pellietro P., Sitja-Bobadilla A. (2002):** *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. International Journal for Parasitology, 32: 1007-1021.
- Alves M., Xiao L., Lemos V., Zhou L., Cama V., Barao da Cunha M., Matos O., Antunes F. (2005):** Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo. Parasitology Research, 2005: 108-112.
- Anderson B. C. (1987):** Abomasal cryptosporidiosis in cattle. Veterinary Clinical Pathology, 24: 235-238.
- Arrowood M.J., Sterling C.R. (1987):** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. The Journal of Parasitology, 73: 314-319.
- Carreno R.A., Martin D.S., Barta J. R. (1999):** *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitology Research, 85: 899-904.
- Current W.L., Upton S.J., Haynes T.B. (1986).** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. The Journal of protozoology, 33: 289-296.
- Current W.L., Garcia L.S. (1991).** Cryptosporidiosis. Clinical Microbiology Reviews, 4: 325-358.
- DuPont H.L., Chappell C.L., Sterling C.R., Okhuysen P.C., Rose J.B., Jakubowski W. (1995):** The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. The New England Journal of Medicine, 332: 855-859.
- Elwin K., Hadfield S.J., Robinson G., Crouch N.D., Chalmers R.M. (2012):** *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. International Journal for Parasitology, 42: 675-682.
- Enemark H. L., Ahrens P., Bille-Hansen V., Heegaard P.M., Virge H., Thamsborg S. M., Lind P. (2003):** *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the 'porcine' genotype. Parasitology, 126: 407-416.

- Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P. (1997):** The general biology of *Cryptosporidium*: In: Fayer R. (Ed.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Chemical Rubber Company Press. pp. 2-33.
- Fayer R., Trout J.M., Xiao L., Morgan U.M., Lai A.A., Dubey J.P. (2001):** *Cryptosporidium canis* n. sp. From domestic dogs. *Journal of Parasitology*, 87: 1415-1422.
- Fayer R. (2003):** *Cryptosporidium*: From molecules to disease. In: Thompson R.C.A., Armson A., Ryan U.M. (Eds.): *Cryptosporidium*: From molecules to disease. Elsevier. pp. 11-18.
- Fayer R. (2004):** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126: 37-56.
- Fayer R., Santín M., Xiao L. (2005):** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology*, 91: 624-9.
- Fayer R. (1997):** General Biology. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. pp: 1-42.
- Fayer R., Santín M., Trout J.M. (2008):** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156: 191-198.
- Fayer R. a Santín M. (2009):** *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, 164: 192-200.
- Fayer R., Santin M., Macarisin D. (2010):** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, 172: 23-32.
- Ferri, V. (2002):** Turtles & tortoises. New York: Firefly Books. pp. 10-27.
- Flanigan T., Whalen C., Turner J., Soave R., Toerner J., Havlir D., Kotler D. (1992):** *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Annals of Internal Medicine*, 116: 840-842.
- Graczyk T.K., Cranfield M.R., Mann J., Strandberg J.D. (1998):** Intestinal *Cryptosporidium* sp. infection in the Egyptian tortoise, *Testudo kleinmanni*. *International Journal for Parasitology*, 28: 1885-1888.
- Griffin C., Reavill D.R., Stacy B.A., Childress A.L., Wellehan J. (2010):** Cryptosporidiosis caused by two distinct species in Russian tortoises and a pancake tortoise. *Veterinary Parasitology*, 170: 14-19.
- Hedley J., Eatwell K., Shaw D.J. (2013):** Gastrointestinal parasitic burdens in UK tortoises: a survey of tortoise owners and potential risk factors. *Veterinary Record*, 173: 525.

- 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*, 1989: 493-496.
- Hijjawi N.S., Meloni B.P., Ryan U.M., Olson M.E., Thompson R.C. (2002):** Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 32: 1719-1726.
- Hijjawi N.S., Meloni B.P., Ng'anzo M., Ryan U.M., Olson M.E., Cox P.T., Monis P.T., Thompson R.C. (2004):** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology*, 34: 769-777.
- Houpte R., Bushen O.Y., Sam N.E., Kohli A., Asgharpour A., Ng C.T., Calfee D.P., Guerrant R.L., Maro V., Ole-Nguayine S., Shao J.F. (2005):** Short report: Asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 520-522.
- Iseki M., Maekawa T., Moriya K., Uni S., Takada S. (1989):** Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitology Research*, 75: 218-222.
- Chappell C.L., Okhuysen P.C., Langer-Curry R.C., Lupo P.J., Widmer G., Tzipori S. (2015):** *Cryptosporidium muris*: infectivity and illness in healthy adult volunteers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92: 50-55.
- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Krřízek J., Modrý D., Šlapeta J. (2008):** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*, 55: 81-94.
- Johansen O.H., Hanevik K., Thrana F., Carlson A., Stachurska-Hagen T., Skaare D., Robertson L.J. (2014):** Symptomatic and asymptomatic secondary transmission of *Cryptosporidium parvum* following two related outbreaks in schoolchildren. *Epidemiology and Infection*, 30: 1-8.
- Katsumata T., Hosea D., Ranuh I.G., Uga S., Yanagi T., Kohno S. (2000):** Short report: Possible *C. muris* infection in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62: 70-72.

- Kimura M. (1980):** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. (2007):** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology*, 143: 229-233.
- Kváč M., McEvoy J., Loudová M., Stenger B., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Rašková V., Moriarty E., Rost M., Macholán M., Piálek J. (2013):** Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *International Journal for Parasitology*, 43: 805-817.
- Kváč M., Kestránová M., Pinková M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B. (2013a):** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Suis scrofa*). *Veterinary Parasitology*, 31: 218-227.
- Kváč M., Saková K., Květoňová D., Kicia M., Weselovska M., McEvoy J., Sak B. (2014):** Gastroenteritis caused by the *Cryptosporidium* hedgehog genotype in a immunocompetent man. *Journal of Clinical Microbiology*, 52: 347-349.
- Kváč M., Hofmannová L., Hlásková L., Květoňová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B. (2014):** *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology*, 201: 9-17.
- Levine N.D. (1980):** Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology*, 66: 830-834.
- Li N., Xiao L., Alderisio K., Elwin K., Cebelinski E., Chalmers R., Santin M., Fayer R., Kváč M., Ryan U., Sak B., Stanko M., Guo Y., Wang L., Zhang L., Cai J., Roelling D., Feng Y. (2014):** Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a Zoonotic Pathogen Emerging in Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 20: 217-224.
- Lindsay D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R., Blagburn B.L. (2000):** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47: 91-95.
- Li N., Xiao L., Alderisio K., Elwin K., Cebelinski E., Chalmers R., Santin M., Fayer R., Kváč M., Ryan U., Sak B., Stanko M., Guo Y., Wang L., Zhang L., Cai J., Roelling D., Feng Y. (2014):** Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zootonic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 20: 217-224.

- Liu A., Wang R., Li Y., Zhang L., Shu J., Zhang W., Feng Y., Xiao L., Ling H. (2009):** Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Heilongjiang Province, China. *Parasitology Research*, 105: 797-802.
- Mason R.W., Hartley W.J., Tilt L. (1981):** Intestinal cryptosporidiosis in a kid goat. *Australian Veterinary Journal*, 57: 386-388.
- Matsui T., Fujino T., Tsuji M. (1999):** Infectivity to hosts of the endogenous stages of chicken and murine *Cryptosporidium*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61: 471-474.
- Miláček P., Vítovec J. (1985):** Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica*, 32: 50.
- Morgan-Ryan U.M., Fall A., Ward L.A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R.C., Olson M., Lal A., Xiao L. (2002):** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49: 433-440.
- Naciri M., Lefay M.P., Mancassola R., Poirier P., Chermette R. (1999):** Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Veterinary Parasitology*, 85: 245-57.
- O' Donoghue P.J. (1995):** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, 25: 139-195.
- Pavlásek I., Ryan U. (2008):** *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. *Experimental Parasitology*, 118: 434-437.
- Pedraza-Díaz S., Ortega-Mora L.M., Carrion B.A., Navarro V., Gómez-Bautista M. (2009):** Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. *Veterinary Parasitology*, 160: 204-210.
- Pettoello-Mantovani M., Di Martino L., Dettori G., Vajro P., Scotti S., Ditullio M.T., Guandalini S. (1995):** Asymptomatic carriage of intestinal *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunodeficient children: A prospective study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 14: 1042-1047.
- Pospischil A., Stiglmeier M.T., Hegel G., Wiener H. (1987):** Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Veterinary Record*, 112: 379-380.
- Power M.L., Ryan U.M. (2008):** A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *Journal of Parasitology*, 94: 1114-1117.

- Raphael B.L., Calle P.P., Gottdenker N., James S., Linn W.J., McNamara T., Cook R.A. (1997):** Clinical significance of Cryptosporidia in captive and free-ranging chelonians. In: Proceedings of the Annual meeting of the American Association of Zoo Veterinarians, 1997: 19-20.
- Rašková V., Květoňová D., Sak B., McEvoy J., Edwinston A., Stenger B., Kváč M. (2013):** Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *Journal of Clinical Microbiology*, 51: 360-362.
- Rhee J.K., Yook S.Y., Park B.K. (1995):** Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in mice. *The Korean Journal of Parasitology*, 33: 377-382.
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning C., Jian F., Wang R., Lv C., Wang Q., Arrowood M.J., Xiao L. (2012):** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, 130: 274-281.
- Richter B., Rasim R., Vrhovec M.G., Nedorost N., Pantchev N. (2012):** Cryptosporidiosis outbreak in captive chelonians (*Testudo hermanni*) with identification of two *Cryptosporidium* genotypes. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24: 591-595.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S.J., Katzer F., Bartley P.M., Hunter P.R., Nath M., Innes E.A., Chalmers R.M. (2010):** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, 40: 1539-1548.
- Ryan U.M., Xiao L., Read C., Sulaiman I.M., Monis P., Lal A.A., Fayer R., Pavlasek I. (2003):** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology*, 89: 809-813.
- Ryan U.M., Monis P., Enemark H.L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R.C., Xiao L. (2004):** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*, 90: 769-773.
- Ryan U.M., O'Hara A., Xiao L. (2004):** Molecular and biological characterization of a *Cryptosporidium molnari*-Like isolate from a guppy (*Poecilia reticulata*). *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3761-3764.

- Ryan U.M., Power M., Xiao L. (2008):** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). Journal of Eucaryotic Microbiology, 55: 22-26.
- Ryan U.M., Papparini A., Tonq K., Yanq R., Gibson-Kueh S., O'Hara A., Lymbery A., Xiao L. (2015):** *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). Experimental Parasitology, 150: 31-35.
- Saitou N., Nei M. (1987):** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4: 406-425.
- Scorsa V., Tangtrongsup S. (2010):** Update on the Diagnosis and Management of *Cryptosporidium* spp. Infections in Dogs and Cats. Topics in Companion Animal Medicine, 25: 163-169.
- Sréter T., Kovács G., da Silva A.J., Pieniazek N.J., Széll Z., Dobos-Kovács M., Márialigeti K., Varga I. (2000):** Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. Applied and Environmental Microbiology, 66: 735-738.
- Sterling C.R., Seegar K., Sinclair N.A. (1986):** *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea. The Journal of Infectious Diseases, 153: 380-381.
- Sulaiman I.M., Xiao L., Lal A.A., (1999):** Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. Applied and Environmental Microbiology, 65: 4431-4435.
- Sunnotel O., Snelling W.J., Xiao L., Moule K., Moore J.E., Millar B.C., Dooley J.S., Lowery C.J. (2006):** Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides. The Journal of Clinical Microbiology, 44: 3285-3291.
- Thamsborg S.M., Jörgensen R. J., Henriksen S.A. (1990a):** Cryptosporidiosis in kids of dairy goats. Veterinary Record, 127: 380-381.
- Thamsborg S.M., Jörgensen R. J., Henriksen S.A. (1990b):** Cryptosporidiosis in kids of dairy goats. Veterinary Record, 127: 627-628.
- Thompson R.C.A., Olson M.E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M.S., Hijawi N.S. (2005):** *Cryptosporidium* and cryptosporiosis. Advances in Parasitology, 59: 77-158.
- Traversa D., Iorio R., Otranto D., Modrý D., Šlapeta J. (2007):** *Cryptosporidium* from tortoises: Genetic characterisation, phylogeny and zoonotic implications. Molecular and Cellular Probes, 22: 122-128.
- Traversa D. (2010):** Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. Parasites and Vectors, 3: 21.

- Turkcepar N., Kutlay S., Nergizoglu G., Atli T., Duman N. (2002):** Prevalence of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. *Nephron*, 90: 344-346.
- Tyzzar E.E. (1910):** An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of Medical Research*, 23: 394-414.
- Tyzzar E.E. (1912):** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv fur Protistenkunde*, 26: 394-412.
- Tzipori S. (1983):** Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiology Revue*, 47: 84-96.
- Upton S.J., Current W.L. (1985):** The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *The Journal of Parasitology*, 71: 625-629.
- Valigurová A., Hofmannová L., Koudela B., Vávra J. (2007):** An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *Journal of Eucaryotic Microbiology*, 54: 495-510.
- Vetterling J.M., Takeuchi A., Madden P.A. (1971):** Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. *The Journal of Protozoology*, 18: 248-60.
- Vítovec J., Hamadejová K., Landová L., Kváč M., Květoňová D., Sak B. (2006):** Prevalence and pathogenity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *Journal of Veterinary Medicine*, 53: 239-243.
- Wilhelm C.L., Yarovinsky F. (2014):** Apicomplexan infections in the gut. *Parasite Immunology*, 36: 409-420.
- 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 adaption and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public healt. *Veterinary Parasitology*, 147: 166-170.
- Xiao L., Ryan U.M., Graczyk T.K., Limor J., Li L., Kombert M., Junge R., Sulaiman I.M., Zhou L., Arrowood M.J., Koudela B., Modrý D., Lal A.A. (2004):** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in Captive Reptiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004: 891-899.
- Xiao L., Ryan U. (2014):** Taxonomy and molecular taxonomy. In: Caccio S.M., Widmer G. (Eds.): *Cryptosporidium: parasite and disease*. Wien, Springer Wien Heidelberg. pp. 3-41.
- Zambriski J.A., Nydam D.V., Wilcox Z.J., Bowman D.D., Mohammed H.O., Liotta J.L. (2013):** *Cryptosporidium parvum*: determination of ID₅₀ and the dose-response

relationship in experimentally challenged dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 197: 104-112.

Ziegler P.E., Wade S.E., Schaaf S.L., Stern D.A., Nadeski Ch.A., Mohammed H.O. (2007): Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, 147: 176-184.

Zych, J. (2006): Želvy v přírodě a v péči člověka. Praha: Nakladatelství Brázda. pp. 10-19.