

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Prevalence a diverzita kryptosporidií, giardií a mikrosporidií  
u orangutanů (*Pongo* spp.) a vliv vybraných rostlinných extraktů  
na průběh experimentální infekce *Encephalitozoon cuniculi*  
u BALB/c myši**

**Diplomová práce**

**Bc. Anna Mynářová**

Školitel: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.; BC AV ČR, v. v. i., PaÚ

Školitel specialista: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.; BC AV ČR, v. v. i., PaÚ a JU  
v Českých Budějovicích, ZF

České Budějovice 2015

**Mynářová A., (2015):** Prevalence a diverzita kryptosporidií, giardií a mikrosporidií u orangutanů (*Pongo* spp.) a vliv vybraných rostlinných extraktů na průběh experimentální infekce *Encephalitozoon cuniculi* u BALB/c myší [The prevalence and diversity of *Cryptosporidium*, *Giardia* and microsporidia in orangutans (*Pongo* spp.) and the effect of selected plant extracts on the course of experimental infection with *Encephalitozoon cuniculi* in BALB/c mice] – 106 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotation**

In this study, the prevalence and diversity of *Cryptosporidium* spp., microsporidia and *Giardia intestinalis* in orangutans at seven different sites on Sumatra and Kalimantan were described using molecular methods. Subsequently, the impact of orangutan's habituation and location on the occurrence of these zoonotic protists was evaluated. In the following part, the effect of selected plant extracts on the course of *Encephalitozoon cuniculi* experimental infection in murine model was tested *in vivo*.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 14. 12. 2015

Bc. Anna Mynářová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli Bohumilu Sakovi za trpělivost při vedení mé diplomové práce a ochotu mi kdykoli pomoci. Svému školiteli specialistovi Martinu Kváčovi velice děkuji za podnětné konzultace a vytvoření podmínek pro dokončení práce. Za poskytnutí vzorků a rostlinných extraktů děkuji Ivoně Foitové. Zvláštní poděkování patří Radku Šimovi za poskytnuté rady ohledně kvantitativní real-time PCR a Michalu Rostovi za pomoc se statistickým zpracováním výsledku v programu R. Za cenné připomínky a komentáře děkuji Olegu Ditrichovi. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Lence Hláskové, Daně Květoňové, Michaele Kotkové a celému kolektivu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie za veškerou pomoc a vstřícnost.

Mimořádné poděkování patří mým rodičům a Václavu Jandovi za ohromnou podporu během celé doby studia.

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

Tato studie byla finančně podpořena grantovým projektem GAČR P505/11/1163.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	1
<b>1.1 Mikrosporidie</b> .....	1
1.1.1 Taxonomie .....	1
1.1.2. Historie .....	2
1.1.3 Morfologie a vývojový cyklus.....	3
1.1.4 Mechanismy přenosu infekce .....	5
1.1.5 Patogenita a klinické příznaky.....	6
1.1.6 Terapie .....	7
1.1.7.1 <i>Enterocytozoon bienewisi</i> .....	8
1.1.7.2 <i>Enterocytozoon</i> spp. ....	9
1.1.8 Mikrosporidie a mikrosporidie primátů .....	10
1.1.8.1 Mikrosporidie u opic a poloopic.....	10
1.1.8.2 Mikrosporidie u lidoopů .....	12
1.1.8.3 Mikrosporidie u člověka.....	13
<b>1.2 Kryptosporidie</b> .....	15
1.2.1 Historie .....	15
1.2.2 Taxonomie .....	16
1.2.3 Morfologie a vývojový cyklus.....	17
1.2.4 Mechanismy přenosu infekce .....	18
1.2.5 Patogenita a klinické příznaky.....	19
1.2.6 Terapie .....	20
1.2.7 Nejčastější kryptosporidie u primátů.....	20
1.2.8 Kryptosporidie a kryptosporidie primátů.....	21
1.2.8.1 Kryptosporidie u opic a poloopic .....	21
1.2.8.2 Kryptosporidie u lidoopů.....	23
1.2.8.2 Kryptosporidie u člověka .....	25
<b>1.3 <i>Giardia intestinalis</i></b> .....	26
1.3.1 Historie .....	26
1.3.2 Taxonomie .....	26
1.3.3 Morfologie a vývojový cyklus.....	27
1.3.4 Mechanismy přenosu infekce .....	28
1.3.5 Patogenita a klinické příznaky.....	29
1.3.6 Terapie .....	29
1.3.7 Giardie a giardie u primátů .....	29
1.3.7.1 Giardie u opic a poloopic.....	29
1.3.7.2 Giardie u lidoopů .....	30
1.3.7.2 Giardie u člověka.....	31

<b>1.4 Orangutani</b> .....	31
1.4.1 Systematické zařazení, rozšíření a ekologie rodu orangutan.....	31
1.4.2 Paraziti gastrointestinálního traktu orangutanů .....	35
1.4.3 Sebemedikace u lidoopů.....	39
<b>2. CÍLE</b> .....	42
<b>3. MATERIÁL A METODY</b> .....	43
<b>3.1 Prevalence a diverzita</b> .....	43
3.1.1 Sběr vzorků a charakteristika lokalit .....	43
3.1.2 Izolace DNA z trusu .....	45
3.1.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	46
3.1.4 Gelová elektroforéza.....	48
3.1.5 Izolace z gelu .....	49
3.1.6 Sekvence .....	50
3.1.7 Fylogenetická analýza .....	50
3.1.8 Statistické zpracování výsledků.....	50
<b>3.2 Experimentální infekce</b> .....	50
3.2.1 Spory pro experimentální infekci .....	50
3.2.2 Pokusná zvířata.....	51
3.2.3 Použité rostlinné extrakty .....	51
3.2.4 Infikování BALB/c myši a uspořádání pokusu .....	51
3.2.5 Odběr vzorků trusu a tkání .....	53
3.2.6 Izolace DNA z tkáně.....	53
3.2.7 Kvantitativní real time PCR (qRT PCR) .....	54
3.2.8 Statistické zpracování výsledků.....	56
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	57
<b>4.1 Prevalence a diverzita</b> .....	57
4.1.1 Mikrosporidie .....	57
4.1.2 Kryptosporidie .....	58
4.1.3 Prevalence a diverzita giardií .....	60
<b>4.2. Optimalizace qRT PCR</b> .....	60
<b>4.3 Experimentální infekce</b> .....	62
4.3.1. Průběh infekce <i>E. cuniculi</i> u BALB/c myši – sledování v trusu .....	62
4.3.2 Kvantifikace spor <i>E. cuniculi</i> v orgánech infikovaných BALB/c myši .....	64
4.3.3 Vliv extraktů na počet spor v organismu.....	65
4.3.4 Vliv extraktů na počet spor v trávicí trubici a mimo trávicí trubici .....	66
<b>5. DISKUZE</b> .....	68
5.1 Prevalence a diverzita.....	68
5.2 Experimentální infekce.....	72
<b>6. ZÁVĚRY</b> .....	76
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	77

# 1. ÚVOD

## 1.1 Mikrosporidie

Mikrosporidie jsou jednobuněční obligátně intracelulární paraziti řazení do samostatného kmene Mikrosporidia (syn. Microspora), říše Opisthokonta. Ačkoli jednotlivé druhy vykazují poměrně úzkou hostitelskou specifitu, zástupce tohoto kmene můžeme nalézt u mnoha taxonomicky odlišných skupin živočichů – vyskytují se u protist, bezobratlých a všech tříd obratlovců včetně člověka (Matsubayashi et al. 1959, Desportes et al. 1985, Didier et al. 1991, Cali et al. 1993). Jejich vývojový cyklus může být jak monoxenní, tak heteroxenní. Doposud bylo popsáno více než 1300 druhů mikrosporidií zařazených do 187 rodů (Vávra et Lukeš 2013).

Mikrosporidie zahrnují druhy s klinickým a ekonomickým významem. Řada druhů je studována jako významné patogenní agens hmyzu (např. *Nosema apis*, *Nosema bombycis*), volně žijících ryb a akvakultur (např. rod *Glugea*) (Mathis et al. 2005). V současné době je známo 16 druhů mikrosporidií infikujících člověka a bylo zaznamenáno několik set případů nakažení, jak u imunodeficientních tak u imunokompetentních osob (Didier 2005). Nejčastější příčinou mikrosporidiózy u lidí jsou *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon intestinalis*.

### 1.1.1 Taxonomie

Kmen Mikrosporidia představuje dobře definovanou monofyletickou skupinu, její postavení na fylogenetickém stromu je ovšem nejisté a za 150 let výzkumu prošlo řadou změn (Keeling 2014). Zpočátku byly mikrosporidie řazeny mezi Schizomycetes, které zahrnovaly kvasinky a bakterie (Nägeli 1857), později byly jako protista řazeny do Cnidosporidia, skupiny Sporozoa (Balbiani 1882) a posléze považovány za primitivní linii eukaryot premitochondriální éry v rámci skupiny Archeozoa (Cavalier-Smith 1983). V současné době jsou mikrosporidie považovány nikoli za primitivní organismy, ale za velice redukované eukaryotické organismy, které vlivem parazitického způsobu života prošly významnými genetickými a funkčními ztrátami. Doposud však není zřejmé, zda mají být řazeny v rámci skupiny Fungi, nebo představují společně s Aphelida a *Rozella* spp. sesterskou skupinu hub (Cryptomycota – skupina ARM), s jistotou se však jedná o houby nebo organismy houbám blízké příbuzné (Corradi et Keeling 2009, Keeling 2014). Na jednu stranu mikrosporidie s houbami sdílejí celou řadu znaků (přítomnost  $\alpha$ -chitinu, trehalózy

a absence bičičků), na druhou stranu jsou zde znaky, kterými se od hub odlišují (ribozomy prokaryontního typu 70S a nepřítomnost ITS2) (Voigt et Kirk 2011).

Adaptace mikrosporidií k intracelulárnímu parazitismu vedla k redukci mnoha genů spojených s metabolickou funkcí, což zapříčinilo, že řada zástupců tohoto kmene má jedny z nejmenších eukaryontních genomů. Velikost jejich genomu se pohybuje od 2.3 Mbp (*Encephalitozoon intestinalis*) do 24 Mbp (*Hamiltosporidium tvaerminnensis*). Redukce je rovněž patrná na úrovni buňky, postrádají řadu organel pro eukaryota typických: peroxizomy, lysozomy, centrioly, bičičky nebo jiné mikrotubulární struktury a typickou podobu Golgiho komplexu. V minulosti se také předpokládalo, že nemají ani mitochondrie, avšak později byla odhalena přítomnost HSP70 (heat shock protein) genů u několika druhů mikrosporidií, což ukazuje na jejich sekundární ztrátu (Keeling et al. 2000). Při pozorování elektronovým mikroskopem byla následně prokázána přítomnost mitosomů (Vávra 2005).

V rámci kmene jsou mikrosporidie klasifikovány podle velikosti a morfologie spor, počtu závitů pólové trubice, uspořádání jádra, typu buněčného dělení, vývojového cyklu a vztahu hostitel – parazit (Sprague et al. 1992, Didier et al. 1998).

### 1.1.2. Historie

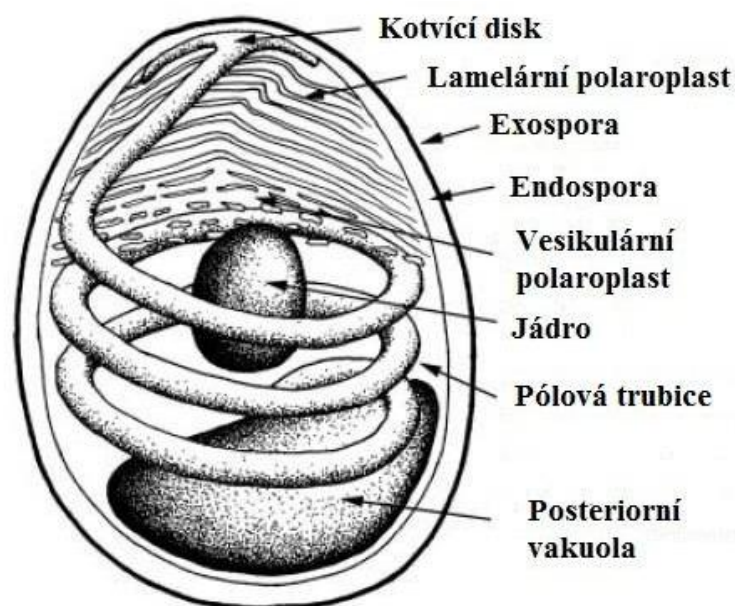
V polovině 19. století nemoc pébrine pustošila evropský hedvábný průmysl a téměř zdevastovala chovy bource morušového (*Bombyx mori*) ve Francii, Německu a Itálii. Roku 1857 profesor botaniky Carl Wilhelm von Nägeli ve své přednášce pojmenoval organismus za tuto škodu zodpovědný jako *Nosema bombycis* Nägeli 1857. Tento rok je považován za počátek mikrosporidiologie, i když některé práce o mikrosporidiích byly publikovány již dříve (Gluge 1838, Müller 1841, Creplin 1842). Morfologie spor byla o několik let později popsána Pasteurem (Pasteur 1870). Poté, co byla identifikována *N. bombycis*, byly nalezeny podobné organismy u celé řady živočichů – zejména bezobratlých a ryb. První zdokumentovaný případ mikrosporidií u savce pochází z roku 1922, kdy Wright a Craighead popsali tyto organismy u králíků s motorickou parézou, kteří vykazovali třes, otupělost a strnulost (Wright et Craighead 1922). Tento původce mikrosporidiózy králíků byl pojmenován *Encephalitozoon cuniculi*. První případ infekce člověka byl zaznamenán v roce 1959 u devítiletého chlapce, který trpěl horečkou, bolestmi hlavy a křečemi (Matsubayashi et al. 1959). Až do začátku pandemie HIV, kdy počet diagnostikovaných mikrosporidiových infekcí prudce vzrostl, byly popisovány jen zřídka. U pacientů s AIDS byli postupně popisováni jednotliví původci mikrosporidióz: *Encephalitozoon cuniculi* v roce 1984 (Bergquist et al. 1984), *Enterocytozoon bieneusi* v roce 1985 (Desportes et al. 1985),

*Encephalitozoon hellem* v roce 1991 (Didier et al. 1991) a *Encephalitozoon* (syn. *Septata*) *intestinalis* v roce 1993 (Cali et al. 1993). V souvislosti s větším povědomím o mikrosporidiích a lepšími diagnostickými metodami byly infekce popsány i u imunokompetentních osob – často jsou pozorovány u příjemců transplantovaných orgánů a kostní dřeně, diabetiků, cestovatelů, dětí, seniorů a uživatelů kontaktních čoček (Deplazes et al. 2000). Oční mikrosporidióza byla poprvé popsána v roce 1973 (Ashton et Wirasinha 1973). Navzdory tomu, že zpočátku byly mikrosporidie považovány za řídce se vyskytující, dnes jsou známy jako běžně rozšířené patogeny člověka. Ačkoli kombinovaná antiretrovirová terapie (cART) u HIV pozitivních výrazně snížila výskyt oportunních infekcí včetně mikrosporidiózy, v rozvojových zemích zůstává prevalence nadále vysoká (Fayer et Santín-Duran 2014).

### 3.1.3 Morfologie a vývojový cyklus

Mikrosporidie nemají aktivní stádia mimo hostitelské buňky a v prostředí přežívají ve stádiu spory (Obrázek 1). Spory se v závislosti na daném druhu liší strukturou a velikostí, která se pohybuje mezi 1 a 40  $\mu\text{m}$  (u savců tato velikost nepřesahuje 3  $\mu\text{m}$ ). Některé druhy mikrosporidií mohou vytvářet i dva nebo více strukturně a fyziologicky odlišných typů spor (např. *Trachipleistophora anthropophthera*).

**Obrázek 1:** Mikrosporidie – spora (Keeling et Fast 2002, upraveno)





Spory mají většinou oválný, kulovitý nebo hruškovitý tvar a jejich stěna se skládá ze tří vrstev:

- exospory (vnější elektron-denzní glykoproteinová vrstva)
- endospory (vnitřní chitinová vrstva)
- třívrstvé plazmatické membrány

Uvnitř spory se nachází infekční část – sporoplazma. Spory mohou být jednojaderné (monokaryon), které jsou typické například pro rody *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* nebo dvoujaderné (diplokaryon), ty nacházíme například u rodů *Nosema* a *Brachiola*. Pro mikrosporidie je charakteristický vystřelovací aparát, který se skládá z pólové trubice, ta je zpravidla doplněna o posteriorní vakuolu a polaroplast. Pólová trubice, která je ve spoře svinutá, vytváří 4–30 závitů kolem sporoplazmy a slouží k přenosu sporoplazmy do hostitelské buňky. Pólová trubice má průměr asi 0,1–0,2  $\mu\text{m}$  je až několik set  $\mu\text{m}$  dlouhá. Ke stěně spory je přichycena kotvícím diskem. Přítomnost tohoto injekčního aparátu uloženého ve spoře představuje autapomorfní znak mikrosporidií (Vávra et Lukeš 2013).

Životní cyklus mikrosporidií můžeme rozdělit na tři fáze:

- **infekční fáze** (zahrnuje stádium spory a její uvolnění do prostředí, přenos spory, vystřelení pólové trubice a injekci infekčního obsahu spory do hostitelské buňky)

Pokud je spora aktivována signály jako je změna pH a osmotického tlaku způsobená hydrolyzou zásob trehalózy, která se akumuluje v pozdějších stádiích vývoje spory, dochází k přílivu vody skrze akvaporiny v plasmatické membráně, který způsobí bobtnání posteriorní vakuoly. Následně zvýšený tlak zapříčiní vystřelení pólové trubice, jež pronikne plazmatickou membránou hostitelské buňky, a dojde k vypuzení sporoplazmy skrze pólovou trubici. Infekční sporoplasma je tak protlačena do hostitelské buňky, v níž se dělí binárním dělením. Celý proces germinace je velice rychlý, trvá přibližně 2 sekundy. Druhým z možných způsobů průniku do hostitelské buňky je fagocytóza.

- **merogonie – proliferační vegetativní fáze** (dělení v hostitelské buňce)

Uvnitř hostitelské buňky se sporoplazma za vhodných podmínek dělí a vytváří proliferační formu (meronty). Vývoj meronta může probíhat v přímém kontaktu s cytoplasmou nebo nukleoplasmou hostitele (např. *Enterocytozoon bienersi*, *Nucleospora* spp.) nebo odděleně od prostředí hostitele, a to v parazitoformní vakuole (např. *Encephalitozoon* spp.), sporoformním měchýřku (*Anncaliia* sp.) nebo v endoplasmatickém retikulu hostitele (např. *Endoreticulatus* spp.) (Cali et Takvorian 2014).

- **intracelulární sporogonie** (formace nových spor)

Meronti se vyvíjí ve sporonty, dochází k depozici chitinu do buněčné stěny – plazmatická membrána se zesiluje, cytoplasma se zahušťuje a vytváří se organely spory (vakuola, pólová trubice a kotvící disk). Dochází k množení a dozrávání spor, které vyústí v protržení cytoplazmatické membrány hostitelské buňky a uvolnění spor do extracelulárního prostoru. Spory mohou způsobit invazi okolních tkání nebo se šířit hematogenně.

#### 1.1.4 Mechanismy přenosu infekce

Spory mikrosporidií parazitujících u savců se do vnějšího prostředí dostávají močí a výkaly infikovaných lidí. Mezi nejčastější mechanismy přenosu spor patří fekálně-orální cesta, ať už přímo prostřednictvím kontaktu s infikovaným jedincem nebo požitím kontaminované vody či potravy. Méně často jsou popisovány jiné způsoby přenosu: např. vdechnutím, vektorem nebo sexuálním přenosem. Počáteční místo infekce závisí na způsobu přenosu – nejčastěji se jedná o buňky gastrointestinálního nebo dýchacího traktu. Doposud není zcela objasněno, co vše může být zdrojem infekce.

- **Přenos vodou**

Přenos spor vodou patří mezi nejčastější mechanismy přenosu (Fayer et Santín-Duran 2014). O vysoké odolnosti spor mikrosporidií a jejich schopnosti přežít ve vodě po dlouhou dobu svědčí velké množství provedených experimentů. Například bylo pozorováno, že spory *E. cuniculi*, které byly uchovávány dva roky ve vodě při teplotě 4 °C nebo byly zmrazeny po 24 hodin na -24 °C, zůstaly nadále infekční (Koudela et al. 1999). Shaddock et Polley (1978) popsali infektivitu spor v nechlorované vodě po dobu až 10 let a také po inkubaci 24 hod při pH 4 a pH 9. Dále bylo popsáno, že spory *E. intestinalis* a *E. hellem* jsou schopny přežít ve vodě při teplotách 10–30 °C po několik měsíců (Didier et al. 2004). Mimo to byly publikovány i práce, které dokumentují infektivitu spor několik měsíců po jejich vyschnutí (Kramer 1970). Spory přežívají ve slané i sladké vodě a vzhledem k jejich velmi malým rozměrům jsou obtížně zachytitelné běžnými vodními filtry. Jejich přítomnost byla odhalena na koupalištích (Graczyk et al. 2007), v užitkové vodě, v odpadních a povrchových vodách (Dowd et al. 1998), ale i ve zdrojích vody pitné (Dowd et al. 2003).

- **Alimentární přenos**

U HIV pacientů bylo popsáno několik nákaz mikrosporidiemi, ke kterým pravděpodobně došlo ze špatně tepelně upraveného masa a mořských plodů (Didier et al. 2004). Přítomnost spor mikrosporidií byla také detekována v ovocných džusech, čerstvé zelenině a ovoci

(Fayer et Santín-Duran 2014). V nedávné době byl též zaznamenán výskyt spor *E. bienensii* a *E. cuniculi* v kravském mléce (Lee 2008, Kváč et al. 2015). S požitím kontaminované potravy je také spojena jediná dosud publikovaná epidemie mikrosporidie (Decraene et al. 2012).

#### • Další možné způsoby přenosu

Přenos spory do hostitelského organismu je možný vdechnutím kontaminovaného aerosolu. Tento přenos byl opakovaně zaznamenán u HIV/AIDS pacientů a příjemců kostní dřeně (Fayer et Santín-Duran 2014). Nejčastějším původcem infekce prostřednictvím vdechnutého aerosolu je druh *E. hellem*. Někdy může být infekce přenesena přímým kontaktem skrze oko, ránou nebo sexuálním stykem (Birthistle et al. 1996, Sharma et al. 2014). V nedávné době byl také prokázán přenos infekce *E. cuniculi* u tří pacientů skrze transplantovaný orgán (Hocevar et al. 2014). Přenos spor na savce prostřednictvím vektoru byl prokázán u druhu *Trachipleistophora hominis* (Weidner et al. 1999) a u dalších druhů mikrosporidií, které napadají jak hmyz, tak člověka, je předpokládán (*Annaliia algerae*, *A. vesicularum*). Transplacentární přenos byl popsán u rodu *Encephalitozoon*, a to u hlodavců, koní, lišek, psů, králíků, morčat a opic (Snowder et al. 1998, Snowder et Shaddock 1999). U člověka tento způsob přenosu doposud prokázán nebyl. U laboratorních zvířat byl experimentálně prokázán i intraperitoneální, intravenózní, intratracheální a intracerebrální přenos infekce (Snowden et al. 1998).

### 1.1.5 Patogenita a klinické příznaky

Klinické příznaky a průběh infekce záleží na druhu mikrosporidie a imunitním stavu jedince (Didier 2005). Nejčastějším projevem mikrosporidie u AIDS pacientů je průjem a malabsorpce živin, ale vyskytuje se u nich mnoho dalších příznaků – hepatitida, peritonitida, keratokonjunktivitida, sinusitida, bronchitida, pneumonie, cystitida, nefritida, myositida a encefalitida (Franzen et Müller 2001). U imunokompetentních osob je průběh infekce často inaparentní. Infekce jsou obvykle perzistující, pomalu rozvíjející a zřídka kdy život ohrožující (Shaddock et Greeley 1989). Vyšší prevalence byla zaznamenána mezi diabetiky, těhotnými ženami, u pracovníků na jatkách, pacientů s průjmem, cestovatelů, seniorů, dětí a homosexuálů (Van Gool et al. 1997, Enriquez et al. 1998, Lopez-Velez et al. 1999, Lores et al. 2000, del Aguila et al. 2001, Müller et al. 2001). Procento nakažených mikrosporidiami u pacientů s AIDS se pohybuje od 2 do 50 % v závislosti na geografické oblasti a použitých diagnostických metodách (Weber et al. 1994,

Kotler et Orestein 1998). Podle těchto údajů byla prevalence mikrosporidiózy u AIDS pacientů odhadnuta na 15 % (Bryan et Schwarz 1999).

Oční infekce se může rozvinout i u osob imunokompetentních. Rizikovým faktorem je zejména poškození oka, ale také užívání kontaktních čoček. Nejčastějšími projevy infekce je keratitida stromatu nebo keratokonjunktivita (Sharma et al. 2014). Jako příčiny oční mikrosporidiózy byly detekovány *Brachiola* sp., *Microsporidium celonensis*, *M. africanum*, *Vittaforma corneae*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *T. hominis* a *T. anthropoptera* (Sharma et al. 2014). Prevalence oční mikrosporidiózy se může regionálně významně lišit, v některých oblastech byla pozorována až 19,7% prevalence u pacientů s keratitidou (Sharma et al. 2014).

Zatímco *E. bienewisi* způsobuje infekce lokalizované v zažívacím nebo méně často v dýchacím traktu, zástupci rodu *Encephalitozoon* diseminují do tkání a mohou způsobit bronchitidu, keratokonjunktivitu, encefalitidu, nefritidu, hepatitidu, myositidu a ve spojitosti s HIV mohou ovlivnit všechny orgánové soustavy (Weber et al. 1994).

### 1.1.6 Terapie

Nejefektivnější léčba mikrosporidiózy u lidí i zvířat je pomocí albendazolu a fumagilinu (Conteas et al. 2000). Fumagilin byl izolován v roce 1949 z *Aspergillus fumigatus*. Během 50. let 20. století byl používán k léčbě amébozy způsobené *Entamoeba histolytica* a později byl úspěšně použit při léčbě mikrosporidiózy u savců, hmyzu a ryb (Weiss 2014). Fumagilin a jeho syntetické analogy jsou účinné proti *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*, *V. corneae* a *E. bienewisi* (Didier 2005, Weiss 2014). Tento lék je však pro lidský organismus toxický. Až u poloviny pacientů léčených fumagilinem byly pozorovány vedlejší účinky léčby jako je neutropenie, trombocytopenie a meningitida (Molina et al. 2002, Audemard et al. 2012).

Albendazol je efektivní při léčbě mikrosporidií rodu *Encephalitozoon*, ale ne vždy je účinný proti *E. bienewisi* (Gross 2003). Mechanismem jeho účinku je vazba na  $\beta$ -tubulin. Vedlejší účinky jsou u tohoto léku vzácné a většinou přechodné (Weiss 2014). Nicméně výsledky práce některých autorů ukazují, že ani včasná léčba mikrosporidiózy způsobená rodem *Encephalitozoon* nemusí být zcela účinná a nemusí vést k úplnému vymizení spor z tkání (Kotková et al. 2013, Lallo et al. 2013).

Testováno bylo mnoho dalších léčiv, většina z nich ale neměla žádné nebo pouze proměnlivé účinky, např. metronidazol, furazolidon nebo nitazoxanid.

Při léčbě AIDS pacientů je účinná kombinovaná antiretrovirální terapie (cART), která obnovením imunitního systému brání rozvinutí mnohých oportunních infekcí včetně mikrosporidiózy.

### **1.1.7 Nejčastější mikrosporidie parazitující u savců**

#### **1.1.7.1 *Enterocytozoon bieneusi***

*Enterocytozoon bieneusi* Desportes, Le Charpentier, Galian, Bernard, Cochand-Priollet, Laverne, Ravisse et Modigliani 1985 byl poprvé detekován u AIDS pacienta s chronickým průjmem. Rod *Enterocytozoon* zahrnuje druhy *Enterocytozoon bieneusi* a *E. salmonis*. *Enterocytozoon bieneusi* infikuje především enterocyty tenkého střeva a žlučové cesty ptáků a savců. Byl ale také nalezen v hepatocytech, slinivce, průduškách a nosním epitelu (Franzen et Müller 2001).

*Enterocytozoon bieneusi* se vyvíjí v přímém kontaktu s cytoplazmou hostitelské buňky mimo parazitoformní vakuolu. Spory jsou nejmenší ze všech mikrosporidií, oválné, tenkostěnné, měřící pouze 1,1–1,6×0,7–1,0 μm. Mají pět až sedm závitů polární trubice uspořádaných do dvou řad (Vávra et Larrson 1999).

*Enterocytozoon bieneusi* můžeme nalézt u mnoha hostitelů: kromě člověka byl popsán například u prasat a koček (Rinder et al. 2000), telat (Dengjel et al. 2001), kuřat (Reetz et al. 2002), lam (Dengjel et al. 2001), psů a koz (Lores et al. 2002), králíků (del Aguila et al. 1999), mývalů, ondatr, bobrů, lišek (Sulaiman et al. 2004), divokých prasat (del Aguila et al. 2004), pštrosů, holubů (del Aguila et al. 2004, Haro et al. 2005), koní, kuduů (Santín et Fayer 2011), šimpanzů, goril a opic (Sak et al. 2011a, Karim et al. 2014).

Dosud bylo na základě analýzy variability 243-bp ribozomální ITS (Internal Transcribed Spacer) popsáno 201 genotypů *E. bieneusi*, z toho bylo 54 identifikováno u člověka, 33 u zvířat i člověka a 102 genotypů bylo nalezeno u zvířecích hostitelů (Fayer et Santín-Duran 2014). Další genotypy byly nalezeny ve vodě a jejich hostitel je neznámý. Tyto genotypy můžeme rozdělit nejméně do šesti skupin, přičemž většina lidských izolátů spadá do skupiny 1, do skupiny 2 se řadí izoláty získané z dobytka, skupina 3 a 4 zahrnuje izoláty, které byly detekovány u ondatry a mývalů, skupina 5 izoláty z primátů a skupina 6 izoláty nalezené u psů (Guo et al. 2014).

### 3.1.7.2 *Enterocytozoon* spp.

Rod *Encephalitozoon* zahrnuje čtyři druhy *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* a *E. romaleae*, přičemž první tři zástupci mohou infikovat člověka. Všechny druhy rodu *Encephalitozoon* se vyvíjejí v parazitoforní vakuole. Spory dosahují rozměrů 2,0–2,5×1,0–1,5 μm a polární trubice tvoří pět až sedm závitů (Franzen et Müller 2001).

Zástupci rodu *Encephalitozoon* jsou na rozdíl od *E. bienewisi* úspěšně pěstováni v buněčných kulturách.

***Encephalitozoon cuniculi*** Levaditi, Nicolau et Schoen 1923 byl první pozorovanou mikrosporidií u savců (Wright et Craighead 1922) a je současně také nejlépe prostudovanou mikrosporidií napadající savce. *Encephalitozoon cuniculi* způsobuje diseminované infekce téměř ve všech orgánových systémech (Mertens et al. 1997). Byl popsán u hlodavců, zajíců, ovcí, prasat, koz, koní, psů, lišek a primátů (Shadduck et Pakes 1971).

V současné době jsou známy čtyři genotypy, které jsou rozlišovány podle počtu GTTT opakování v rámci ITS: genotyp I pochází z králíků, genotyp II z myši, genotyp III ze psů a genotyp IV byl popsán u HIV pozitivního pacienta (Shadduck 1969, Shadduck et al. 1978, Didier et al. 1998, Talabani et al. 2010). První tři genotypy *E. cuniculi* byly nalezeny jak u člověka, tak u zvířat, předpokládá se tedy jejich zoonotický potenciál.

***Encephalitozoon hellem*** Didier, Didier, Friedberg, Stenson, Orenstein, Yee, Tio, Davis, Vosbrink et Shadduck 1991 je morfologicky podobný *E. cuniculi* a původně byl za něj mylně považován. Odlišen byl až za použití biochemických a imunologických metod v roce 1990, kdy byl prokázán jako etiologické agens keratokonjunktividy u HIV pozitivních pacientů (Didier et al. 1991). Napadá také dýchací a urogenitální trakt a častá je jeho diseminace do dalších tkání (Didier et al. 1991, Schwartz et al. 1992). Kromě člověka byl detekován u myši, králíků, ptáků (Slodkowiec-Kowalska 2006a, Kašičková et al. 2007), kaloně (Childs-Sanford et al. 2006), goril (Sak et al. 2011a) a scinků (Koudela et al. 1998). Při pokusech v tkáňových kulturách bylo zjištěno, že se mnohem lépe množí při teplotě 40 °C než *E. cuniculi*, což vypovídá o jeho přizpůsobení tělesné teplotě ptáků (Waters 2006).

Izoláty *E. hellem* jsou děleny do pěti genotypů na základě variability ITS, IGS a genu pro PTP (polar tube protein) (Haro et al. 2003). Na základě typu repetice jsou rozlišovány dvě alelické rodiny: první tvoří genotypy 1A, 1C a 1D a do druhé spadají genotypy 2B a 2C (Haro et al. 2003).

***Encephalitozoon intestinalis*** (Cali, Kotler, Orenstein 1993) (syn. *Septata*) byl pozorován u oslů, zeber, psů, prasat, krav, koz (Bornay-Llinares et al. 1998), goril (Graczyk et al.

2002), koal (Nimmo et al. 2007), lišek (Murphy et al. 2006), sláviček (Graczyk et al. 2004) a člověka (Cali et al. 1993). Od *E. bienewsi* byl odlišen v roce 1993 (Cali et al. 1993). *Encephalitozoon intestinalis* napadá zažívací trakt, žlučové cesty a může se rozšířit do ledvin, očí a nosních dutin (Orenstein et al. 1992). Jedná se o druhou nejčastěji detekovanou mikrosporidii u člověka. Na rozdíl od *E. cuniculi* a *E. hellem* nejsou u této mikrosporidie popisovány žádné genotypy.

## **1.1.8 Mikrosporidie a mikrosporidíóza primátů**

### **1.1.8.1 Mikrosporidie u opic a poloopic**

Mikrosporidie u opic a poloopic byly až na jednu výjimku detekovány výhradně u jedinců žijících v zajetí (Butel et al. 2015). Zaznamenány byly buď jako etiologická agens mikrosporidíózy u jedinců s imunodefektem nebo byla zjištěna přítomnost spor u imunokompetentních jedinců, kteří nevykazovali žádné projevy nemoci (Guscetti et al. 2003, Reetz et al. 2004, Asakura et al. 2006, Juan-Sallés et al. 2006, Slodkowitz-Kowalska et al. 2006b, Davis et al. 2008, Li et al. 2011, Karim et al. 2014). Nákazy mikrosporidii rodu *Encephalitozoon* nebo *Enterocytozoon* byly popsány celkem u 16 druhů opic a poloopic (Tabulka 1). Někteří z těchto primátů slouží také jako modelové organismy pro studium lidské mikrosporidíózy (*Macaca mulata*, *Chlorocebus pygerythrus*).

Vnímavost makaků (*Macaca mulata*) k nákaze *Encephalitozoon* sp. byla prokázána už v roce 1979 intracerebrální inokulací (Shaddock et al. 1979). U kočkodanů (*Chlorocebus pygerythrus*) byl popsán vertikální přenos *E. cuniculi* (van Dellen et al. 1989). Průběh nákazy *E. cuniculi* a *E. hellem* v souvislosti s progradující imunodeficiencí byl zkoumán u SIV pozitivních makaků (*Macaca mulata*) (Didier et al. 1994). Zatímco u skupiny zdravých jedinců nebyly pozorovány žádné příznaky nemoci, u skupiny SIV pozitivních jedinců, kteří trpěli postupným úbytkem CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů, bylo pozorováno zvyšující se množství vyloučených spor v trusu a moči a jejich následný úhyn.

První zdokumentovaný přenos *E. bienewsi* mezi dvěma hostiteli pochází z roku 1997, kdy byla experimentálně přenesena nákaza mezi AIDS pacientem a SIV pozitivním makakem (Tzipori et al. 1997). SIV pozitivní makaci byli také experimentálně nakaženi *E. bienewsi* ve dvou následujících studiích (Mansfield et al. 1998, Green et al. 2004).

**Tabulka 1: Přehled popsaných druhů a genotypů mikrosporidií u opic a poloopic**

<b>Hostitel</b>	<b>Druh/genotyp</b>	<b>Reference</b>
<b>Strepsirrhini</b> (poloopice)		
<i>Eulemur albifrons</i>	<i>E. bieneusi</i> Peru 11, PigEBITS, WL15, D, Peru8	Karim et al. 2014
<i>Eulemur macaco</i>	<i>E. bieneusi</i>	Slodkowicz-Kowalska et al. 2006b
<b>Haplorrhini</b> (vyšší primáti)		
<b>Catarrhini</b> (opice starého světa)		
<i>Callicebus moloch cupreus</i>	<i>Encephalitozoon</i> sp.	Seibold et Fussell 1973
<i>Cercopithecus cephus</i>	<i>E. intestinalis</i>	Butel et al. 2015
<i>Cercopithecus neglectus</i>	<i>E. bieneusi</i> BSH	Du et al. 2015
<i>Cercocebus agilis</i>	<i>E. hellem</i>	Butel et al. 2015
<i>Lemur catta</i>	<i>E. cuniculi</i>	Yabsley et al. 2007
<i>Macaca fascicularis</i>	<i>E. bieneusi</i> IV, CM1, CM2, CM3, D, Peru8, Peru 11, Henan-V, Macaque3, Macaque4	Karim et al. 2014
<i>Macaca fuscata</i>	<i>E. bieneusi</i> Henan-V	Karim et al. 2014
	<i>E. bieneusi</i> Peru 11, WL15	Ye et al. 2012
<i>Macaca mulatta</i>	<i>E. bieneusi</i> EpbC, Peru8,I, Henan-V, BEB6, Type IV, PigEBITS7, CM1, CM4 – 7, Macaque1, Macaque2	Karim et al. 2014
	<i>E. bieneusi</i> D, MH	Du et al. 2015
<i>Papio anubis</i>	<i>E. bieneusi</i> A, D, Peru7, Peru 11, KB-1 – KB-6	Li et al. 2011
<i>Papio hamadrayas</i>	<i>E. bieneusi</i> D	Du et al. 2015
<i>Rhinopithecus roxellana</i>	<i>E. bieneusi</i> D, BEB6	Du et al. 2015
	<i>E. cuniculi</i> III	Asakura et al. 2006
<i>Saimiri sciureus</i>	<i>Encephalitozoon</i> sp.	Anver et al. 1972
	<i>Encephalitozoon</i> sp.	Brown et al. 1973
	<i>E. bieneusi</i> XH	Du et al. 2015
	<i>Encephalitozoon</i> sp.	Zeman et Baskin 1985
<b>Platyrrhini</b> (opice nového světa)		
<i>Callimico goeldii</i>	<i>E. cuniculi</i> II	Davis et al. 2008
<i>Saguinus oidipus</i>	<i>E. cuniculi</i> III	Juan Sallés et al. 2006 Reetz et al. 2004
<i>Saguinus imperator</i>	<i>E. cuniculi</i> III	Juan Sallés et al. 2006 Guscetti et al. 2003



### 1.1.8.2 Mikrosporidie u lidoopů

Doposud bylo publikováno pouze 5 studií, které popisují přítomnost mikrosporidií u lidoopů (Graczyk et al. 2002, Sak et al. 2011a, 2013, 2014, Butel et al. 2015). Tři z nich se zabývají výskytem těchto parazitů u volně žijících goril (Graczyk et al. 2002, Sak et al. 2013, 2014), čtvrtá se zabývá jejich popisem u goril, šimpanzů a bonobů (Sak et al. 2011a) a poslední publikace pak zkoumá souvislost mezi SIV (Simian immunodeficiency virus) a nákazou mikrosporidii u divoce žijících šimpanzů, goril a bonobů (Butel et al. 2015). Druhy a genotypy zaznamenané v těchto studiích jsou uvedeny v tabulce 2. U orangutanů mikrosporidie doposud popsány nebyly.

Populace kriticky ohrožených horských goril (*Gorilla beringei beringei*) je rozdělena na dvě subpopulace žijící v národním parku Bwindi a národním parku Virunga Volcanoes a každá z nich byla předmětem jedné studie. Horskými gorilami v národním parku Bwindi v Ugandě se zabýval Graczyk et al. (2002), který popsal výskyt *E. intestinalis* u tří habituovaných horských goril a dvou pracovníků národního parku. Vzhledem k tomu, že byl detekován jediný genotyp, který byl u nakažených osob i goril totožný, je pravděpodobné, že došlo k přenosu nákazy z goril na člověka nebo naopak (Graczyk et al. 2002). Mikrosporidie u habituovaných horských goril v národním parku Volcanoes ve Rwandě studoval Sak s kolektivem (2014). Zaznamenaná byla přítomnost *E. cuniculi* genotyp I a II a *Enterocytozoon bieneusi* genotyp Gorilla 2 a Gorilla 4–8.

Mikrosporidie u goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) v různých stupních habituace byly studovány v Středoafričské republice (Sak et al. 2013). Byla zjištěna přítomnost *E. cuniculi* genotypů I a II a *E. bieneusi* genotyp D a nově popsané genotypy Gorilla 1–3. Studie neukázala vliv habituace na výskyt mikrosporidií.

Mikrosporidíóza byla zkoumána také u šimpanzů (*Pan troglodytes*), bonobů (*Pan paniscus*), goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) a členů personálu ze 13 evropských zoologických zahrad a 2 afrických rezervací. Mikrosporidie byly nalezeny na všech zkoumaných místech s celkovou prevalencí 36,7 %. Byla popsána přítomnost *E. cuniculi* genotypů I a II, *E. hellem* genotyp 1A, *E. bieneusi* genotypy EpbA, PigEBITS5 a D (Sak et al. 2011a).

Souvislost mezi výskytem SIV a nákazou mikrosporidii u primátů v Kamerunu a Demokratické republice Kongo studoval Butel s kolektivem (2015). Ačkoli žádný vliv nákazy SIV na výskyt mikrosporidií pozorován nebyl, byla zaznamenaná řada nálezů *E. intestinalis* a *E. hellem* (Butel et al. 2015).

**Tabulka 2: Přehled popsaných druhů a genotypů mikrosporidií u lidoopů**

Hostitel	Druh/genotyp	Reference
<i>Gorilla b. beringei</i>	<i>E. intestinalis</i>	Graczyk et al. 2002
	<i>E. bieneusi</i> gorilla 2, 4–8 <i>E. cuniculi</i> I a II	Sak et al. 2014
<i>Gorilla g. gorilla</i>	<i>E. hellem</i>	Butel et al. 2015
	<i>E. cuniculi</i> I a II	Sak et al. 2011, 2013
	<i>E. bieneusi</i> gorilla 1–3, D <i>E. hellem</i>	Sak et al. 2013 Butel et al. 2015
<i>Pan troglodytes</i>	<i>E. intestinalis</i>	Sak et al. 2011, Butel et al. 2015
	<i>E. bieneusi</i> EpbA, D,PigEBITS5 <i>E. cuniculi</i> I a II	Sak et al. 2011
	<i>E. hellem</i>	Butel et al. 2015
<i>Pan paniscus</i>	<i>E. cuniculi</i> I	Sak et al. 2011

### 1.1.8.3 Mikrosporidie u člověka

Doposud bylo u člověka popsáno 16 druhů mikrosporidií, přičemž převážný počet infekcí je způsoben druhy *E. bieneusi*, *E. intestinalis*, *E. hellem* a *E. cuniculi*; ostatní se vyskytují pouze ojediněle (Tabulka 3).

Za vůbec nejčastější druh mikrosporidie infikující člověka je považován *E. bieneusi*, který představuje více než 90 % všech zaznamenaných infekcí (Guo et al. 2014). Pozorované prevalence *E. bieneusi* v populaci se mezi sebou výrazně liší, a to v závislosti na imunitním stavu daných jedinců a dalších faktorech. Studie prováděné u AIDS pacientů před zahájením cART (1989-1998) odhalily až 70% prevalenci *E. bieneusi* (Weiss et al. 2014). Vysoké prevalence tohoto parazita byly rovněž zaznamenány v rozvojových zemích, kde dosahují až 70 % (Matos et al. 2012).

**Tabulka 3: Přehled druhů mikrosporidií infikujících člověka**

<b>Druh</b>	<b>Predilekční lokalizace infekce</b>
<i>Anncaliia algerae</i> (Vávra et Undeen 1970, Lowman et al. 2000) (syn. <i>Nosema algerae</i> Vávra et Undeen 1970; syn. <i>Brachiola algerae</i> )	oko, sval
<i>Anncaliia connori</i> (Sprague 1974) Franzen, Nassonova, Schölmerich et Isis 2006 (syn. <i>Brachiola connori</i> Cali, Weiss et Takvorian 2002; syn. <i>Nosema connori</i> )	systemové onemocnění
<i>Anncaliia vesicularum</i> Franzen, Nassonova, Schölmerich et Issi 2006 (syn. <i>Brachiola vesicularum</i> Cali, Takvorian, Lewin, Rendel, Sian, Bittner, Tanowitz, Keohane et Weiss 1998)	sval
<i>Encephalitozoon cuniculi</i> Levaditi, Nicolau et Schoen 1923 (syn. <i>Nosema cuniculi</i> )	systemové onemocnění
<i>Encephalitozoon hellem</i> Didier, Didier, Friedberg, Stenson, Orenstein, Yee, Tio, Davis, Vosbrink et Shadduck 1991	oko, systemové onemocnění
<i>Encephalitozoon intestinalis</i> (Cali, Kotler, Orenstein 1993) (syn. <i>Septata intestinalis</i> )	tenké střevo, systemové onemocnění
<i>Enterocytozoon bieneusi</i> Desportes, Le Charpentier, Galian, Bernard, Cochand-Priollet, Laverne, Ravisse et Modigliani 1985	tenké střevo, žlučové cesty
<i>Microsporidium africanum</i> Canning et Lom 1986	oko
<i>Microsporidium ceylonensis</i> Canning et Lom 1986	oko
<i>Microsporidium CU</i> Suankratay, Thiansukhon, Nilaratanakul, Putaporntip et Jongwutiwes 2012	sval
<i>Nosema ocularum</i> Cali, Meisler, Lowder, Lembach, Ayers, Takvorian, Rutherford, Longworth, McMahon et Bryan 1991	oko
<i>Pleistophora ronniae</i> Cali et Takvorian 2003	sval
<i>Trachipleistophora anthropoptera</i> Vávra, Yachnis, Shadduck et Orenstein 1998	oko, systemová infekce
<i>Trachipleistophora hominis</i> Hollister, Canning, Weidner, Field, Kench et Marriott 1996	oko, sval
<i>Tubulinosema acridophagus</i> (Henry 1967) Streett et Henry 1993 (syn. <i>Nosema acridophagus</i> )	sval, systemová infekce
<i>Vittaforma corneae</i> Silviera et Canning 1995 (syn. <i>Nosema corneum</i> Shadduck et al. 1990)	oko, močové cesty

## 1.2 Kryptosporidie

Kryptosporidie jsou jednobuněční epicelulární paraziti, kteří napadají gastrointestinální a respirační trakt všech tříd obratlovců včetně člověka. Jsou rozšířeni celosvětově. Kryptosporidie jsou jednou z nejčastějších příčin průjemových onemocnění u člověka a po rotavirech představují druhou nejčastější příčinu průjmu u dětí do pěti let věku (Wheeler et al. 2007, Checkley et al. 2015).

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

### 1.2.1 Historie

První zmínka o kryptosporidiích pochází z roku 1907, kdy Ernest Edward Tyzzer pojmenoval prvoka nalezeného v žaludečním epitelu myši jako *Cryptosporidium muris* Tyzzer 1907. V roce 1910 pak byla u tohoto parazita popsána vývojová stádia a *Cryptosporidium* byl uznán jako nový rod (Tyzzer 1910). O dva roky později byl v tenkém střevě myši detekován další druh *Cryptosporidium parvum*, jehož oocysty byly menší než u *C. muris* (Tyzzer 1912). Jako třetí druh byl v roce 1955 identifikován u krocanů *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955). V sedmdesátých letech pak byla publikována řada prací popisujících kryptosporidiózu u různých hostitelů: skotu, ovcí, prasat, koní, krocanů, králíků, opic, hadů a morčat. Těmto organismům nebyl přikládán medicínský význam až do roku 1976, kdy byly nezávisle na sobě publikovány dvě studie potvrzující výskyt kryptosporidií u člověka (Meisel et al. 1976, Nime et al. 1976).

Od roku 1984 bylo zaznamenáno ve světě více než 100 epidemií kryptosporidiózy: mezi největší 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 ve vědeckých pojednáních. Došlo k nákaze 403 000 osob, 1 000 lidí bylo hospitalizováno a nejméně 100 jí podlelo, většinou imunodeficitní jedinci (Smith et Rose 1998).

### 1.2.2 Taxonomie

Kryptosporidie (třída Cryptosporidea) jsou jednobuněční paraziti řazení do kmene Apicomplexa, říše Alveolata. V rámci kmene Apicomplexa byly kryptosporidie na základě morfologických podobností a podobností ve vývojovém cyklu dříve řazeny do skupiny Eucoccidiorida (Levine 1984). Od kokcií se však odlišují řadou znaků, jako je například jejich zvláštní epicelulární lokalizace v hostitelské buňce, poměrně nízká hostitelská specifita, rezistence k antimikrobiálním lékům nebo schopnost autoinfekce (Tzipori 1983). Současné fylogenetické analýzy pak předpokládají blízkou příbuznost kryptosporidií s gregarínami (Carreno et al. 1999, Cavalier-Smith et al. 2014). V rámci rodu *Cryptosporidium* v současné době rozeznáváme 28 platných druhů (Tabulka 4) a více než 100 genotypů. Jejich identifikace je založena na morfologii vývojových stádií, genetických odlišnostech a hostitelské specificitě.

Kryptosporidie můžeme rozlišit na dvě monofyletické linie 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  $\mu\text{m}$ .

**Tabulka 4: Přehled platných druhů kryptosporidií**

<b>druh</b>	<b>typický hostitel</b>
<i>C. andersoni</i> Lindsay, Upton, Owens, Morgan, Mead et Blagburn, 2000	skot*
<i>C. baileyi</i> Current, Upton et Haynes, 1986	drůbež*
<i>C. bovis</i> Fayer, Santín et Xiao, 2005	skot
<i>C. canis</i> Fayer, Trout, Xiao, Morgan, Lai et Dubey, 2001	pes*
<i>C. cuniculus</i> Inman et Takeuchi, 1979	králík*
<i>C. erinacei</i> Kváč, Hofmannová, Hlásková, Květoňová, Vítovec, McEvoy et Sak, 2014	ježek
<i>C. fayeri</i> Ryan, Power et Xiao, 2008	klokan*
<i>C. felis</i> Iseki, 1979	kočka*
<i>C. fragile</i> Jirků, Valigurová, Koudela, Křížek, Modrý et Šlapeta, 2008	obojživelníci
<i>C. galli</i> Ryan, Xiao, Read, Sulaiman, Monis, Lal, Fayer et Pavlásek, 2003	ptáci
<i>C. hominis</i> Morgan-Ryan, Fall, Ward, Hijjawi, Sulaiman, Fayer, Thompson, Olson, Lai et Xiao, 2002	člověk*
<i>C. huwi</i> Ryan, Paparini, Tong, Yang, Gibson-Kueh, O'Hara, Lymbery et Xiao, 2015	ryby
<i>C. macropodum</i> Power et Ryan, 2008	klokan
<i>C. meleagridis</i> Slavin, 1955	krocan*
<i>C. molnari</i> Alvarez-Pellitero et Sitjà-Bobadilla, 2002	ryby
<i>C. muris</i> Tyzzer, 1907	hlodavci*
<i>C. parvum</i> Tyzzer, 1912	savci*
<i>C. ryanae</i> Fayer, Santín et Trout, 2008	skot*
<i>C. rubeyi</i> Li, Pereira, Larsen, Xiao, Phillips, Striby, McCowan et Atwill 2015	sysel
<i>C. scrofarum</i> Kváč, Kestřánová, Pinková, Květoňová, Kalinová, Wagnerová, Kotková, Vítovec, Ditrich, McEvoy, Stenger et Sak, 2013	prase*
<i>C. serpentis</i> Levine, 1980	plazi
<i>C. suis</i> Ryan, Monis, Enemark, Sulaiman, Samarasinghe, Read, Buddle, Robertson, Zhou, Thompson et Xiao, 2004	prase*
<i>C. tyzzeri</i> Ren, Zhao, Zhang, Ning, Jian, Wang, Lv, Wang, Arrowood et Xiao, 2012	myš*
<i>C. ubiquitum</i> Fayer, Santín et Macarisin, 2010	koza, ovce*
<i>C. varanii</i> Pavlásek et Ryan, 2008	plazi
<i>C. viatorum</i> Elwin, Hadfield, Robinson, Rouch et Chalmes, 2012	člověk*
<i>C. wrairi</i> Vetterling, Jervis, Merrill et Sprinz, 1971	morče*
<i>C. xiaoi</i> Fayer et Santín, 2009	ovce

\*Druhy nalezené u člověka

### 1.2.3 Morfologie a vývojový cyklus

Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní, skládá se z asexuálních i sexuálních stádií. 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.

- **Excystace**

Endogenní fáze začíná pozřením nebo vdechnutím oocysty. Ta se následně dostává do respiračního nebo trávicího traktu, kde dochází k excystaci. Sutura, která je ve stěně oocysty, praská vlivem nízkého pH žaludku, pankreatických enzymů a žlučových solí. Oocysta je tak otevřena a čtyři sporozoiti ji mohou opustit, jsou volně pohybliví a pronikají k cílovým buňkám – enterocytům. Vznikají vývojová stadia – trofozoiti, kteří jsou v hostitelských buňkách umístěni epicelulárně (tj. intracelulárně, ale extracytoplazmaticky) v parazitoforní vakuole.

- **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. Vylučování oocyst je intermitentní.

U člověka může celý vývojový cyklus proběhnout během 4 dní (DuPont et al. 2011).

## **1.2.4 Mechanismy přenosu infekce**

Kryptosporidie se přenáší fekálně-orální cestou. Mezi nejčastější mechanismy přenosu infekce patří pozření kontaminované vody nebo potravy (Fayer et Xiao 2007). Hostitelé mohou být nakaženi také vdechnutím, přímým kontaktem s postiženým jedincem nebo jeho výkaly. Velikost infekční dávky závisí na mnoha faktorech, nicméně bylo zaznamenáno, že pouhých 10 oocyst dostačuje pro způsobení infekce u člověka (Chappell et al. 2006).

### • Přenos vodou

Přenos vodou je považován za nejčastější způsob přenosu kryptosporidií. Oocysty byly nalezeny v odpadní, užitkové, povrchové, mořské, rekreační i pitné vodě (Fayer 2004). Znečištění pitné vody oocystami kryptosporidií bývá často zapříčiněno průsakem odpadních vod v důsledku záplav a silných dešťů (Bridgman et al. 1995, Yamamoto et al. 2000). Oocysty jsou vysoce odolné vůči podmínkám vnějšího prostředí, odolávají tak snadno běžným úpravám pitné vody jako je chlorování. Spolehlivějším způsobem jak inaktivovat oocysty kryptosporidií je jejich ozonizace a úprava UV zářením (Korich et al. 1990, Betancourt et Rose 2004).

Schopnost přežívat dlouhou dobu ve vodě i při nízkých teplotách byla opakovaně zjištěna v mnoha experimentech – například oocysty *C. parvum* zůstaly infekční i po šesti měsících, kdy byly uchovávány ve vodě při teplotách 0, 5, 10, 15 a 20 °C a tři měsíce při uchovávání při teplotách 25 a 30 °C (Fayer 2004).

### • Přenos potravou

Mezi nejčastější zdroje nákazy z potravy patří mořské plody, syrové ovoce a zelenina, které snadno mohou přijít do styku s kontaminovanou vodou a jsou také často konzumovány bez dostatečné tepelné úpravy (Dawson 2005, Robertson et al. 2005).

### • Další možné způsoby přenosu (přímým kontaktem, zoonotický přenos)

Hostitelé mohou být rovněž infikováni přímým kontaktem s infikovanou osobou – přenos kryptosporidií byl pozorován v rodinách, školách, školách, v domech s pečovatelskou službou a v nemocnicích (Ribeiro et Palmer 1985, Hannah et Riordan 1988, Ortega et al. 2006). Vzhledem k tomu, že mnoho druhů kryptosporidií se vyznačuje širokou hostitelskou specifiitou, mohou být snadno přeneseny ze zvířete na člověka. Zoonotický přenos byl zaznamenán v mnoha studiích (Pedraza-Diaz et al. 2000, Cacciò et al. 2002, Mahdi et Ali 2002, Preiser et al. 2003, Wang et al. 2014).

## 1.2.5 Patogenita a klinické příznaky

Klinické příznaky infekce jsou závislé na řadě faktorů, zejména na imunitním stavu hostitele a lokalizaci infekce. Hlavním projevem kryptosporidiózy je silný vodnatý průjem, který může být doprovázen abdominální bolestí, zvracením, zvýšenou teplotou a celkovou slabostí (Current et Garcia 1991). Zatímco u imunokompetentních jedinců probíhá infekce často bez příznaků, u imunodeficientních může mít kryptosporidióza velmi závažný průběh



a diseminovat do dalších tkání – žlučníku, slinivky, respiračního traktu nebo močového měchýře (Clavel 1996).

Kryptosporidióza je častá zejména u HIV pozitivních jedinců, imunosuprimovaných pacientů podstupujících chemoterapii, příjemců orgánů a kostní dřeně, pacientů na hemodialýze a osob vystavených rizikovým sexuálním praktikám (Sreedharan et al. 1996, Hunter et Nichols 2002, Turkcapar et al. 2002, Tappeh et al. 2006). Předpokládá se, že kryptosporidióza souvisí také s podvýživou a poruchami růstu u dětí v rozvojových zemích (Checkley et al. 2015).

### 1.2.6 Terapie

Na rozdíl od mikrosporidiózy není léčba kryptosporidiózy příliš účinná a zaměřuje se především na léčbu symptomů. Mezi léčiva, u kterých byl prokázán částečný efekt, patří například paromycin, azitromycin, rifaximin a rifabutin (Checkley et al. 2015). Nejběžněji používaným lékem je nitazoxanid, jehož účinnost se u imunokompetentních osob pohybuje kolem 56–96 % (Rossignol et al. 2001, 2006, Amadi et al. 2002). Neúčinným je však při léčbě kryptosporidiózy u HIV pozitivních osob (Amadi et al. 2009).

U nehumánních primátů byla zaznamenána úspěšná léčba kryptosporidiózy pomocí paromycinu, a to u dvou kosmanů bělovousých v chronické fázi infekce (Hahn et Capuano 2010).

### 1.2.7 Nejčastější kryptosporidie u primátů

*Cryptosporidium parvum* Tyzzer 1912 patří mezi kryptosporidie napadající epitel tlustého a tenkého střeva. *Cryptosporidium parvum* se vyznačuje nízkou hostitelskou specifitou a je pravděpodobně infekční pro většinu druhů savců – doposud byl popsán u 150 druhů (Feng 2010). 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, také označován jako typ H), napadající převážně člověka a *C. parvum* (dříve genotyp II – bovinní, také označován jako typ C). *Cryptosporidium parvum* představuje nejlépe prozkoumaný druh kryptosporidií a současně slouží jako modelový druh. Velikost jeho oocyst dosahuje 5,0×4,5 μm (Upton et Current 1985).

Vyskytuje se zejména u přežvýkavců (skot, jeleni, kozy a ovce) a je infekční zvláště pro neonatální zvířata. Hospodářská zvířata představují významný rezervoár *C. parvum* pro člověka (Xiao et al. 2004, Chako et al. 2010).

Na základě analýzy sekvence kódující gp60 (60 kDa glykoprotein) se *C. parvum* dělí do 14 alelických rodin (IIa–IIo) (Xiao 2010, Cui et al. 2014). Zatímco subtypy IIa a IId byly nalezeny u přežvýkavců i člověka a jsou tak považovány za zoonotické, alelické rodiny IIc a IIe mají zcela antropotický charakter. Ostatní alelické rodiny jsou nacházeny vzácně (Cui et al. 2014).

*Cryptosporidium hominis* Morgan-Ryan, Fall, Ward, Hijjawi, Sulaiman, Fayer, Thompson, Olson, Lai et Xiao, 2002 je znám jako původce kryptosporidiózy u lidí. Na rozdíl od *C. parvum* je *C. hominis* považováno za neinfekční pro myši, krysy, kočky, psy a dobytek, později však byla experimentálně zjištěna jeho infektivita pro telata, jehňata a selata (Xiao et al. 2004, Giles et al. 2001).

Na základě analýzy sekvence kódující gp60 se v rámci *C. hominis* rozlišuje 6 alelických rodin Ia, Ib, Id, Ie, If a Ig (Xiao 2010). Většina epidemií kryptosporidiózy v USA a Evropě je spojována s *C. hominis* subtypem IbA10G2 (Xiao et al. 2009).

Oocysty *C. hominis* jsou morfologicky identické s *C. parvum* a jejich velikost dosahuje 5,0×4,5 μm (Morgan-Ryan et al. 2002).

## **1.2.8 Kryptosporidie a kryptosporidióza primátů**

### **1.2.8.1 Kryptosporidie u opic a poloopic**

Přítomnost oocyst kryptosporidií byla popsána u mnoha opic a poloopic, především u jedinců žijících v zajetí, pouze jediná práce popisuje nález kryptosporidií u volně žijících jedinců (Tabulka 5) (Parsons et al. 2015). Ve většině případů se však jedná o pouhé určení rodu na základě morfologických znaků bez jejich bližšího zařazení do druhu, genotypu nebo subtypu (Heuschele et al. 1986, Russell et al. 1987, Miller et al. 1990, Muriuki et al. 1997, 1998, Hope et al. 2004, Leggese et Erko 2004). Pozdější studie využívající metody molekulární biologie pak popisují přítomnost celkem pěti druhů kryptosporidií: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. muris*, *C. felis* a *C. andersoni* (Da Silva et al. 2003, Ekanayeke et al. 2007, Hahn et Capuano 2010, Ye et al. 2012, Karim et al. 2014, Du et al. 2015).

Bylo pozorováno, že výskyt kryptosporidií u opic je obvykle vyšší než 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em a člověkem (Feng 2010).

Nákaza kryptosporidiiemi je také jedna z oportunních infekcí, která byla pozorována u makaků (*Macaca mulatta*) po experimentální nákaze SIV (Kuhn et al. 1997, Kaup et al. 1998). Infekce byla způsobena druhu *C. parvum* nebo *C. hominis* a u některých jedinců byla doprovázena průjmy. Jiné experimenty ukazují, že jedinci, kteří byli nakaženi kryptosporidiiemi v akutní SIV fázi, měli závažnější průběh infekce než zvířata infikovaná v chronické fázi SIV (Singht et al. 2011). Ve stejné studii byl také pozorován mírnější průběh kryptosporidie u jedinců, kteří jí byli vystaveni v minulosti před nálezem SIV (Singht et al. 2011).

**Tabulka 5: Přehled výskytu *Cryptosporidium* sp. u opic a poloopic**

Hostitel	Druh	Reference
<b>Strepsirrhini (poloopice)</b>		
<i>Eulemur macaco</i>	<i>C. parvum</i>	Gomez et al. 2000
<i>Lemur catta</i>	<i>C. parvum</i>	Gomez et al. 2000
<i>Lemur variegatus</i>	<i>C. parvum</i>	Gomez et al. 2000
<i>Microcebus rufus</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Rasambainarivo et al. 2013
<i>Nycticebus coucang</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Karim et al. 2014
<i>Nycticebus pygmaeus</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Gomez et al. 1992
<i>Propithecus coquereli</i>	<i>C. parvum</i>	Da Silva et al. 2003
<i>Prolemur simus</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Rasambainarivo et al. 2013
<i>Varecia variegata</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Heuschele et al. 1986
<b>Haplorrhini (vyšší primáti)</b>		
<b>Catarrhini (opice starého světa)</b>		
<i>Cercocebus albigena</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Gomez et al. 1992
	<i>C. parvum</i>	Gomez et al. 2000
<i>Cercocebus torquatus</i>	<i>C. parvum</i>	Gomez et al. 1992, 2000
	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Mbaya et Udendeye 2011
<i>Cercopithecus aethiops</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Muriuki et al. 1997, 1998
		Leggese et Erko 2004
<i>Cercopithecus campbelli</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Gomez et al. 1992
<i>Cercopithecus mona</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Mbaya et Udendeye 2011
	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Gomez et al. 1992
<i>Cercopithecus talapoin</i>	<i>C. parvum</i>	Gomez et al. 2000
<i>Erythrocebus patas</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Gomez et al. 1992
<i>Hylobates syndactylus</i>	<i>C. parvum</i>	Gomez et al. 2000
<i>Macaca arctoides</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Lim et al. 2008
	<i>C. muris</i>	Dubey et al. 2002
<i>Macaca fascicularis</i>	<i>C. hominis</i> , <i>C. muris</i>	Karim et al. 2014
	<i>C. hominis</i> , <i>C. muris</i>	Karim et al. 2014
<i>Macaca mulatta</i>	<i>C. muris</i> , <i>C. felis</i> , <i>C. hominis</i>	Ye et al. 2012
	<i>C. andersoni</i> , <i>C. muris</i>	Du et al. 2015
<i>Macaca nemestrina</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Russell et al. 1987
		Miller et al. 1990

Hostitel	Druh	Reference
<i>Macaca radiata</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Wilson et al. 1984 Lim et al. 2008
<i>Macaca sinica</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Ekanayake et al. 2007
<i>Macaca thibetana</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Gomez et al. 2000
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Gomez et al. 2000
<i>Semnopithecus entellus</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Lim et al. 2008
<i>Semnopithecus thersites</i>	<i>C. parvum</i>	Ekanayake et al. 2007
<i>Trachypithecus vetulus</i>	<i>C. parvum</i>	Ekanayake et al. 2007
<i>Trachypithecus francoisi</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Karim et al. 2014 Muriuki et al. 1998
<i>Papio anubis</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Leggese et al. Erko 2004 Hope et al. 2004 Parsons et al. 2015
<i>Papio cynocephalus</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Miller et al. 1990
<i>Papio hamadryas</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Venturini et al. 2006
<b>Platyrrhini</b> (opice nového světa)		
<i>Alouatta fusca</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	de Carvalho Filho et al. 2006
<i>Ateles belzebuth</i>	<i>C. parvum</i>	Gomez et al. 1992, 2000
<i>Ateles paniscus</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Venturini et al. 2006
<i>Callithrix jacchus</i>	<i>C. parvum</i>	Hahn et Capuano 2010
<i>Callithrix penicillata</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	de Carvalho Filho et al. 2006
<i>Cebus apella</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	da Silva et al. 2008
<i>Saimiri boliviensis</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Venturini et al. 2006
<i>Saimiri sciureus</i>	<i>C. parvum</i>	Gomez et al. 2000
<i>Saguinus mystax</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Gillespie et al. 2013
<i>Saguinus oedipus</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Heuschele et al. 1986
<i>Pithecia pithecia</i>	<i>C. parvum</i>	Gomez et al. 2000

### 1.2.8.2 Kryptosporidie u lidoopů

Ačkoli bylo provedeno jen málo studií, které se zabývají výskytem kryptosporidií u lidoopů, nákaza tímto parazitem byla popsána u všech jejich žijících druhů (Tabulka 6).

U goril horských (*Gorilla beringei beringei*) byla detekována přítomnost *C. parvum*, *C. muris* a *C. meleagridis* (Nizeyi et al. 1999, Graczyk et al. 2001, Sak et al. 2014). V národním parku Bwindi v Ugandě bylo zaznamenáno, že 11 ze 100 horských goril je nakaženo *C. parvum* genotypem 2, přičemž více nakažených goril (73 %) bylo v částech parku obydlených lidmi (Nizeyi et al. 1999). V témže parku bylo stejným genotypem nakaženo 21 % členů správy parku, ale pouze 3 % nakažených místních obyvatel, kteří s gorilami nepřicházeli do styku (Nizeyi et al. 2002). Tyto výsledky ukazují na možný přenos infekce mezi gorilami a člověkem. Možnost přenosu infekce mezi gorilou horskou a člověkem diskutuje také další studie z národního parku ve Rwandě (Sak et al. 2014).

V té byla zaznamenána infekce *C. muris* a *C. meleagridis* u goril habituovaných za účelem výzkumu.

U goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) byla popsána přítomnost *C. bovis* a *C. cuniculus* (van Zijll Langhout et al. 2010, Sak et al. 2013, Butel et al. 2015). První nález kryptosporidií u goril nížinných pochází z národních parků Lopé a Moukalaba-Doudou v Gabonu, nákaza zde byla pozorována pouze ve skupině jedinců, kteří byli v úzkém kontaktu s člověkem (van Zijll Langhout et al. 2010). Další práce dokumentuje přítomnost *C. bovis* u habituované gorily ve Středoafričské republice (Sak et al. 2013). Nedávná studie pak zaznamenala infekci *C. cuniculus* u dvou divoce žijících jedinců v Kamerunu (Butel et al. 2015).

U šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*) byla detekována nákaza *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. suis* a *C. hominis* (Butel et al. 2015, Parsons et al. 2015). Kryptosporidie byly u šimpanzů poprvé pozorovány v malajské zoologické zahradě (Lim et al. 2008). Studie z Tanzánie ukázala téměř 9% prevalenci kryptosporidií z 406 vzorků, přičemž častější výskyt parazitů byl pozorován během období dešťů (Gonzales-Moreno et al. 2013). Jiná práce z Tanzánie předpokládá introdukci kryptosporidií z domestikovaných zvířat do populace divokých šimpanzů (Parsons et al. 2014). Navazující studie stejného autora dále poukazuje na možný přenos infekce mezi místním obyvatelstvem, dobyt看kem a volně žijícími primáty (Parsons et al. 2015). U lidí i primátů byla zjištěna přítomnost stejného subtypu *C. hominis* IfA12G2. Dokumentována byla i infekce *C. suis*, která mohla být na šimpanze přenesena ze sympatricky žijících divokých prasat. Práce Butela s kolektivem zkoumala koinfekce SIV a *Cryptosporidium* sp. u divoce žijících primátů (Butel et al. 2015). Ačkoli zde nebyla pozorována žádná závislost, u šimpanzů byla nově popsána infekce druhu *C. cuniculus* a *C. ubiquitum*. U šimpanzů bonobo (*Pan paniscus*) byl popsán rod *Cryptosporidium* na základě morfologie u mladého jedince žijícího v argentinské zoologické zahradě (Venturini et al. 2006).

U orangutanů byly kryptosporidie popsány pouze na základě morfologie, a to u divokého orangutana sumaterského (*Pongo abelii*) a orangutana bornejského žijícího v zajetí (*Pongo pygmaeus*) (Foitová et al. 2005, Lim et al. 2008).

**Tabulka 6: Přehled popsaných druhů kryptosporidií u lidoopů**

Hostitel	Druh/genotyp	Reference
<i>Gorilla b. beringei</i>	<i>C. parvum</i>	Nizeyi et al. 1999, Graczyk et al. 2001
	<i>C. meleagridis</i>	Sak et al. 2014
	<i>C. muris</i>	
<i>Gorilla g. gorilla</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	van Zillj Langhout et al. 2010
	<i>C. bovis</i>	Sak et al. 2013
	<i>C. cuniculus</i>	Butel et al. 2015
	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Lim et al. 2008, Parsons et al. 2014, Gonzales-Moreno et al. 2012
<i>Pan troglodytes</i>	<i>C. cuniculus</i>	Butel et al. 2015
	<i>C. ubiquitum</i>	
	<i>C. suis</i>	Parsons et al. 2015
	<i>C. hominis</i> IfA12G2	
<i>Pan paniscus</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Venturini et al. 2006
<i>Pongo abelii</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Foitová et al. 2005
<i>Pongo pygmaeus</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	Lim et al. 2008

### 1.2.8.2 Kryptosporidie u člověka

Lidská kryptosporidióza je způsobena především druhy *C. parvum* a *C. hominis*, které jsou zodpovědné za více než 90 % všech infekcí (Xiao et Ryan 2004). U těchto dvou druhů je patrná proměnlivost v zeměpisném rozšíření. Zatímco ve Velké Británii a na Novém Zélandu je *C. parvum* u člověka zodpovědné za více infekcí než *C. hominis*, *C. hominis* způsobuje více infekcí v USA, Austrálii a mnoha rozvojových zemích (Adamu et al. 2010).

U člověka byly nalezeny i další druhy kryptosporidií (Tabulka 4) a řada genotypů: *Cryptosporidium* skunk, horse a rabbit genotyp (Robinson et Chalmers 2008), chipmunk I (Feltus et al. 2006) a deer genotyp (Jellison et al. 1999).

Pozorované prevalence kryptosporidiózy u lidí se liší v závislosti na řadě faktorů. Zatímco dřívější studie předpokládaly 1% prevalenci u imunokompetentních osob v rozvinutých zemích a 5–10% prevalenci u obyvatelstva v rozvojových zemích, současné studie založené na PCR a detekci antigenů předpokládají prevalence vyšší (Checkley et al. 2015). Kryptosporidie jsou nacházeny až u 15–25 % dětí s průjmy (Checkley et al. 2015). U HIV osob s průjmovými onemocněními se prevalence pohybuje kolem 34 % (Hunter et Nichols 2002).

## 1.3 *Giardia intestinalis*

*Giardia intestinalis* (Lambl, 1859) Alexeieff 1914 je jednobuněčný bičíkatý parazit, který napadá střevní lumen obratlovců včetně člověka. Patří celosvětově k nejčastějším příčinám průjmových onemocnění (Adam 2001).

### 1.3.1 Historie

Giardie byly poprvé pozorovány v roce 1681 Antoniem van Leeuwenhoekem, který je v dopisu Britské královské vědecké společnosti popsal jako „animacules“, malá pohyblivá zvířátka, která na základě jeho popisu byla později určena jako giardie (Dobell 1920). O bezmála 200 let později tento organismus podrobněji popsal Alfred Giard a český lékař Vilém Dušan Lambl, který ho pojmenoval *Cercomonas intestinalis* (Lambl 1859). V roce 1888 francouzský lékař Raphael Blanchard změnil název tohoto bičíkovce na počest jeho objevitele na *Lamblia intestinalis* (Blanchard 1888). Později však byla uznána priorita rodového názvu *Giardia*, který použil německý vědec Künstler při popisu bičíkovce nalezeného ve střevě žab o několik let dříve před Blanchardem (Alexeieff 1914).

Nyní je za správný název považován *Giardia intestinalis* (Lambl 1859) Alexeieff 1914 se synonymy: *Cercomonas intestinalis* Lambl 1859; *Dicercomonas muris* Lambl 1859 (Grassi 1881); *Hexamita duodenalis* Lambl 1859 (Davaine 1875); *Giardia duodenalis* Davaine 1875 (Deschiens 1921) a *Giardia lamblia* Stiules 1921.

### 1.3.2 Taxonomie

V současnosti je rod *Giardia* společně s rodem *Octomitus* řazen do skupiny Giardiinae v rámci skupiny Diplomonadida, pro kterou je typické zdvojení karyomastigotu (komplex jádra, kinetosomů bičíků a cytoskeletárních útvarů). Diplomonadida patří do skupiny Metamonada, která je součástí říše Excavata (Adl et al. 2005).

V rámci rodu *Giardia* se na základě morfologických a molekulárních znaků rozlišuje 6 druhů, které jsou rovněž charakterizované svým hostitelským spektrem: *G. agilis* Künstler, 1882 byla pozorována u obojživelníků, *G. ardeae* Nöller 1920 a *G. psittaci* Erlandsen et Bremrick 1987 byly nalezeny u ptáků, *G. muris* Grossi 1879 u myši, *G. microti* Kofoid et Christiansen 1915 u hrabošů a *G. intestinalis* (Lambl 1859) Alexeieff 1914, který byl pozorován u mnoha druhů savců.

Zástupci druhu *G. intestinalis* jsou děleni podle genetických odlišností a hostitelské specifity do osmi taxonomických skupin – asambláží (genotypů) označovaných A–H. Někdy je *G. intestinalis* považován za komplex druhů a jednotlivé asambláže označovány vlastními druhovými názvy (Monis et al. 2009) (Tabulka 7). V rámci asambláží jsou dále rozlišovány subtypy, a to na základě multilokusových analýz genů pro *gdh* (glutamát-dehydrogenázu), *tpi* (triosafosfát isomerázu), *elongační faktor 1- $\alpha$*  (EF 1- $\alpha$ ) a *bg* ( $\beta$ -giardin).

**Tabulka 7: Přehled asambláží *Giardia intestinalis* a jejich hostitelů**

Asambláž	Hostitelé	Název
<b>A</b>	primáti včetně člověka, dobytek, psi, kočky a někteří savci	<i>G. duodenalis</i>
<b>B</b>	primáti včetně člověka, psi, kočky a někteří savci	<i>G. enterica</i>
<b>C+D</b>	psovité šelmy	<i>G. canis</i>
<b>E</b>	dobytek	<i>G. bovis</i>
<b>F</b>	kočky	<i>G. cati</i>
<b>G</b>	krysy	<i>G. simondi</i>
<b>H</b>	ploutvonožci	–

### 1.3.3 Morfologie a vývojový cyklus

Životní cyklus giardií je přímý a zahrnuje dvě morfologicky odlišná vývojová stádia: bičíkatého trofozoita a cystu. Infekční cysta je pozřena s vodou nebo potravou a po průchodu kyselým prostředím žaludku dochází k excystaci – v duodenu jsou uvolněni pohybliví trofozoiti, kteří představují patogenní stádia. Trofozoiti se dělí v proximální části tenkého střeva binárním dělením a adherují pomocí přísavného disku k povrchu enterocytů. Někdy může docházet k šíření bičíkovců do žlučového a žlučnicku. Do tkání nepronikají. Následně se střevním obsahem odchází do distální části tenkého střeva a do střeva tlustého, kde dochází k tvorbě cyst (encystaci). Infekční cysty jsou vylučovány s výkaly do prostředí.

Trofozoiti mají tvar hrušky, jsou dorzoventrálně zploštělí a dosahují velikosti přibližně 12–15  $\mu\text{m}$  na délku, 5–9  $\mu\text{m}$  na šířku a 1–2  $\mu\text{m}$  na výšku (Adam 2001). Jsou opatřeni čtyřmi páry bičíků (anterolaterální, posterolaterální, kaudální a ventrální pár) a ventrálním adhezivním diskem, který umožňuje reverzibilní přichycení k povrchu epitelu střeva. Při dělení je ventrální disk dezintegrován a tvořen znova v dceřiných buňkách. Typickou strukturu pro rod *Giardia* představují dvě mediální tělíska, která slouží jako zásobárna mikrotubulů pro adhezivní disk v nových buňkách. Giardie postrádají některé pro eukaryota charakteristické organely jako peroxizomy nebo typický Golgiho aparát. Jejich mitochondrie jsou redukovány v mitosomy.



Cysty jsou elipsového tvaru a jejich velikost se pohybuje okolo 8–12  $\mu\text{m}$  (Adam 2001). Pro mladé cysty jsou typická 2 jádra, zralé cysty jsou čtyřjaderné.

### 1.3.4 Mechanismy přenosu infekce

Cysty giardií jsou přenášeny fekálně-orální cestou, a to přímým kontaktem s infikovaným jedincem nebo pozřením kontaminované vody či potravy. Infekční dávka je nízká a u člověka již 10 cyst stačí k vyvolání infekce (Rendtorff 1954). Oproti tomu nakažená osoba může vylučovat do prostředí velké množství cyst: až  $10^9$ – $10^{10}$  denně po dobu několika měsíců (Escobedo et al. 2010).

#### • Přenos vodou

Přenos vodou patří mezi nejčastější mechanismy přenosu cyst giardií. K tomuto přenosu významně přispívá nedostatečná filtrace pitné vody a její kontaminace výkaly dobytka nebo prosakováním odpadních vod (Plutzer et al. 2010). Chlorace vody, která představuje účinnou ochranu proti většině virů a bakterií, není proti cystám giardií příliš efektivní (Khalifa et al. 2001). Přenos cyst usnadňuje také jejich schopnost přežít dlouhou dobu ve studené vodě a vlhkém prostředí (deRegnier et al. 1989). O jejich odolnosti svědčí studie Ericksona a Ortegové, kteří uvádí, že cysty zůstaly infekční v chlorované vodě po dobu 56 dní při teplotách od 0 °C do 4 °C a 14 dní při teplotách od 20 °C do 28 °C. V neupravené vodě odebrané z řeky byly cysty infekční 84 dní při teplotách od 0 °C do 4 °C a 28 dní při teplotách od 20 do 28 °C. V mořské vodě bylo zaznamenáno jejich přežívání po dobu více než 65 dní při teplotě 4 °C (Erickson et Ortega 2006). Pozorována byla také citlivost cyst k některým dezinfekčním prostředkům, vyschnutí, ozonizaci a UV záření (Karanis et al. 1992, Khalifa et al. 2001).

#### • Přenos potravou

Nákaza potravou je méně častá, dochází k ní obvykle pozřením syrové zeleniny nebo ovoce, které přišlo do styku s kontaminovanou vodou (Escobedo et al. 2010). Další možný zdroj nákazy představuje také konzumace syrových mořských plodů (Roberstson et al. 2007, Goméz-Couso et al. 2004).

#### • Zoonotický přenos

Ačkoli je giardióza považována spíše za antropozózu, může docházet i k zoonotickému přenosu (Hunter et Thompson 2004). Zoonotický potenciál je přisuzován asambláži A, méně asambláži B (Thompson 2000), které jsou běžně přítomné u dobytka (koz, prasat, ovcí a turů) a nakažená zvířata mohou snadno zapříčinit kontaminaci zdrojů pitné vody (Plutzer et al. 2010). Asambláže A a B mají nízkou hostitelskou specifitu a jsou schopny infikovat

člověka a další savce (Feng et Xiao 2011). V rámci asambláže A jsou nejčastěji detekovány subtypy AI a AII (Xiao et Fayer 2008). Subtyp AI je nacházen většinou u zvířat, zatímco subtyp II je detekován především u lidí (Xiao et Fayer 2008). U asambláže B byly u člověka nalezeny subtypy BIII a BIV a to přibližně se stejnou frekvencí (Sprong et al. 2009).

- **další způsoby přenosu**

V nedávné době byly rovněž zaznamenány případy přenosu giardií prostřednictvím sexuálních praktik spočívajících ve fekálně-orálním kontaktu (Escobedo et al. 2014).

### **1.3.5 Patogenita a klinické příznaky**

Průběh giardiózy je často asymptomatický, může se však objevit široké spektrum příznaků jako jsou křeče v epigastriu a hypochondriu, nevolnost, akutní nebo chronické průjmy, nadýmání nebo zvracení (Gardner et Hill 2001). Inkubační doba giardiózy je 1 až 3 týdny (Kulda et Nohýnková 1996).

Po přisátí trofozoita zůstává povrch střeva narušen, což vede k postupné mechanické deformaci střevních klků a s tím spojenými poruchami vstřebávání živin. Vzniká tak pro giardiózu typická steatorea – stolice s vysokým obsahem tuků. Malabsorpce tuků, laktózy, vitamínů A a B<sub>12</sub> může vést u dětí k poruchám růstu a celkovému neprospívání (Gardner et Hill 2001).

### **1.3.6 Terapie**

V současnosti pro léčbu giardiózy existuje mnoho léčiv, nejčastěji jsou používány deriváty nitroimidazolu (především metronidazol a tinidazol) a nitazoxanid (Escobedo et al. 2010). V některých případech je doporučeno užívání quinacrinu, furazolidonu nebo paromycinu.

### **1.3.7 Giardie a giardióza u primátů**

#### **1.3.7.1 Giardie u opic a poloopic**

Izoláty, které byly nalezeny u opic a poloopic, spadají do asambláží A a B (Tabulka 8). U opic byla ve dvou studiích nalezena také asambláž E, která je typická pro dobytek (Johnston et al. 2010, Du et al. 2015).

**Tabulka 8: Přehled asambláží a subtypů giardií pozorovaných u opic a poloopic**

<b>Hostitel</b>	<b>Asambláž</b>	<b>Reference</b>
<b>Strepsirrhini</b> (poloopice)		
<i>Eulemur fulvus</i>	B	Martínek-Díaz et al. 2011
<i>Eulemur rubriventer</i>	A	Martínek-Díaz et al. 2011
<i>Eulemur rufus</i>	A	Martínek-Díaz et al. 2011
<i>Haplemur aureus</i>	A	Martínek-Díaz et al. 2011
<i>Lemur catta</i>	A, BIV	Levecke et al. 2009
	BIV	Berrilli et al. 2011
	B	Beck et al. 2011 Martínek-Díaz et al. 2011
<i>Varecia rubra</i>	A	Martínek-Díaz et al. 2011
<b>Haplorrhini</b> (vyšší primáti)		
<b>Catarrhini</b> (opice starého světa)		
<i>Cercocebus atys</i>	A, B	Martínek-Díaz et al. 2011
<i>Cercopithecus</i> sp.	B	Lebbad et al. 2010
<i>Cercopithecus hamlyni</i>	A	Martínek-Díaz et al. 2011
<i>Colobus tereza</i>	BIV	Levecke et al. 2009
<i>Hylobates lar</i>	B	Beck et al. 2011
<i>Macaca assamensis</i>	BIV-1	Karim et al. 2014
<i>Macaca fascicularis</i>	B	Karim et al. 2014
<i>Macaca fuscata</i>	B	Itagaki et al. 2005
	BIV-3, BIV-6	Karim et al. 2014
	BII–BVII	Ye et al. 2012
<i>Macaca mulatta</i>	BIV-2–BIV-1	Karim et al. 2014
	E	Du et al. 2015
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	A	Martínek-Díaz et al. 2011
<i>Mandrillus sfinx</i>	BIV	Levecke et al. 2009
<i>Trachypithecus auratus</i>	BIV	Levecke et al. 2009
<i>Papio anubis</i>	BIV-2	Karim et al. 2014
<i>Presbytis leucocephalus</i>	B	Karim et al. 2014
<i>Procolobus badius tephrosceles</i>	BIII, BIV, E	Du et al. 2015
<b>Platyrrhini</b> (opice nového světa)		
<i>Ateles fusciceps</i>	A, BIV	Levecke et al. 2009
<i>Cebuella pygmaea</i>	B	Lebbad et al. 2010
<i>Saguinus oidipus</i>	B	Lebbad et al. 2010
<i>Saimiri boliviensis</i>	AI, BIV	Levecke et al. 2009
<i>Saimiri sciureus</i>	E	Johnston et al. 2010

### 1.3.7.2 Giardie u lidoopů

Přítomnost cyst giardií byla popsána u lidoopů většinou na základě morfologie bez rozdělení do asambláží a genotypů: u gorily nížinné (*Gorilla gorilla gorilla*) (Levecke et al. 2007, Gillespie et al. 2009, van Zijll Langhout et al. 2010), gorily horské (*Gorilla beringei beringei*) (Nizeyi et al. 1999, Sleeman et al. 2000, Nizeyi et al. 2002), šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*) (Peisert et al. 1983, Sá et al. 2013), orangutana sumaterského (*Pongo abelii*) a orangutana bornejského (*Pongo pygmeus*) (Labes et al. 2009).

Pouze v několika pracích autoři uvádí bližší zařazení do asambláže s použitím molekulárních metod, většinou u jedinců žijících v zajetí. Nalezené giardie u lidoopů spadají do asambláží A a B. U gorily nížinné byla ve dvou studiích nalezena asambláž AII (Martínek-Díaz et al. 2011, Sak et al. 2013), u gorily horské asambláže A, BIII a BIV (Graczyk et al. 2002, Hogan et al. 2014) a u šimpanze učenlivého asambláže A, B, BIII a BIV (Levecke et al. 2009, Beck et al. 2011, Martínek-Díaz et al. 2011, Debenham et al. 2015). Všechny zjištěné subtypy (AII, BIII, BIV) jsou běžně nacházeny u člověka a jsou považovány za zoonotické.

### 1.3.7.2 Giardie u člověka

Stejně jako u většiny ostatních primátů byly u člověka zjištěny asambláže A (především subtyp AII, méně často subtyp AI) a B (subtypy BIII a BIV) (Sprong et al. 2009).

Pozorovaná prevalence giardií u člověka dosahuje 2 % u dospělých a 6–8 % u dětí v rozvinutých zemích, a téměř 33 % u obyvatelstva v rozvojových zemích (Escobedo et al. 2007, 2010). Častější výskyt giardiózy byl zaznamenán v tropech a v oblastech s nižším hygienickým standardem (Thompson 2000, Adam 2001). Je odhadováno, že přibližně 200 milionů lidí v Asii, Africe a Latinské Americe má symptomatickou formu infekce a každý rok je zaznamenáno 0,5 milionu nových případů (Yason et Rivera 2007).

## 1.4 Orangutani

### 1.4.1 Systematické zařazení, rozšíření a ekologie rodu orangutan

Na základě morfologických, behaviorálních a genetických znaků rozlišujeme v rámci rodu orangutan dva druhy: orangutan sumaterský (*Pongo abelii* Lesson, 1877) a orangutan bornejský (*Pongo pygmaeus* Linnaeus, 1760). Tyto dva druhy tvoří skupinu Ponginae, která

představuje bazální větev čeledi Hominidae (Locke et al. 2011). Orangutan bornejský se dále dělí do tří poddruhů:

*Pongo pygmaeus pygmaeus* Linnaeus 1760

*Pongo pygmaeus wurmbii* Tiedemann 1808

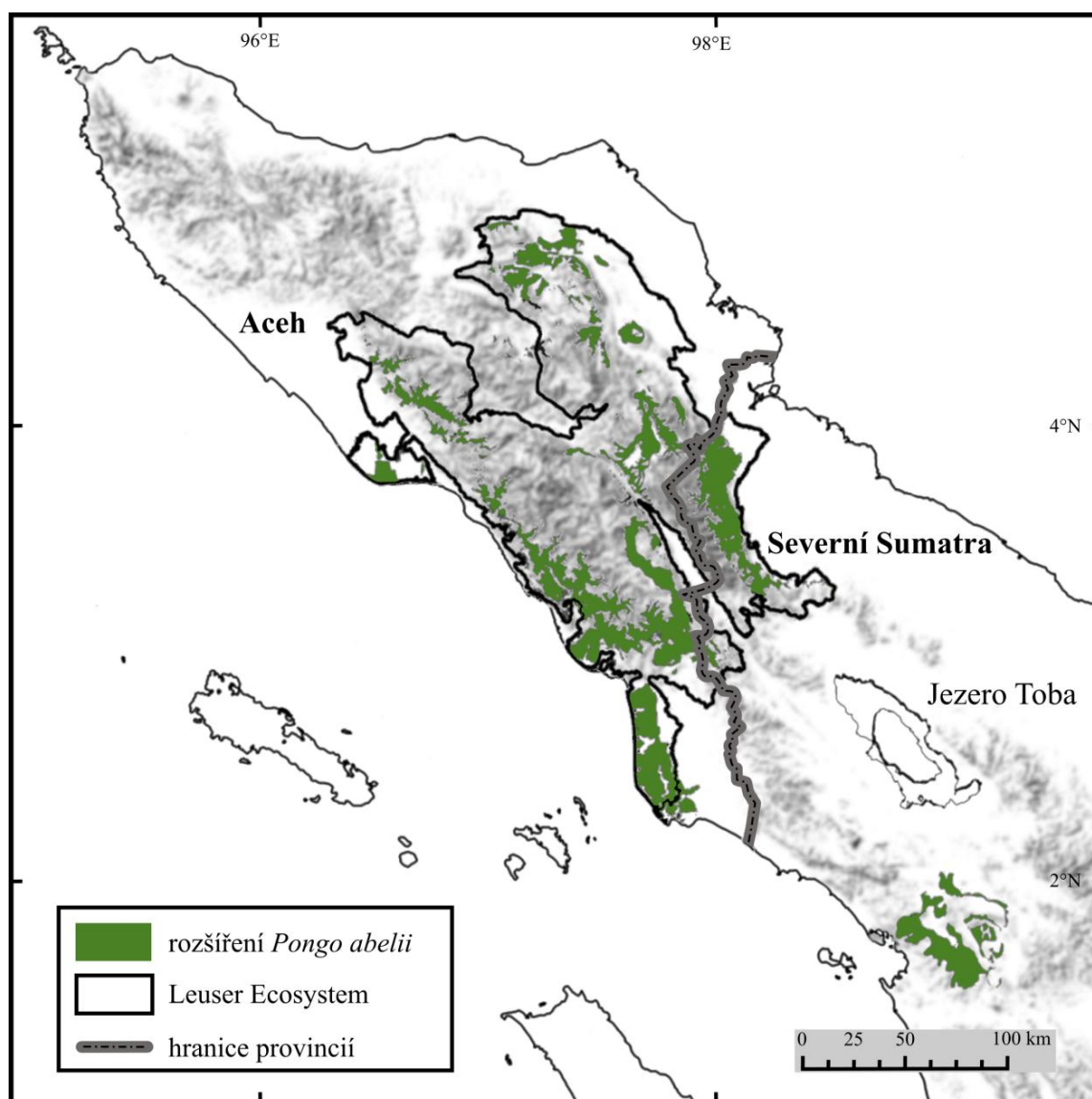
*Pongo pygmaeus morio* Owen 1837

Orangutan je jediným lidoopem žijícím mimo Afriku. Zatímco v pleistocénu se vyskytoval v celé jihovýchodní Asii (na Jávě, Sumatře a Borneu, ve Vietnamu, v subtropických oblastech jižní Číny a v Barmě) (Jablonski 1998, Delgado et van Schaik 2000, Warren et al. 2001, Wich et al. 2008). Jeho dnešní populace je omezena na několik vzájemně izolovaných území tropického deštného lesa Bornea a severní Sumatry (Delgado et van Schaik 2000, Wich et al. 2008) (Obrázek 2). V porovnání s historickými údaji tak představuje současná distribuce orangutana méně než 5 % jeho původního rozšíření (Goossens et al. 2006, Meijaard et al. 2010). Tento stav je zapříčiněn mnoha ekologickými a antropogenními faktory (Delgado et van Schaik 2000, Wich et al. 2008). Ve svrchním pleistocénu měla na populaci orangutana zásadní vliv změna klimatu, která způsobila posun jeho rozšíření do jižnějších poloh (Jablonski 1998). Významný podíl na snížení velikosti jeho populace měl také lov – orangutan jako velké a pomalé zvíře představuje snadnou kořist, byl tudíž v místech aktivního lovu postupně zcela vyhuben (Meijaard et al. 2010). Jeho refugia představují pro člověka málo dostupné bažinné lesy (Delgado et van Schaik 2000). K drastickému snížení jeho počtů došlo zejména v posledních dvou staletích v souvislosti s nárůstem lidské populace a rozsáhlou těžbou dřeva (Goossens et al. 2006). V současné době je orangutan ohrožován především zakládáním plantáží olejové palmy, těžbou dřeva a budováním nových cest, které zapříčiňují fragmentaci a destrukci jeho přirozeného biotopu (Goossens et al. 2006, Meijaard et Wich 2007, Marshall et al. 2008, Wich et al. 2008, Meijaard et al. 2010). Následkem těchto procesů je orangutan sumaterský na Červeném seznamu ohrožených druhů IUCN klasifikován jako kriticky ohrožený a orangutan bornejský jako ohrožený (IUCN, 2014).

Orangutan sumaterský (*Pongo abelii*) je endemický druh severní části ostrova Sumatra – vyskytuje se v Indonéských provinciích Aceh a Sumatra Utara (Severní Sumatra). Wich a kolektiv (2008) udávají, že od roku 1900 došlo k poklesu populace orangutana sumaterského o 92 %. Velikost jeho současné populace je odhadovaná na 6 624 jedinců (Wich et al. 2008, Nater et al. 2012). Tato populace je rozdělena na dílčí izolované subpopulace a pouze část z nich má potřebných 250 jedinců, kteří postačují k tomu, aby populace byla považována za dlouhodobě životaschopnou (Wich et al. 2008). Subpopulace

jsou rozdělené jak geografickými bariérami – pohořím Barisan a řekou Alas, tak antropogenními bariérami – vykáčenými oblastmi lesa, plantážemi a cestami (Delgado et van Schaik 2000). Většina sumaterských orangutanů žije v okrajových částech hornaté oblasti Leuser Ecosystem. Mimo Leuser Ecosystem se divocí orangutani nachází v Batang Togu, což je zároveň nejjižnější oblast jejich výskytu (Wich et al. 2008).

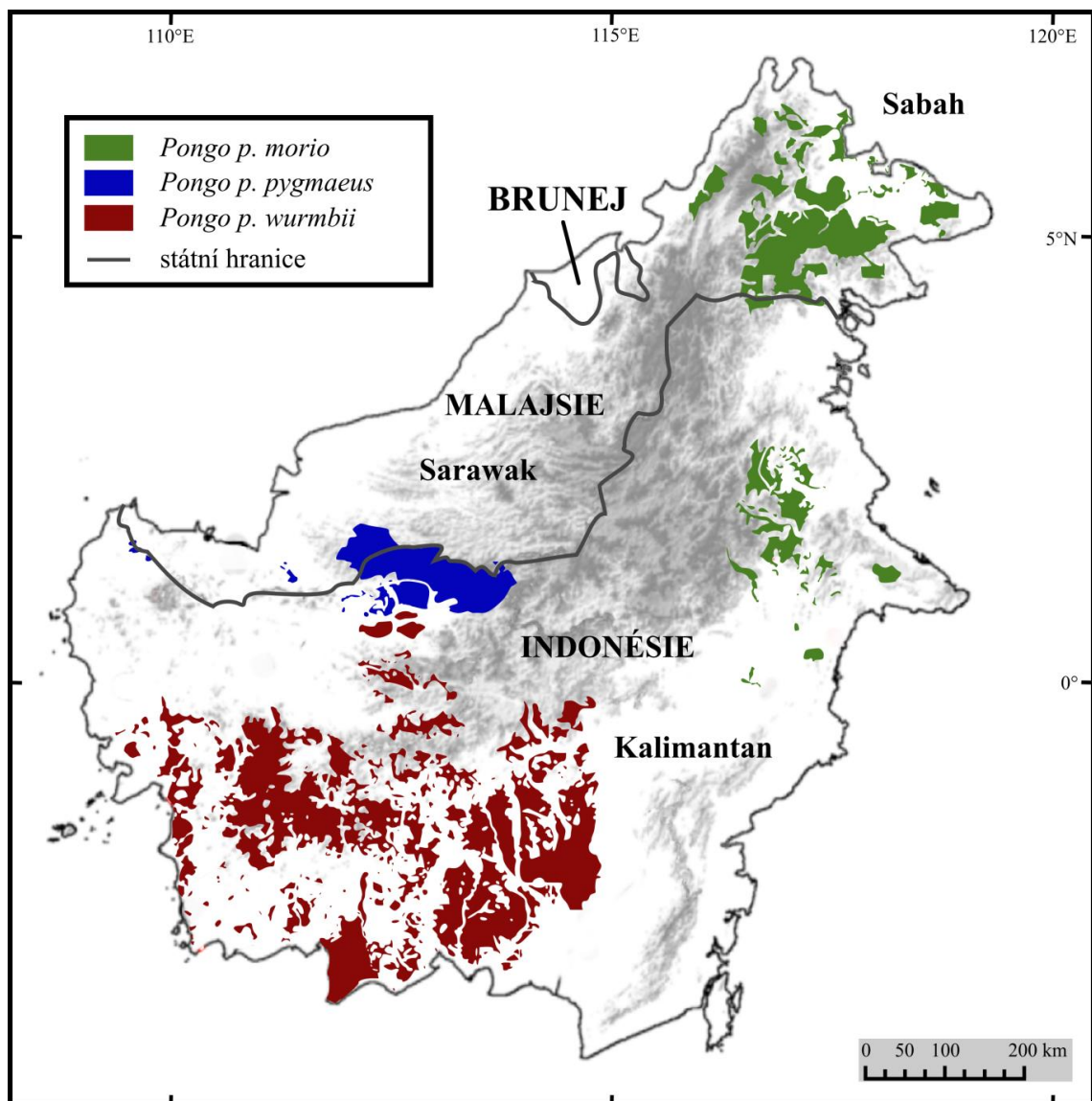
**Obrázek 2: Mapa rozšíření orangutana sumaterského (*Pongo abelii*) (zpracováno podle Wich et al. 2008).**



Orangutan bornejský (*Pongo pygmaeus*) je početnější než orangutan sumaterský a velikost jeho populace je asi 54 000 jedinců (Wich et al. 2008) (Obrázek 3). Vyskytuje se roztroušeně na ostrově Borneo, na němž bylo zmapováno celkem 306 oblastí jeho výskytu (Wich et al. 2008). Nejpočetnější poddruh, *Pongo p. wurmbii* (velikost populace 35 000

jedinců), se vyskytuje především v jihozápadním a středním Kalimantanu (Wich et al. 2008, Warren et al. 2001). Další poddruh, *Pongo p. morio*, přežívá v několika menších populacích v provincii Východní Kalimantan (asi 4 800 jedinců) a ve větších počtech v malajském státě Sabah (asi 11 000 jedinců) (Wich et al. 2008). Nejohroženějším poddruhem je *Pongo p. pygmaeus* (přibližně 3 000 jedinců), který obývá severozápadní Borneo a vyskytuje se také na území malajského státu Sawarak (Wich et al. 2008).

**Obrázek 3: Mapa rozšíření orangutana bornejského (*Pongo pygmaeus*) (zpracováno podle Wich et al. 2008, Meijaard et al. 2010).**



Průměrná délka života u divokých orangutanů činí 45 let. Samice orangutana pohlavně dospívá v 11 až 15 letech, v zajetí to bývá už kolem sedmého roku (Knott 1999). Divocí samci dospívají mezi 10 a 15 lety, v zajetí v 8 až 10 letech (Knott 1999, Delgado et van

Schaik 2000). Orangutani se vyznačují velmi nízkým reprodukčním potenciálem, který je pravděpodobně nejnižší ze všech savců vůbec, mohou mít mládě jednou za 6–8 let, což odpovídá pouze 4–5 potomkům za život (Delgado et van Schaik 2000, Wich et al. 2004). Samice je březí 9 měsíců. U dospělých samců se vyskytují dvě morfologické formy: adultní a subadultní. Adultní samci dosahují až dvojnásobné hmotnosti než samice (průměrně 86,3 kg) a jsou u nich snadno odlišitelné sekundární pohlavní rysy, jako jsou kožní záhyby na lících, hrtanový vak, dlouhá hustá srst a vydávání „long call“ – dlouhého táhlého volání (Knott 1999, Delgado et van Schaik 2000).

Naprostou většinu času tráví orangutan na stromech; jedná se o největšího arboreálního živočicha vůbec (Rijksen 1978, Delgado et van Schaik 2000). V korunách stromů si také každý večer staví nová hnízda z větví (Rijksen 1978). Lesnímu porostu je také přizpůsoben jejich pohybový aparát, ve větvích využívají brachiaci (zavěšování za přední končetiny) a bipedii, po zemi se pohybují kvadrupedně. Orangutani žijí převážně samotářským způsobem života, míra tohoto chování však závisí na dostupnosti potravy a liší se mezi jednotlivými lokalitami. Pevná vazba se vytváří pouze mezi matkou a mládětem. Na základě několika studií bylo zjištěno, že orangutani průměrně tráví 43 % času krmením, 41,5 % času odpočíváním, 13,5 % času cestováním a pouze 2 % jinými aktivitami jako je stavění hnízd nebo páření (Knott 1999, Delgado et van Schaik 2000).

Orangutani jsou primárně frugivorní. Nejvíce preferují fíky, durian a jiné ovoce s tenkou slupkou (Knott 1999). V době nedostupnosti ovoce ho nahrazují listím, kůrou, květy, výhonky a dalšími částmi rostlin (Delgado et van Schaik 2000). Součástí jejich potravy také tvoří bezobratlí živočichové (např. mravenci, termiti, cvrčci a včely), med, houby, půda a ptačí vejce (Russon et al. 2009). Pouze výjimečně byla zaznamenána konzumace obratlovců – v Ketambe a Suaq Balimbing byla pozorována predace outloně (*Nycticebus coucang*) orangutanem sumaterským (van Schaik et al. 2009, Hardus et al. 2012). U divokého orangutana bornejského byla popsána konzumace mršiny gibona (*Hylobates lar*), mršiny veverky (*Sundasciurus hippurus*) (Sugardjito et Nurhuda 1981) a predace krysy (Knott et al. 1999). Zaznamenány byly také dva případy kanibalismu u samic orangutana bornejského, které sežraly své uhynulé mládě (Dellatore et al. 2009).

#### **1.4.2 Paraziti gastrointestinálního traktu orangutanů**

U orangutanů byla v porovnání s ostatními lidoopy zaznamenána chudší parazitofauna, což je pravděpodobně způsobeno nejen obecně nižší prostudovaností těchto primátů, ale také jejich odlišnou ekologií (Mul et al. 2007, Labes et al. 2010). Zatímco šimpanzi a gorily žijí



v tlupách a většinu času tráví na zemi, orangutani se vyznačují samotářským způsobem života v korunách stromů, který tak může přispívat k nesnadnému šíření parazitů v jejich populaci (Foitová et al. 2009, Labes et al. 2010). Přehled všech druhů parazitů gastrointestinálního traktu, které byly doposud nalezeny u orangutanů, je uveden v tabulce 9.

První studií zabývající se parazity u volně žijících zvířat, byla disertační práce Rijksena, který v rámci svého výzkumu ekologie sumaterských orangutanů v oblasti Ketambe vyšetřil 20 jedinců (1978). Nejčastěji byli nacházeni paraziti *Trichuris trichura*, *Enterobius buckleyi* a *Abbreviata caucasica*. V témže roce byla vydána zpráva o střevních parazitech sumaterských a bornejských orangutanů ve studii NAMRL (Naval Aerospace Medical Research Laboratory), která kromě jedinců ze zoologických zahrad zkoumala i 43 divokých orangutanů z národního parku Tanjung Puting (Stafford et al. 1979). Jiná práce se zaměřovala na jedince v různém stupni habituace (Collet et al. 1986). Vyšetřeni byli re-introdukovaní jedinci z oblastí Tanjung Puting (Borneo), Bukit Lawang (Sumatra) a divocí orangutani z Ketambe (Sumatra). Největší prevalence byla pozorována u *Balantidium coli* a rodu *Strongyloides*. Jiná zpráva o gastrointestinálních parazitech u různých skupin orangutanů byla vydána v roce 1998 výzkumným týmem LIPI (Indonesian Institute of Science). Nejvyšší prevalence byla zjištěna u hlístice *Strongyloides* sp. a protist *Entamoeba coli* a *Balantidium coli* (Djojoasmoro et Purnomo 1998). Další studii představuje disertační práce Foitové, která vyšetřila 24 divokých a re-introdukovaných jedinců ze Sumatry z oblasti Bukit Lawang (Foitová 2002). V této práci byla nejčastěji pozorována nákaza parazity *B. coli*, *Strongyloides* sp. a *Oesophagostomum* sp. Divokými a re-introdukovanými jedinci ze Sumatry se zabývala i studie Orangutan Health Project (OHP) zaměřená především na protista (Foitová 2005). Kromě *Chilomastix mesnili* a *Endolimax nana* zde byl u orangutanů poprvé popsán rod *Cryptosporidium*. Výzkumem bornejských orangutanů se zabýval Kuze s kolektivem, jenž vyšetřil 25 jedinců (*Pongo pygmaeus morio*) v Dahum Halley, Sabah (Kuze et al. 2010). V této studii byla zjištěna přítomnost *E. coli*, *C. mesnili*, *B. coli*, *Trichuris* sp., *Pongobius hugoti*, *Pongobius foitovae* a *S. fuelleborni*.

Vliv kontaktu s člověkem na výskyt parazitů u orangutanů byl studován ve dvou publikacích (Mul et al. 2007, Labes et al. 2010). Orangutany na Sumatře zkoumal Mul s kolektivem, který pomocí koprologických metod vyšetřil celkem 32 divokých (oblast Ketambe), 19 re-introdukovaných (Jambi, Bohorok) a 54 v zajetí žijících (zoologická zahrada Medan, Batu Mbelin) jedinců (Mul et al. 2007). V této práci nebyl pozorován žádný vliv kontaktu s člověkem na celkovou prevalenci parazitů. Detekována byla pouze signifikantně nižší prevalence *Strongyloides* sp. a současně vyšší prevalence *B. coli*

u divokých orangutanů. Orangutany na Borneu studovala Labes s kolektivem, ta vyšetřila celkem 163 divoce žijících jedinců a jedinců z re-introdukčních stanic (Labes et al. 2010). Z helmintů byli v této studii nejčastěji pozorováni paraziti ze skupiny Ancylostomatidae a *Strongyloides* sp., z protist *B. coli* a *E. coli*. V této práci opět nebyla zjištěna žádná statisticky významná závislost mezi habituací jedince a přítomností parazitů.

Studiu helmintů skupiny *Enterobiinae* a *Anoplocephalidae* se u orangutanů sumaterských věnovali Baruš a Foitová s kolektivy (Foitová et al. 2008, 2010, 2011, 2014, Baruš et al. 2007). V roce 2007 popsali nový druh roupa *Pongobius hugoti* v oblasti Bukit Lawang (Baruš et al. 2007). Tento druh byl později detailněji studován v následující práci (Foitová et al. 2008). Další publikace se věnuje podrobnému popisu druhu roupa *Lemuricola pongoi* nalezeného na téže lokalitě (Foitová et al. 2010). V jiné studii byl publikován nález a současně došlo k redeskripci tasemnice *Bertiella satyri*, jež byla detekována u re-introdukovaných orangutanů v centru Bohorok (Foitová et al. 2011). Nedávná práce se pak zabývá fylogenetickými vztahy parazitů sumaterských orangutanů ze skupiny *Enterobiinae* (Foitová et al. 2014).

Výzkum zaměřený na hlístice rodu *Strongyloides* u orangutanů bornejských byl prováděn na třech lokalitách, a to jak u jedinců z re-introdukčních stanic, tak u volně žijících jedinců z lokality Sabangau a národního parku Tanjung Puting, kde byla zjištěna nejvyšší prevalence těchto parazitů (Wisnu et Prastowo 2013).

Výhradně jedinci ze zajetí se zabývají čtyři práce (Cummings et al. 1973, Frazier-Taylor et al. 1987, Gómez et al. 1996, Velasco Ng et Claveria 2009). Vůbec první studie zaobírající se gastrointestinálními parazity u orangutanů, je zpráva primatologického výzkumného centra v Atlantě (Cummings et al. 1973). Kromě parazitů *B. coli*, *Strongyloides* sp., *Trichuris* sp. a *Ascaris* sp., zde byla poprvé u orangutanů popsána přítomnost *G. intestinalis*. Jedince z 50 zoologických zahrad z celého světa zkoumal Frazier-Taylor s kolektivem (1987). Nejčastěji byla zaznamenána nákaza hlísticemi *Strongyloides* sp. a *Ascaris* sp. Studie Gomeze s kolektivem, která pochází ze zoologické zahrady v Barceloně, odhalila přítomnost protist *Entamoeba chattoni*, *Iodamoeba bütschlii*, *Enteromonas hominis* a *B. coli* (Gómez et al. 1996). V poslední z publikací bylo zkoumáno 24 jedinců ze zoologické zahrady v Aviron Zoo na Filipínách (Velasco Ng et Claveria 2009). Nalezeni byli paraziti *Entamoeba coli*, *Ascaris* sp. a *Strongyloides* sp.

**Tabulka 9: Přehled gastrointestinálních parazitů zaznamenaných u orangutanů.**

<b>Parazit</b>	<b>Reference</b>
<b>Amoebozoa</b>	
<i>Endolimax nana</i> Wenyon et O'Connor 1917	Labes et al. 2009, Stafford et al. 1979
<i>Entamoeba coli</i> Grossi 1897	Labes et al. 2009, Velasco Ng et Claveria 2009
<i>Entamoeba dispar</i> Brumpt 1925	Labes et al. 2009
<i>Entamoeba hartmanni</i> Prowazek 1912	Labes et al. 2009
<i>Entamoeba histolytica</i> Schaudinn 1903	Labes et al. 2009, Collet et al. 1986
<i>Entamoeba chattoni</i> Chatton 1925	Gomez et al. 1996
<i>Iodamoeba bütschlii</i> Prowazek 1912	Labes et al. 2009, Gomez et al. 1996
<b>Excavata</b>	
<i>Enteromonas hominis</i> da Fonseca 1915	Gomez et al. 1996
<i>Dientamoeba fragilis</i> Jepps et Dobell 1918	Foitová et al. 2005
<i>Chilomastix mesnili</i> Wenyon 1926	Mul et al. 2007
<i>Giardia intestinalis</i> (Lambl, 1859) Allexeieff 1914	Mul et al. 2007, Labes et al. 2009, Stafford et al. 1979, Cummings et al. 1973
<b>Alveolata</b>	
<i>Balantidium coli</i> Malmsten 1857	Rijksen, 1978 Labes et al. 2009, Stafford et al. 1979, Collet et al. 1978, Gómez et al. 1996, Kilbourn et al. 2003
<i>Blastocystis</i> sp. Brumpt 1912	Labes et al. 2009
<i>Cyclospora</i> sp. Schneider 1881	Warren 2001
<i>Cryosporidium</i> sp. Tyzzer 1907	Foitová et al. 2005, Lim et al. 2008
<b>Opisthokonta</b>	
Cestoda	
<i>Bertinella satyri</i> Blanchard 1891	Foitová et al. 2001
<i>Hymenolepis</i> sp.	Labes et al. 2009
Trematoda	
<i>Dicrocoelium</i> sp.	Labes et al. 2009, Mul et al. 2007
<i>Gastrodiscoides hominis</i> Lewis et McConal 1876	Rijksen 1978
<i>Leipertrema rewelii</i> Sandosham 1951	Sandosham 1951
<i>Platynosomum fastosum</i> Shanta 1970	Warren et al. 1998
Acanthocephala	
<i>Prostenorchis elegans</i> Diesing 1851	Moore 1970
Nematoda	
<i>Abbreviata causasica</i> von Linstow 1902	Rijksen 1978
<i>Ancylostoma brasiliense</i> Gomez da Faria 1907	Rijksen 1978
<i>Ascaris lumbricoides</i> Linnaeus 1758	Stafford et al. 1979, Rijksen 1978
<i>Baylisascaris procyonis</i> Sprent 1968	Hanley et al. 2006
<i>Enterobius buckeyi</i> Sandosham 1950	Sandosham, 1950, Rijksen 1978
<i>Enterobius faecundus</i> von Linstow 1879	von Linstow 1879
<i>Enterobius simile</i> MacCallum 1921	MacCallum 1921
<i>Lemuricola pongoi</i> Foitová, Baruš, Koubková, Hodová et Nurcahyo 2010	Foitová et al. 2010
<i>Oesophagostomum blanchardi</i> Railliet et Henry 1912	Rijksen 1978
<i>Pithecostrongylus alatus</i> Railliet et Henry 1912	Rijksen 1978

Parazit	Reference
<i>Pithecostrongylus satyri</i> Lubimov 1930	Lubimov, 1930
<i>Pongobius hugoti</i> Baruš, Foitová, Koubková, Hodová, Šimková et Nurcahyo 2007	Kuze et al. 2010
<i>Pongobius foitovae</i> Kuze, Kanamori, Malim, Bernard, Zamma, Kooryiama, Morimoto et Hasegawa 2010	Kuze et al. 2010
<i>Strongyloides fuelleborni</i> von Linstow 1905	Wisnu et Joko 2013, Labes et al. 2011
<i>Strongyloides stercoralis</i> Bavay 1876	Wisnu et Prastowo 2013, Rijksen 1978, Labes et al. 2011
<i>Trichostrongylus colubriformis</i> Gilda 1892	Rijksen 1978
<i>Trichuris trichiura</i> Linnaeus 1771	Labes et al. 2009, Stafford et al. 1979, Rijksen 1978

### 1.4.3 Sebemedikace u lidoopů

Jako sebemedikace (zoofarmakognózie) se označuje adaptivní změna chování jedince vyvolaná parazity nebo jiným infekčním agens, která vede ke zvýšení jeho inklusivní nebo exkluzivní fitness (Singer et al. 2009, de Roode et al. 2014). Ačkoli je toto chování nejvíce prostudováno u primátů, zaznamenáno bylo také u jiných živočichů – například u ptáků, motýlů, mravenců nebo octomilek (Castella et al. 2008, Singer et al. 2009, Milan et al. 2012, Suárez-Rodríguez et al. 2013). Na sebemedikaci poprvé upozornil americký ekolog Janzen, který ve své publikaci poukázal na to, že infikovaná zvířata mohou mít užitek ze sekundárních metabolitů obsažených v některých rostlinách (Janzen 1978). Podle jeho hypotézy si nakažený jedinec vybírá rostliny s antiparazitární aktivitou, které mu přispívají ke zvýšení tolerance či rezistence k parazitární nákaze (Singer et al. 2009). U lidoopů bylo ze sebemedikačních způsobů chování nejdetailněji zkoumáno žvýkání dřene rostlin (bitter-pith chewing) a polykání celých listů (leaf swallowing) (Huffman et Caton 2001, de Roode et al. 2014). Publikováno bylo také několik prací, které se zabývají jinými formami sebemedikace, jako je geofágie nebo vtírání rozžvýkaných rostlin do srsti (fur-rubbing) (Morrogh-Bernard 2008). Účinné látky obsažené v těchto rostlinách patří k nejslibnějším zdrojům léčiv pro veterinární i humánní medicínu (Huffman 2003, de Roode et al. 2014).

Mezi vůbec nejznámější příklady sebemedikačního chování patří polykání celých listů šimpanzi (Huffman et al. 1997, Huffman et Hirata 2004). Na toto chování poprvé upozornili antropolog Wrangham a primatolog Nishida, kteří při výzkumu ve východní Africe zaznamenali v trusu šimpanzů přítomnost většího množství nematod *Oesophagostomum stephanostomum* a současně složené nestrávené listy rostliny rodu *Aspilia* (Asteraceae)

(Wrangham et Nishida 1983). Rovněž bylo zjištěno, že šimpanzi tyto listy žerou neobvyklým způsobem. Zatímco běžně rostliny rychle rozžvýkají na malé kousky, listy *Aspilia* sp. skládají a polykají vcelku. Polykání listů bylo pozorováno zejména v období dešťů, kdy hrozí největší riziko infekce (Fowler et al. 2005). Vylučování nematod je pravděpodobně způsobeno zvýšenou motilitou střev v důsledku podráždění zažívacího traktu listy (McLennan et Huffman 2012). Současně byla v listech *Aspilia* sp. nalezena látka thiarubin A s antivirovými, antimykotickými a nematocidními účinky (Rodrigues et al. 1985). Podobný způsob konzumace rostlin spojený s vylučováním střevních nematod byl následně pozorován na mnoha dalších místech Afriky (Huffman et Hirata 2004). Detekováno bylo více než 40 různých druhů rostlin (bylin, keřů i stromů) s chlupatými a drsnými listy, které šimpanzi konzumují vcelku a po průchodu zažívacím traktem zůstávají nestrávené (Huffman et Caton 2001, McLennan et Huffman 2012). Obdobné sebemedikační chování bylo popsáno i u goril a bonobů (Huffman 1997, Huffman et Caton 2001, Fruth et al. 2014).

Jiným příkladem sebemedikace je žvýkání dřeně rostlin, které bylo rovněž poprvé zaznamenáno u šimpanzů (Huffman et Seifu 1989). Při výzkumu na lokalitě v Mahale byla pozorována samice se zjevnými příznaky nemoci (otupělost, černá moč, nechutenství), které ustoupily po konzumaci hořkých šťáv z mladých stonků rostliny *Vernonia amygdalina* (Huffman et Seifu 1989). Tato bylina je hojně využívána domorodými obyvateli, kteří její listy používají při léčbě amébové dyzenterie nebo jako anthelmintikum či antipyretikum (Huffman et al. 2003). Chemická analýza rostliny *Vernonia amygdalina* odhalila přítomnost seskviterpenových laktonů (vernodalol, vernolid a hydrozyvernolid) s protinádorovými, antibiotickými a antischistozomálními účinky (Huffman et al. 2003).

Geofágie, požívání hlíny nebo půdy, byla pozorována u mnoha druhů primátů (Krishnamani et Mahaney 2000). Ačkoli její význam není zcela objasněn, předpokládá se, že spočívá v adsorpci toxinů, stabilizaci pH, antidiarhoickém účinku a mírnění infekcí gastrointestinálního traktu (Krishnamani et Mahaney 2000, Foitová et al. 2009). Toto chování bylo popsáno jak u goril, tak u šimpanzů (Aufreiter et al. 2001). Nedávno byla geofágie rovněž pozorována u orangutanů bornejských v okolí stanice Wanariset (Mahaney et al. 2015).

U orangutanů byl popsán i jiný způsob sebemedikace, a to žvýkání rostliny *Commelina* sp. (Commelinaceae) a její následné vtírání do srsti v podobě bílozelené pěny (Morrogh-Bernard 2008). *Commelina* sp. netvoří běžnou součást potravy orangutanů a slouží jim nejspíše k léčbě kožních infekcí nebo drobných zranění (Morrogh-Bernard 2008). Pro své antibakteriální a protizánětlivé účinky je rovněž na Borneu hojně využívána domorodci, kteří

rozdrcené listy *Commelina* sp. přikládají na zlomeniny a rány (Morrogh-Bernard 2008, Russon et al. 2009). Vtírání rostlinných látek do srsti (fur-rubbing), bylo dříve pozorováno také u lemurů (*Eulemur macaco*), ploskonosých opic – malp (*Cebus capucinus*), chápanů (*Ateles geoffroyi*) a mirik (*Aotus* spp.) (Baker et al. 1996, Morrogh-Bernard 2008). U afrických lidoopů toto chování doposud popsáno nebylo (Morrogh-Bernard 2008).

## 2. CÍLE

- 1) Pomocí molekulárních metod detekovat kryptosporidie, giardie a mikrosporidie rodu *Enterocytozoon* a *Encephalitozoon* ve vzorcích trusu orangutanů.
- 2) Posoudit vliv lokality a kontaktu orangutanů s člověkem na riziko infekce zkoumanými parazity.
- 3) Otestovat vliv vybraných rostlinných extraktů na průběh a intenzitu infekce *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II u BALB/c myši.

Tato práce je součástí grantového projektu GAČR P505/11/1163 – Protizánětlivá aktivita extraktů rostlin z Indonésie a jejich účinek na průběh oportunních parazitóz, jehož cílem bylo zjištění výskytu vybraných parazitických protist (mikrosporidií, kryptosporidií a giardií) v populacích orangutanů na vybraných lokalitách a otestovat antiparazitární účinky vytipovaných rostlinných extraktů v *in vivo* modelech. Experimentální část předložené diplomové práce se zbývá pouze problematikou mikrosporidiózy. Vliv rostlinných extraktů na ostatní parazitická protista byl řešen v rámci dalších prací.

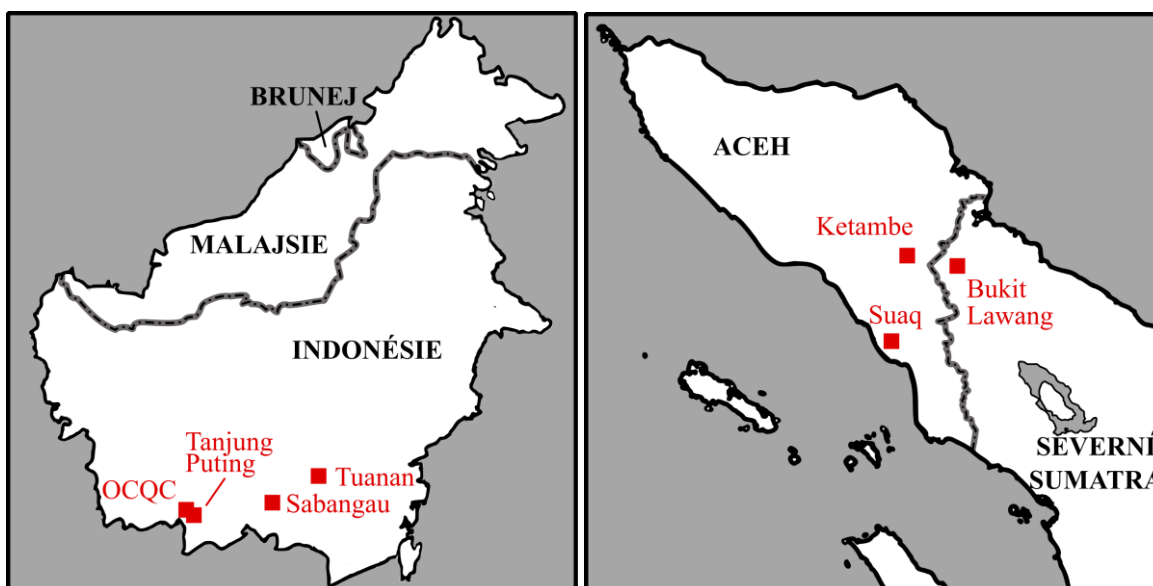
## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1 Prevalence a diverzita

#### 3.1.1 Sběr vzorků a charakteristika lokalit

Vzorky trusu orangutanů zpracovávané v této diplomové práci byly poskytnuty RNDr. Ivonou Foitovou, Ph.D. Sběr vzorků probíhal v letech 2002 až 2011, a to na třech lokalitách v národním parku Gunung Leuser (Sumatra) a na čtyřech lokalitách v jižní části Kalimantanu (Borneo) (Obrázek 4). Celkem bylo odebráno 470 vzorků trusu od 298 orangutanů v různém stupni kontaktu s člověkem (67 volně žijících, 96 polodivokých a 135 jedinců žijících v zajetí). Někteří jedinci byli odebráni opakovaně (maximálně pětkrát). Vzorky byly získány bezprostředně po defekaci, a to pouze od identifikovaných jedinců. Po odběru byly vzorky uchovávány v 96% alkoholu a dopraveny do Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky.

Obrázek 4: Poloha lokalit na Borneu (vlevo) a Sumatře (vpravo).



#### Lokality na Sumatře

Na studovaných lokalitách byli vyšetřováni orangutani sumaterští (*Pongo abelii*).

**Bukit Lawang** se nachází na východní hranici národního parku Gunung Leuser. V minulosti byla na této lokalitě provozována rehabilitační stanice Bohorok, která od roku 1972 do 2001 navrátila do volné přírody přes 200 orangutanů. V současné době zde již re-introdukční programy neprobíhají. Místo je otevřené turistům, kteří zde mají možnost pozorovat polodivoké orangutany (Foitová et al. 2009).



V letech 2004 až 2011 bylo na této lokalitě odebráno celkem 114 vzorků pocházejících od 56 polodivokých jedinců.

**Ketambe** je situované v centrální části národního parku Gunung Leuser. Na rozdíl od lokality Bukit Lawang zde orangutani téměř nepřichází do kontaktu s lidmi (Foitová et al. 2009). Většinu jedinců žijících v okolí Ketambe tvoří původní populace, pouze několik jedinců bylo rehabilitováno v sedmdesátých letech 20. století.

V letech 2007 až 2011 bylo na této lokalitě odebráno celkem 62 vzorků pocházejících od 17 divoce žijících orangutanů.

**Suaq** se nachází v jihozápadní části národního parku Gunung Leuser. V této oblasti se vyskytují divoce žijící jedinci ve vysokých denzitách (7 jedinců/km<sup>2</sup>) v závislosti na dostupnosti potravy (Husson et al. 2009). V roce 2009 zde bylo odebráno 26 vzorků od 17 divoce žijících jedinců.

## Lokality na Borneu

Na studovaných lokalitách byl vyšetřován orangutan bornejský poddruh *Pongo pygmaeus wurmbii*.

**Sabangau** je situované v oblasti centrálního Bornea. V letech 1966 až 1996 na této lokalitě probíhala selektivní těžba dřeva, po které následovala ilegální těžba dřeva do roku 2004. Denzita orangutanů se pohybuje kolem 2,3 jedince/km<sup>2</sup> (Husson et al. 2009). V roce 2005 až 2008 zde bylo odebráno 39 vzorků od divoce žijících 18 jedinců.

**Tuanan** se nachází v oblasti centrálního Bornea v rezervaci Mawas. Průměrná hustota orangutanů dosahuje 4,5 jedince/km<sup>2</sup> (Husson et al. 2009). V letech 2007 až 2009 bylo odebráno 48 vzorků pocházejících od 15 divoce žijících jedinců.

**Záchranná stanice – Orangutan Care and Quarantine Center (OCQC)** se nachází v Centrálním Kalimantanu nedaleko národního parku Tanjung Puting. V tomto centru je umístěno asi 270 jedinců zabavených z ilegálního držení. V roce 2011 bylo odebráno 141 vzorků od 135 jedinců žijících v zajetí.

Národní park **Tanjung Puting** se nachází v jižní části Kalimantanu. Sběr vzorků probíhal v okolí **Camp Leaky**, což je vědecká stanice, kde probíhal první rehabilitační program na Borneu. Ačkoli již jako re-introdukční stanice neslouží, žije na tomto místě druhá generace re-introkovovaných orangutanů. Průměrná denzita orangutanů v okolí Camp Leaky se pohybuje kolem 2,7 jedince/km<sup>2</sup> (Husson et al. 2009).

Na této lokalitě bylo v roce 2011 odebráno po jednom vzorku od 40 jedinců.

### 3.1.2 Izolace DNA z trusu

Z každého vzorku trusu byl odpařen alkohol. Extrakce DNA byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex).

#### Pracovní postup:

- 1) Do 2,0 ml mikrozkušavky s 200 mg trusu byly přidány skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm, zirkonové kuličky o velikosti 2 mm a byl připipetován 1 ml Lysis pufru P.
- 2) Vzorky byly homogenizovány v beadbeateru po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s (MP Fast Prep®-24 Instrument).
- 3) Mikrozkušavky byly inkubovány v termobloku při 95 °C po dobu 10 minut a centrifugovány 1 minutu při 14 000 g.
- 4) Supernatant byl přenesen do zkumavek InviAdsorb-Tube, 15 sekund vortexován a inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě.
- 5) Následně byla mikrozkušavka centrifugována 3 minuty při 14 000 g.
- 6) Supernatant byl přepipetován do čistých 1,5 ml mikrozkušavek a centrifugován 3 minuty při 14 000 g.
- 7) Do čistých 1,5 ml mikrozkušavek bylo napipetováno 25 µl Proteinázy K a přidáno 400 µl supernatantu. Obsah zkumavek byl krátce vortexován. Obsah mikrozkušavek byl inkubován 10 minut při 70 °C.
- 8) Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo přidáno 200 µl Binding Buffer A a následně zvortexováno.
- 9) Veškerý objem byl přepipetován na kolonu Spin Filter+Tube a byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty a následně centrifugován 1 minutu při 11 000 g.
- 10) Ze sběrné mikrozkušavky byl vylit veškerý odpad a na kolonu bylo napipetováno 500 µl roztoku Wash I a centrifugováno 1 minutu při 11 000 g.
- 11) Odpad byl opět vylit a na kolonu bylo přidáno 700 µl roztoku Wash II a centrifugováno 1 minutu při 11 000 g.
- 12) Odpad byl potřetí vylit a mikrozkušavka centrifugována 4 minuty při 11 000 g.
- 13) Kolona byla vložena do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a bylo na ni napipetováno 200 µl předehřátého Elution Buffer D, inkubováno 3 minuty při laboratorní teplotě a centrifugováno 1 minutu při 11 000 g.

Získaná DNA byla skladována při - 20 °C.

### 3.1.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

#### Chemikálie:

- deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP's, 10 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný pufr pro Taq purplé DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- Taq purple DNA polymeráza (Top-Bio, 1 U/μl, 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 μM, Generi Biotech, ČR)

Molekulární charakterizace kryptosporidií byla provedena pomocí nested PCR amplifikující část genu malé ribozomální podjednotky rRNA (SSU rRNA) (cca 830 bp, Xiao et al. 1999). Molekulární charakterizace mikrosporidií rodu *Enterocytozoon* a *Encephalitozoon* byla provedena pomocí nested PCR amplifikující 3' konec genu malé ribozomální podjednotky, celou sekvenci ITS (internal transcribed spacer) a 5' konec genu velké ribozomální podjednotky (cca 390 bp, Buckholt et al. 2002; cca 320 bp, Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996). V případě *Giardia intestinalis* byla amplifikována část genu kódující TPI (triose phosphate isomerase) (cca 500 bp; Sulaiman et al. 2003). Nukleotidové sekvence specifických primerů a zastoupení jednotlivých složek v reakční směsi je uvedeno níže, respektive v (Tabulkách 6 a 7).

Amplifikační program zahrnoval počáteční denaturaci při 94 °C po dobu 3 minut, 35 cyklů skládajících se z denaturace při 94 °C po dobu 45 sekund, specifické nasedací teploty primerů po dobu 45 sekund (kryptosporidie a *E. bienensi* 55/55 °C, mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* 58/55 °C a giardie 50/50 °C), extenze při 60 °C po dobu 60 sekund a závěrečného dosyntetizování řetězce při 72 °C po dobu 10 minut.

Každá série reakcí zahrnovala pozitivní a negativní kontrolu. Jako pozitivní kontroly byly použity DNA *Cryptosporidium serpentis* izolovaná z užovky červené (*Elaphe guttata*), DNA *E. intestinalis* původně získaná od AIDS pacienta, a dlouhodobě kultivovaná *in vitro* v Laboratoři veterinární a humánní protistologie BC AV ČR, DNA *E. bienensi* izolovaná z myši domácí (*Mus musculus musculus*) nebo *Giardia intestinalis* asambláž E izolovaná z kozy domácí.

### **Nukleotidové sekvence specifických primerů:**

*Cryptosporidium* spp. (Xiao et al. 1999)

#### **Primární primery**

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

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

#### **Sekundární primery**

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. (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996)

#### **Primární primery**

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

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

#### **Sekundární primery**

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

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

*Enterocytozoon bieneusi* (Buckholt et al. 2002)

#### **Primární primery**

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

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

#### **Sekundární primery**

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

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

*Giardia intestinalis* (Sulaiman et al. 2003)

#### **Primární primery**

GIAF1 5' - AAA TIA TGC CTG CTG GTC G - 3'

GIAR1 5' - CAA ACC TTI TCC GCA AAC C - 3'

#### **Sekundární primery**

GIAF2 5' - CCC TTC ATC GGI GGT AAC TT - 3'

GIAR2 5' - GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC - 3'

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

Reagencie		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	10×	2,00 µl	2,00 µl
dNTP's	10 mM	0,40 µl	0,40 µl
forward primer	10 µM	0,40 µl	0,40 µl
reverse primer	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>Celkový objem</b>		<b>20,00 µl</b>	<b>20,00 µl</b>

**Tabulka 7: Reakční směs pro nested PCR – *Giardia intestinalis***

Reagencie		Primární reakce	Sekundární reakce
deionizovaná H <sub>2</sub> O	–	14,70 µl	18,70 µl
pufr	10×	2,50 µl	2,50 µl
dNTP's	10 mM	0,50 µl	0,40 µl
forward primer	10 µM	0,50 µl	0,40 µl
reverse primer	10 µM	0,50 µl	0,40 µl
BSA	10 mg/ml	1 µl	–
Taq	1 U/µl	0,30 µl	0,50 µl
DNA	–	5,00 µl	3,00 µl
<b>Celkový objem</b>		<b>25,00 µl</b>	<b>25,00 µl</b>

### 3.1.4 Gelová elektroforéza

Velikost DNA fragmentů byla zjišťována pomocí gelové elektroforézy. Byl použit 2% agarózový gel obsahující 0,2 µg ethidium-bromidu v 1 ml gelu.

#### 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)
- Roztok ethidium bromidu v deionizované vodě o koncentraci 10 mg/ml (Sigma–Aldrich)
- 100 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc., Canada)

### **Pracovní postup:**

- 1) Agaróza byla smíchána s 1% TAE pufrem a zahřáta v mikrovlnné troubě.
- 2) Baňka byla ochlazena pod tekoucí studenou vodou na teplotu asi 50 °C.
- 3) Do baňky byl přidán roztok ethidium bromidu.
- 4) Roztok byl nalit do nosiče, byl vložen hřeben a gel byl ponechán ztuhnout.
- 5) Následně byl ztuhlý gel vložen do elektroforetické vany s 1% TAE pufrem a byl z něj vyjmut hřeben.
- 6) Do první jamky v gelu bylo napipetováno 10 µl ladderu, do dalších 20 µl sekundárního PCR produktu.
- 7) Elektroforéza probíhala při 90 V, než došlo k separaci všech fragmentů.
- 8) DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí transiluminátoru a byl pořízen snímek výsledného gelu.

### **3.1.5 Izolace z gelu**

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

### 3.1.6 Sekvenace

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány pomocí ABI3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Získané nukleotidové sekvence byly upraveny v programu ChromasPro (Technelysium, verze 1.32) a 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).

### 3.1.7 Fylogenetická analýza

Fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy byly posouzeny pomocí metody Maximum Likelihood (Saitou et Nei 1987) v programu MEGA 6. Pro vyhodnocení statistické podpory získaných topologií byla použita bootstrapová analýza (1000 opakování).

### 3.1.8 Statistické zpracování výsledků

K posouzení vlivu lokality a kontaktu orangutanů s člověkem na pravděpodobnost nákazy zkoumanými parazity byl použit zobecněný smíšený lineární model (GLMM). Tato statistická analýza byla zvolena z důvodu opakovaného odběru vzorků od některých jedinců (až 5 odběrů od jednoho zvířete). Všechny výpočty byly učiněny v programu R verze 3.2.0 (R Core Team 2012). Parazit *Giardia intestinalis* nebyl do statistických analýz zahrnut z důvodu nízkého počtu nálezů.

## 3.2 Experimentální infekce

Experimenty byly prováděny podle předem schváleného projektu pokusů 073/2010 v souladu se zákonem ČNR č. 246/1992 Sb.

### 3.2.1 Spory pro experimentální infekci

K experimentální infekci byly použity spory *E. cuniculi* kmene EC2 původně izolovaného Koudelou a kolektivem z dexamethazonem imunosuprimované myši (1994). Spory byly kultivovány v buňkách opičích ledvin Vero E6 při teplotě 37 °C v kultivačním médiu RPMI-1640 Hespermodification (Hepes 25 mM, Sigma) s přidavkem 2,5% bovinního fetálního séra (Bofes, ZVOS Hustopeče), směsi 1% antimykotik a antibiotik (Sigma; 100 UI penicilinu, 10 µg streptomycinu, 0,25 µg amfotericinu B/ml média), 0,3% gentamycinu (30 µg/ml RPMI) a neesenciálních 1% aminokyselin (SEVAC, Praha). Adherované infikované buňky

byly uvolněny a přemístěny do deionizované vody, kde došlo k jejich plazmolýze. Následnou centrifugací (20 minut při 1370 g) byl získán sediment se sporami, který byl uchováván v pufru PBS s obsahem antibiotik a antimykotik (100 UI penicilin, 10 µg/ml streptomycin, 0,25/ml µg amphotericin a 30 µg/ml gentamicin). Množství spor bylo stanoveno počítáním v Bürknerově komůrce. Spory byly skladovány v lednici při 4 °C. Pro potřeby pokusů byly spory čištěny na Percollovém gradientu (Sigma).

### 3.2.2 Pokusná zvířata

K pokusu byly použity 7týdenní samice myši (inbrední kmen BALB/c). Myši byly chovány za standardních podmínek ve sterilním prostředí v IVC s HEPA filtry ve zvěřinci BC AV ČR, v.v.i. v Českých Budějovicích, krmeny sterilní komerční směsí (TOP – VELAZ Praha) a napájeny sterilní vodou *ad libitum*. V experimentální místnosti byla udržována konstantní teplota 22–23 °C a 60–65% vlhkost vzduchu.

### 3.2.3 Použité rostlinné extrakty

Rostlinné extrakty použité v této studii byly poskytnuty spoluřešiteli grantového projektu GAČR P505/11/1163. Rostliny byly vybrány na základě dlouhodobého sledování chování vybraných orangutanů v kombinaci s jejich parazitologickým vyšetřením na přítomnost střevních parazitů. Behaviorální data, složení potravy a případné projevy nemoci nebo přítomnost parazitů byly u daných jedinců zaznamenávány v průběhu více než deseti let. Z celkem asi 1700 druhů rostlin, které tvoří součást potravy orangutanů, byly vybrány čtyři rostliny s možným antiparazitárním účinkem:

*Archidendron fagifolium* (Miq.) I. C. Nielsen (Fabaceae)

*Diospyros sumatrana* Miq. (Ebenaceae)

*Shorea sumatrana* Symington (Dipterocarpaceae)

*Piper betle* L. (Piperaceae)

Tyto rostliny byly pro potřeby experimentu dodány jako lyofilizáty z methanolické frakce. Ve všech případech se jednalo o extrakt z listů.

### 3.2.4 Infikování BALB/c myši a uspořádání pokusu

K pokusu bylo použito 24 BALB/c myši, které byly perorálně infikovány mikrosporidii *E. cuniculi* pomocí jícnové sondy. Velikost dávky na jednu myš byla 10<sup>7</sup> spor ve 200 µl sterilní vody. Vylučování spor bylo ověřeno u všech jedinců 5.–7. den



po infekci (DPI). Myši byly rozděleny 20. DPI do 8 skupin po třech jedincích a bylo jim podáváno komerční léčivo (albendazol) nebo jeden z testovaných rostlinných extraktů, a to jednou denně po dobu 14 dní v rozmezí 21.–34. DPI (akutní fáze infekce). Další skupiny tvořily kontroly, a to skupina s podáváním rostlinného extraktu *Arabidopsis thaliana*, skupina s podáváním roztoku DMSO a jedinci, kterým byla podávána sterilní voda. Přehled skupin myši je uveden v tabulce 8.

Jelikož rostlinné extrakty byly dodány ve formě lyofilizátu, bylo je nutné pro perorální aplikaci a rozpuštění účinných látek nutné převést do roztoku. Z důvodu nízké rozpustnosti extraktu byl lyofilizát nejdříve rozpuštěn v malém množství DMSO (dimethylsulfoxid) a následně doplněn sterilní vodou, takže výsledný objem DMSO tvořil 0,5 % objemu rozpuštěného extraktu. Jedna dávka obsahovala 12,5 mg rostlinného extraktu ve 200  $\mu$ l.

**Tabulka 8: Uspořádání pokusu**

	Skupina	Číslo skupiny	Počet jedinců	Dny odběru (DPI)	Pitva (DPI)
Pozitivní kontroly	kontrola	1	3	1–34	34
	albendazol	2	3	21–34	34
	<i>A. thaliana</i>	3	3	21–34	34
	DMSO	4	3	21–34	34
Testované extrakty	<i>A. fagifolium</i>	5	3	21–34	34
	<i>D. sumatrana</i>	6	3	21–34	34
	<i>S. sumatrana</i>	7	3	21–34	34
	<i>P. betle</i>	8	3	21–34	34

**Skupina 1:** kontrolní skupina infikovaných neléčených myši: Tyto myši byly infikovány sporami *E. cuniculi* a byly ponechány bez léčby za účelem sledování standardního průběhu infekce. Myším bylo podáváno 200  $\mu$ l sterilní vody jednou denně.

**Skupina 2:** infikovaná skupina léčených myši: Tato skupina byla infikována sporami *E. cuniculi* a myši byly léčeny pomocí léku Aldifal (Mevak Nitra, SR) obsahujícího účinnou látku albendazol. Objem dávky byl 200  $\mu$ l, která obsahovala 6 mg albendazolu na kilogram váhy zvířete (Costa et Weiss 2000). Léčivo bylo podáváno jednou denně.

**Skupina 3:** infikovaná skupina myši, kterým byl podáván extrakt *A. thaliana*: Tato skupina myši byla infikována sporami *E. cuniculi* a byl jí podáván rostlinný extrakt *A. thaliana* stejným způsobem jako výše uvedené extrakty. Tato skupina byla zařazena jako negativní kontrola léčená extraktem z rostliny bez potenciálního terapeutického účinku.

**Skupina 4:** infikovaná skupina myši, kterým bylo podáváno DMSO: Tyto myši byly infikovány sporami *E. cuniculi* a bylo jim podáváno DMSO ve stejném množství jako u skupin s podáváním rozpuštěných extraktů (dávka 0,5% DMSO v 200 µl PBS). Tato skupina byla zařazena pro zjištění možného vlivu DMSO na průběh infekce. DMSO bylo myším podáváno jedenkrát denně.

**Skupiny 5 až 8:** infikované skupiny myši, kterým byly podávány zkoumané extrakty: Tyto myši byly infikovány sporami *E. cuniculi* a současně jim byly podávány jednou denně suspenze rostlinných extraktů.

### 3.2.5 Odběr vzorků trusu a tkání

Od každé z myši byl po dobu pokusu jedenkrát denně odebírán trus. Vzorky byly zváženy a uchovávány ve sterilních 1,5 ml mikrozkušavkách při teplotě -20 °C.

Myši byly usmrceny 34. DPI. Následně byly odebrány vzorky žaludku, duodena, jejunu, ilea, céka, kolonu, sleziny, jater, ledvin, močového měchýře, srdce, plic a mozku. Aby bylo zamezeno kontaminaci, byla pro každý orgán použita zvláštní sada sterilních pitevních nástrojů.

### 3.2.6 Izolace DNA z tkáně

Extrakce DNA byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen).

Pracovní postup:

- 1) Do 1,5 ml mikrozkušavky s 200 mg tkáně byly přidány skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm, zirkonové kuličky o velikosti 2 mm a bylo připipetováno 180 µl pufru.
- 2) Vzorky byly homogenizovány v beadbeateru po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s (MP Fast Prep®-24 Instrument).
- 3) Mikrozkušavky byly následně centrifugovány 10 sekund, bylo k nim přidáno 20 µl proteinázy K a vzorky byly inkubovány v termobloku při 56 °C po dobu 1 hodiny.
- 4) Vzorky byly opět centrifugovány 10 sekund, bylo připipetováno 200 µl AL pufru a obsah zkumavek byl krátce zvortexován.
- 5) Do mikrozkušavky bylo přidáno 200 µl 96% EtOH a obsah zkumavek byl opět zvortexován a centrifugován.

- 6) Supernatant byl přepipetován na kolonu (Mini spin column), mikrozkušavky byly centrifugovány po dobu tří minut při 14 000 g. Odpad ze sběrné zkumavky byl odstraněn.
- 7) Na kolonu bylo připipetováno 500 µl AW1 pufru, mikrozkušavka byla centrifugována 1 minutu při 14 000 g. Odpad ze sběrné mikrozkušavky byl odstraněn.
- 8) Na kolonu bylo připipetováno 500 µl AW2 pufru, mikrozkušavka byla centrifugována 1 minutu při 14 000 g. Odpad ze sběrné zkumavky byl odstraněn.
- 9) Sběrné mikrozkušavky byly nahrazeny novými 1,5 ml mikrozkušavkami a na kolonu bylo napipetováno 200 µl AE pufru, po inkubaci 1 minutu byly mikrozkušavky centrifugovány 1 minutu při 8 000 g.

Získaná DNA byla skladována při -20 °C.

### 3.2.7 Kvantitativní real time PCR (qRT PCR)

Množství spor *E. cuniculi* v jednotlivých orgánech a trusu BALB/c myši bylo kvantifikováno pomocí real-time PCR za použití specifických primerů amplifikujících část genu kódujícího malou ribozomální podjednotku *Encephalitozoon* spp. a specifické TaqMan próby (268 bp; Wolk et al. 2002). K sestavení kalibrační křivky byla použita vyizolovaná DNA ze vzorků, které obsahovaly známý počet spor ( $10^3$  až  $10^8$ ) v 200 mg trusu. Zastoupení jednotlivých složek v reakční směsi je uvedeno v tabulce 9. Reakce probíhala na přístroji Light cycler 480 (Roche), monitorována a vyhodnocena byla pomocí programu Light cycler 480 Software Release 1.5.0 SP4. Jako gen s konstantní expresí (housekeeping gene, HKG) byl použit gen pro  $\beta$ -aktin myši (137 bp; Dai et al. 2009). Kalibrační křivka byla připravena ze vzorků se známým počtem kopií myších genomů zředěním DNA desítkovou řadou.

Amplifikační program pro termocycler zahrnoval počáteční denaturaci při 95 °C po dobu 3 minut, amplifikaci (45 cyklů skládajících se z denaturace při 95 °C po dobu 45 sekund, nasedání primerů při teplotě 60 °C po dobu 10 sekund a extenze při 72 °C po dobu 16 sekund), závěrečnou extenzi při 55–85 °C 16 sekund rychlostí 20 °C/s a chlazení 40 °C po dobu 30 sekund (Wolk et al. 2002).

**Tabulka 9: Reakční směs pro qRT PCR (*Encephalitozoon* spp.,  $\beta$ -aktin)**

<b>Reagencie</b>	<b>Objem</b>
<b>FastStart Universal Probe Master</b> (Roche)	12,5 $\mu$ l
<b>deionizovaná H<sub>2</sub>O</b>	5,0 $\mu$ l
<b>forward primer</b> (10 mM) (Generi Biotech)	1,0 $\mu$ l
<b>reverse primer</b> (10 mM) (Generi Biotech)	1,0 $\mu$ l
<b>próba</b> (10 mM) (Generi Biotech)	0,5 $\mu$ l
<b>DNA</b>	5,0 $\mu$ l
<b>Celkem</b>	25,0 $\mu$ l

**Nukleotidové sekvence specifických primerů a prób:**

*Encephalitozoon* spp. (Wolk et al. 2002)

**forward primer** 5' - GTC CGT TAT GCC CTG AGA - 3'

**reverse primer** 5' - ACA GCA GCC ATG TTA CGA CT - 3'

**próba** 5'-red 640-TGG ACG AAG ATT GGA AGG TCT GAG TC -phosphate-3'

$\beta$ -aktin (Dai et al. 2009)

**forward primer** 5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3'

**reverse primer** 5'-CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT-3'

**próba** 5'-FAM CAC TGC CGC ATC CTC TTC CTC CC BHQ1-3'

Součástí každé ze série qRT PCR reakcí byla negativní kontrola a vzorky o známých koncentracích  $\beta$ -aktinu ( $2,6 \cdot 10^5$ ) a *Encephalitozoon* spp. ( $1,0 \cdot 10^6$ ) použité jako standardy. Všechny vzorky byly testovány v triplicátech. Pro další výpočty byla použita CT hodnota (threshold cycle), která byla automaticky odečítána výše uvedeným programem. Ze získaných CT hodnot byl vypočítán počet spor v analyzovaném vzorku. Počet spor byl poté přepočítán na 1 g daného orgánu nebo na 1 g trusu na základě známého počtu kopií genu pro  $\beta$ -aktin v 1 gramu orgánu.

Počet kopií genu pro  $\beta$ -aktin v jednotlivých orgánech myši byl stanoven experimentálně. Analýze bylo podrobena celkem devět vzorků z každého ze 12 sledovaných orgánů. Pro toto stanovení byly použity orgány tří neinfikovaných BALB/c myši. Každý ze zkoumaných vzorků tkáně byl zvážen a z tkáně byla následně izolována DNA. Počet genů kódujících  $\beta$ -aktin ve vzorcích izolovaných z tkání byl určen pomocí qRT PCR. Tento postup umožnil u daných orgánů zohlednit nejen odlišný počet kopií  $\beta$ -aktinu v 1 g, ale také rozdílnou efektivitu izolace jednotlivých tkání.

### **3.2.8 Statistické zpracování výsledků**

Pro posouzení vlivu rostlinných extraktů, albendazolu a DMSO na množství spor v orgánech myši byla pro každého jedince spočítána průměrná zátěž organismu. Tato hodnota byla vypočítána jako průměr z počtu spor v 1 g zkoumaných orgánů.

Výpočty byly provedeny v programu STATISTICA (StatSoft, Inc. 2013). Pro dosažení homogeneity variancí mezi skupinami myši byla provedena logaritmická transformace dat. Rozdíly mezi skupinami byly testovány pomocí jednocestné analýzy variance (one-way ANOVA). Pro mnohonásobné porovnání mezi skupinami byl použit Tukey HSD test.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Prevalence a diverzita

Z celkem 298 vyšetřovaných zvířat bylo 33 pozitivních na přítomnost testovaných parazitů. Celková pozorovaná prevalence dosáhla 11,1 %. Přehled všech výsledků je uveden v tabulce 10. Ve většině případů se jednalo o nákazu jedním druhem parazita, pouze ve dvou případech byla zaznamenána smíšená infekce *E. cuniculi* a *E. bieneusi* a u jednoho zvířete infekce *E. bieneusi* a *C. muris* (Tabulka 10).

**Tabulka 10:** Výskyt *Encephalitozoon cuniculi*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Cryptosporidium* spp. a *Giardia* spp. u orangutanů s rozdílným stupněm kontaktu s člověkem

	Lokalita	Kontakt s člověkem	n1	n2	Pozitivní jedinci			
					<i>Encephalitozoon</i> spp.	<i>E. bieneusi</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>G. intestinalis</i>
Borneo	Sabangau	volně žijící	18	39	-	-	-	-
	Tuanan	volně žijící	15	48	1× EC II <sup>#</sup>	1× D <sup>#</sup>	-	-
	OCQC	žijící v zajetí	135	141	-	1×Pongo 2 <sup>\$</sup>	5× <i>C. muris</i> <sup>\$</sup> 1× <i>C. parvum</i> type A	-
	Tanjung Putting	polodivocí	40	40	1× EC II	1× D	1× <i>C. parvum</i> type B	-
Sumatra	Bukit Lawang	polodivocí	56	114	10× EC II	1× D	-	1× B
	Suaq	volně žijící	17	26	4× EC II	-	1× <i>C. muris</i>	-
	Ketambe	volně žijící	17	62	5× EC II <sup>&amp;</sup>	2× D <sup>&amp;</sup>	-	-
<b>Celkem</b>			<b>298</b>	<b>470</b>	<b>21</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>1</b>

D = *Enterocytozoon bieneusi* genotyp D; EC II = *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II; B = *Giardia intestinalis* asambláž B; n1 = počet jedinců; n2 = počet vzorků; <sup>#</sup>, <sup>&</sup>, <sup>\$</sup> smíšená infekce v jednom zvířeti

#### 4.1.1 Mikrosporidie

Molekulární analýzy prokázaly přítomnost specifické DNA mikrosporidií rodů *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* v testovaných vzorcích. V rámci rodu *Encephalitozoon* byla detekována pouze specifická DNA náležící k druhu *Encephalitozoon cuniculi*. Tento druh, který byl detekován u 21 jedinců a jeho celková prevalence dosáhla 7 %, byl současně nejčastěji nalezeným parazitem vůbec. Porovnáním získaných sekvencí a následnou fylogenetickou analýzou bylo prokázáno, že všechny izoláty jsou identické se sekvencí GQ422153 uloženou v GenBank a přísluší ke genotypu II. Specifická DNA *E. bieneusi* byla identifikována u šesti orangutanů s celkovou prevalencí 2 % (Tabulka 10). Fylogenetická analýza provedená na základě sekvencí ITS ukázala přítomnost dvou odlišných izolátů. V pěti případech se jednalo o sekvenci identickou s *E. bieneusi* genotyp D (AF101200)

a u jednoho jedince byl nalezen nový genotyp, jenž byl pojmenován Pongo 2 (KP994661). Genotyp Pongo 2 je fylogeneticky nejbližší genotypu D, se kterým se shoduje z 99,1 % (Obrázek 5). U tohoto jedince byla současně zaznamenána nákaza *Cryptosporidium muris*.

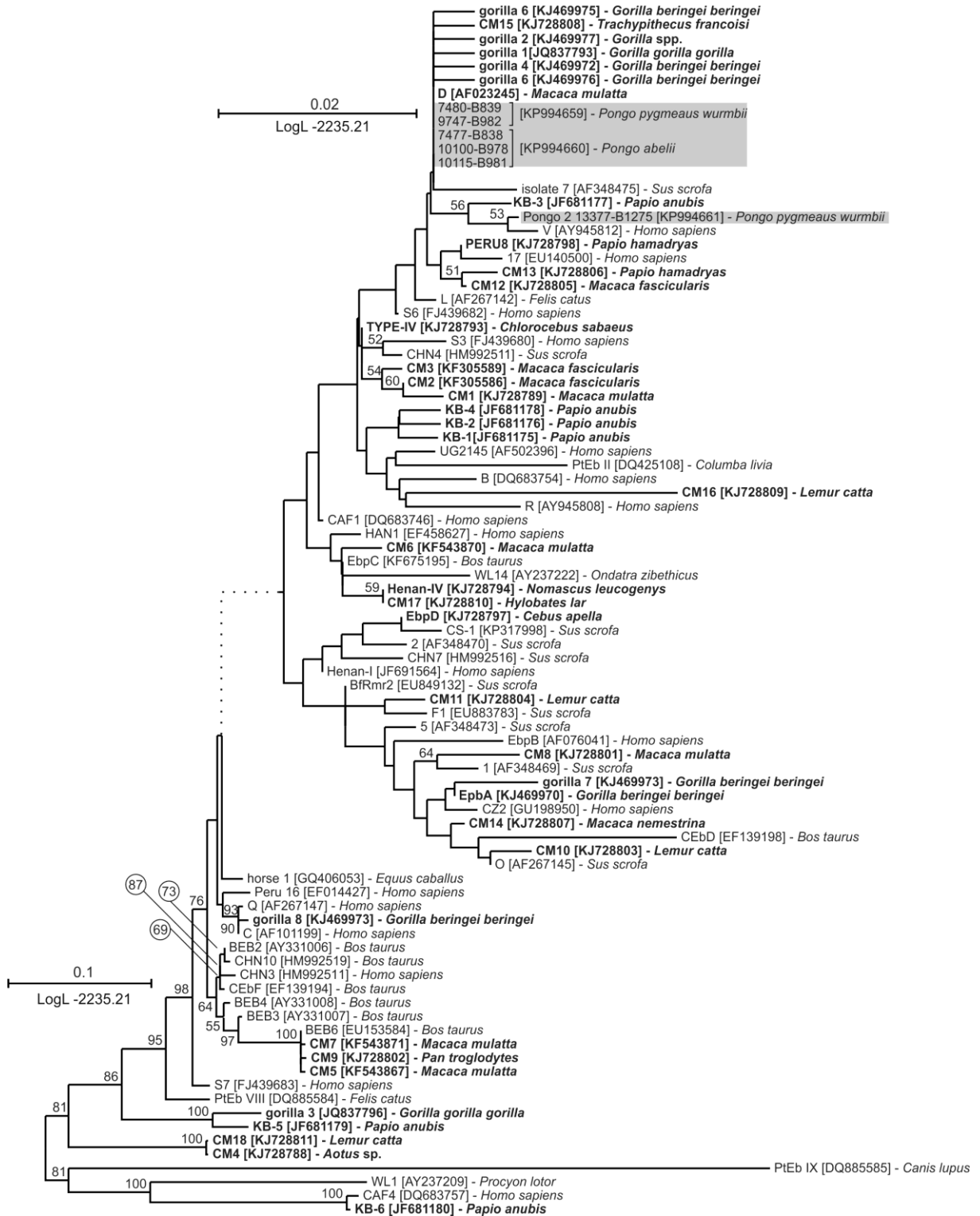
Statistické srovnání dat neprokázalo žádný statisticky významný rozdíl v pravděpodobnosti nákazy na jednotlivých ostrovech ( $p = 0,992$ ;  $z = 0,010$ ) ani mezi skupinami jedinců s rozdílným stupněm kontaktu s člověkem ( $p = 0,479-0,670$ ;  $z = 0,426-0,707$ ).

#### 4.1.2 Kryptosporidie

Z 298 vyšetřovaných zvířat byla detekována přítomnost kryptosporidií u osmi jedinců (prevalence 2,6 %). Fylogenetická analýza částí genu kódujícího SSU ukázala přítomnost celkem tří různých sekvencí. V pěti případech byly sekvence identické se sekvencí *C. muris*, která byla původně získána z krysy (AB089284). Ve dvou případech byly sekvence identické s *C. parvum*, z nichž jedna byla 100% shodná s *C. parvum* Typ A (KP994659) a druhá byla identická s *C. parvum* Typ B (KP994663) (Obrázek 6).

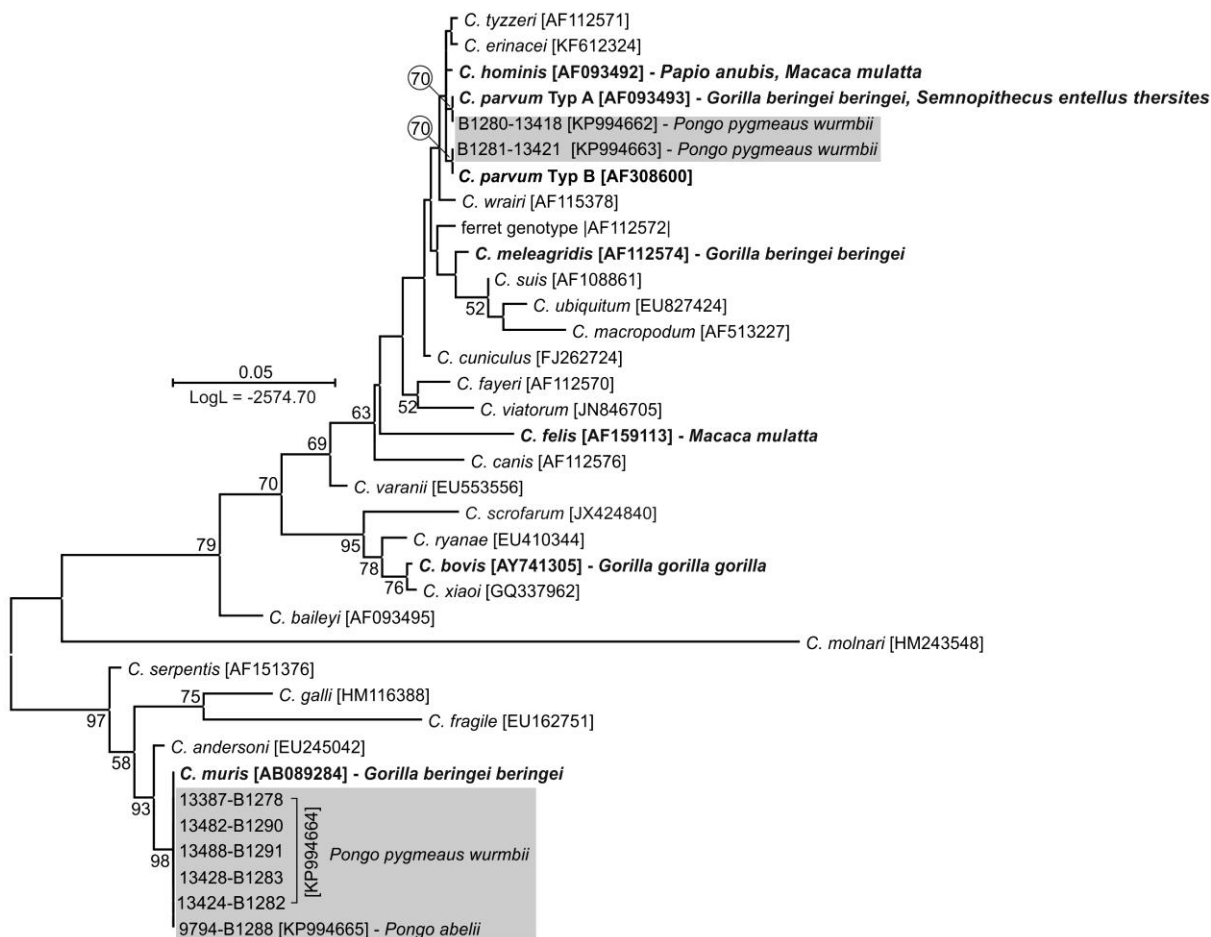
Z celkového počtu 8 jedinců pozitivních na přítomnost kryptosporidií bylo 7 orangutanů polodivokých nebo byli chováni v zajetí (Tabulka 10). Na základě statistické analýzy dat nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl v pravděpodobnosti nákazy kryptosporidii mezi skupinou orangutanů žijících v zajetí a skupinou polodivokých jedinců ( $p = 0,838$ ;  $z = -0,200$ ). Naopak pravděpodobnost nákazy kryptosporidii u volně žijících orangutanů je oproti ostatním skupinám statisticky významně nižší ( $p < 2 \times 10^{-16}$ ;  $z = -226,050$ ). Statistické srovnání rovněž ukázalo vyšší pravděpodobnost nákazy kryptosporidii na Borneu ( $p < 2 \times 10^{-16}$ ,  $z = -110,2$ ).

**Obrázek 5:** Fylogenetický strom izolátů *Enterocytozoon bienersi* získaných z orangutanů v rámci této studie (vyznačeno šedě) s ostatními genotypy *E. bienersi* na základě sekvencí ITS vytvořený metodou Maximum-likelihood v programu MEGA6. Izoláty, které byly nalezeny u nehumánních primátů, jsou vyznačeny tučně. Znáznorněny jsou hodnoty podpory větví více než 50 % (1000 × bootstrap).





**Obrázek 6:** Fylogenetický strom izolátů kryptosporidií získaných z orangutanů v této studii (vyznačeno šedě) s ostatními druhy a genotypy rodu *Cryptosporidium* zkonstruovaný na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódující SSU metodou Maximum-likelihood v programu MEGA6. Izoláty, které byly nalezeny u nehumánních primátů, jsou vyznačeny tučně. Znázorněny jsou hodnoty podpory větví více než 50 % (1000 × bootstrap).



### 4.1.3 Prevalence a diverzita giardií

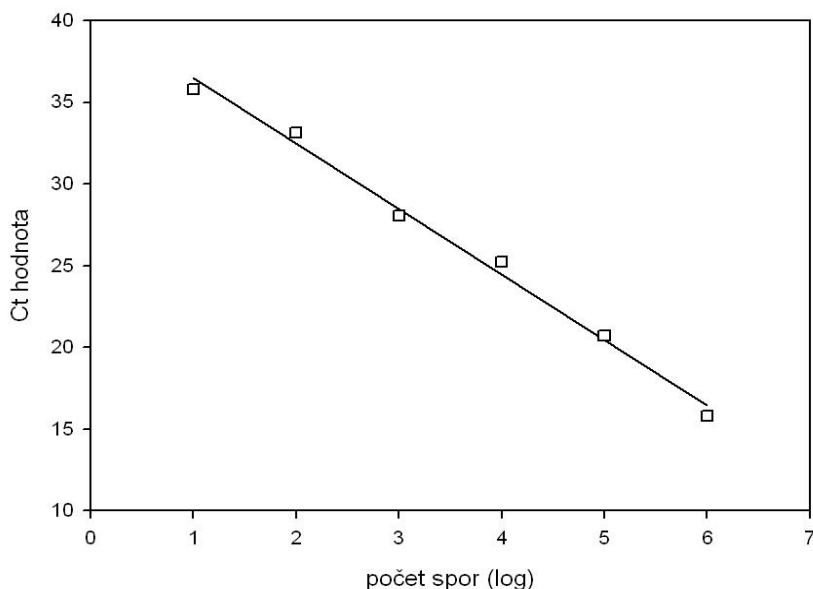
*Giardia intestinalis* byla detekována pouze v jednom případě (0,3 %). Fylogenetická analýza sekvence kódující TPI (triózafofát izomeráza) ukázala přítomnost asambláže B (KR011753), získaný izolát byl z 99,8 % shodný s *G. intestinalis* subtypem MB6 (KF679744) (Tabulka 10).

### 4.2. Optimalizace qRT PCR

Na základě testování vzorků o známé koncentraci spor na 1 g trusu nebo tkáně byl spodní limit pro detekci počtu spor *E. cuniculi* stanoven na  $10^3$  ve 200 mg biologického

materiálu. Výsledná kalibrační křivka pro qRT PCR jako přímka závislosti CT hodnoty na počtu spor je uvedena na obrázku 7. Hodnota regresního koeficientu této přímky dosáhla hodnoty 0,99.

**Obrázek 7: Kalibrační křivka pro qRT PCR**



#### 4.2.1 Stanovení počtu genů pro $\beta$ -aktin v orgánech BALB/c myši

Počet kopií genu pro  $\beta$ -aktin v jednotlivých orgánech myši byl stanoven experimentálně pomocí qRT PCR. Výsledná množství kopií genů pro  $\beta$ -aktin v jednotlivých orgánech jsou uvedena v tabulce 11. Nejvyšší počet kopií genů kódujících  $\beta$ -aktin v 1 g tkáně byl zaznamenán u srdce ( $5,54 \times 10^7$ ), naopak nejnižší hodnoty byly pozorovány u mozku ( $2,30 \times 10^6$ ).

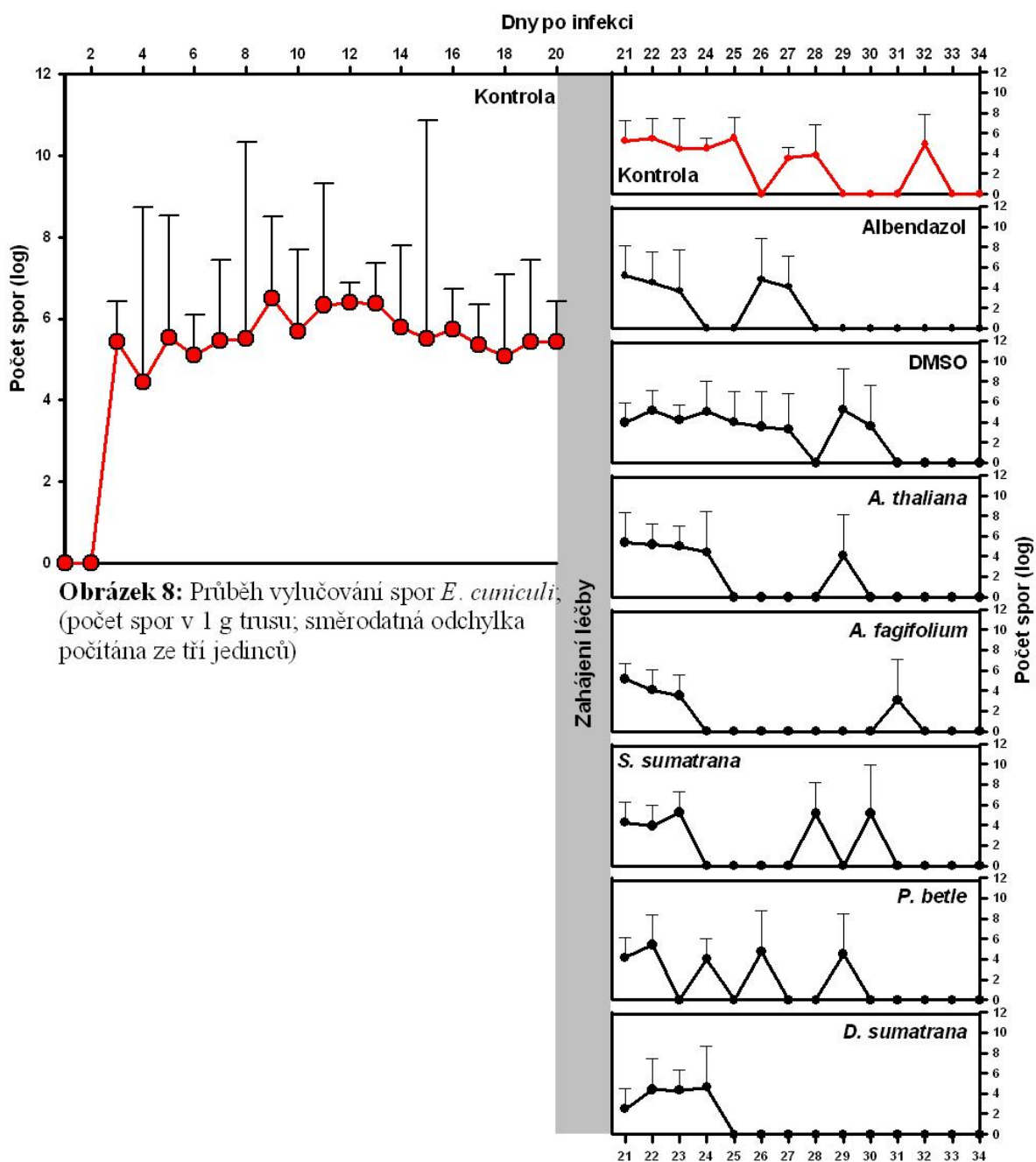
**Tabulka 11: Počty genů pro  $\beta$ -aktin v orgánech BALB/c myši**

Orgán	Počet genů kódujících $\beta$ -aktin v 1 g orgánu
žaludek	$5,07 \times 10^6 \pm 2,07 \times 10^5$
duodenum	$2,36 \times 10^7 \pm 1,98 \times 10^6$
jejunum	$4,31 \times 10^7 \pm 1,42 \times 10^5$
ileum	$3,51 \times 10^7 \pm 3,26 \times 10^6$
caecum	$3,08 \times 10^7 \pm 2,36 \times 10^6$
colon	$3,10 \times 10^7 \pm 6,34 \times 10^5$
slezina	$1,19 \times 10^7 \pm 1,85 \times 10^6$
játra	$3,71 \times 10^7 \pm 3,00 \times 10^6$
ledviny	$1,23 \times 10^7 \pm 1,07 \times 10^6$
srdce	$5,54 \times 10^7 \pm 3,38 \times 10^5$
plíce	$2,40 \times 10^7 \pm 6,69 \times 10^6$
mozek	$2,30 \times 10^6 \pm 1,77 \times 10^5$

## 4.3 Experimentální infekce

### 4.3.1. Průběh infekce *E. cuniculi* u BALB/c myši – sledování v trusu

Přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* byla u infikovaných BALB/c myši poprvé prokázána 3. DPI, kdy průměrná hodnota činila  $2,62 \times 10^5$  spor na 1 g trusu. Průměrné množství detekovatelné DNA vyloučených spor se postupně zvyšovalo a dosáhlo maxima 9. DPI ( $7,04 \times 10^5$  spor na 1 g trusu). Od 9. do 20. DPI se množství vylučovaných spor výrazně neměnilo (Obrázek 8).

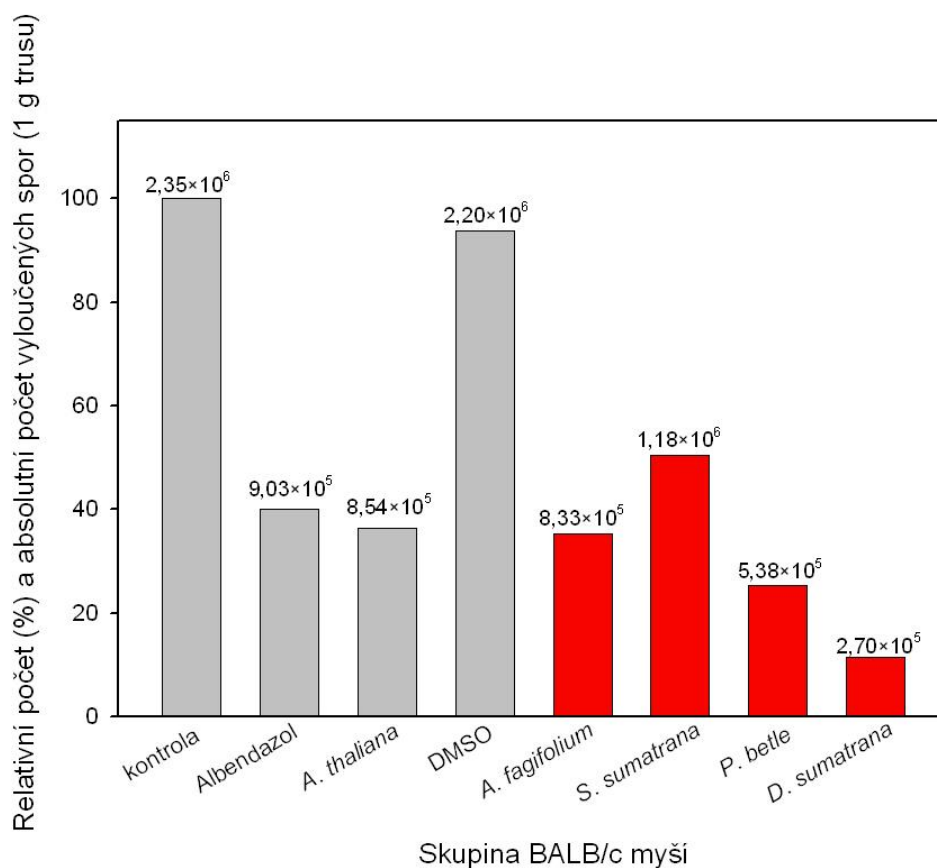


**Obrázek 8:** Průběh vylučování spor *E. cuniculi* (počet spor v 1 g trusu; směrodatná odchylka počítána ze tří jedinců)

Od zahájení léčby 20. DPI nebyl u žádné ze sledovaných skupin v prvních třech dnech pozorován výrazný pokles ve vylučování spor v trusu s výjimkou myši léčených albendazolem a extraktem z *A. fagifolium* (Obrázek 8). Od 24.–25. DPI (4 dny po zahájení léčby) došlo u většiny skupin myši léčených extrakty z rostlin a skupiny léčené albendazolem k postupnému zastavení vylučování spor *E. cuniculi* v trusu a docházelo pouze k intermitentnímu vylučování. Průběh infekce u skupin kontrolních a DMSO myši byl po celou dobu experimentu obdobný (Obrázek 8). Největší efekt na snížení množství vyloučených spor trusem měl extrakt z *D. sumatrana*. U této skupiny po 24. DPI již nebyla zjištěna žádná přítomnost spor v trusu (Obrázek 8).

Pro každou skupinu myši byl rovněž spočítán průměrný počet spor, které tato zvířata vyloučila po dobu od zahájení léčby (20. DPI) do dne ukončení experimentu (34. DPI). Nejvyšší součet počtu vyloučených spor v trusu mezi 20. a 34. DPI byl zaznamenán u kontrolní skupiny ( $2,36 \times 10^6$  spor v 1 g v trusu) a skupiny jedinců, kterým bylo podáváno DMSO ( $2,20 \times 10^6$  spor v 1 g v trusu). U všech ostatních skupin došlo k výraznému poklesu množství vyloučených spor (Obrázek 9).

**Obrázek 9:** Průměrný počet vyloučených spor 20.–34. DPI v 1 g trusu u skupin BALB/c myši ve srovnání s kontrolní skupinou (kontrolní skupina = 100%)



Skupina myši léčená extraktem z *D. sumatrana* vyloučila za sledované období o 88 % spor méně než kontrolní a DMSO skupina. U ostatních rostlinných extraktů byl pokles v rozsahu 50–70 % (Obrázek 9). U skupiny myši, kterým byl podáván albendazol, došlo ke snížení o 60 % oproti kontrole.

Skupiny myši se rovněž navzájem odlišovaly počtem dní, kdy u nich bylo v době mezi 20. až 34. DPI zaznamenáno vylučování spor. Kontrolní skupina a skupina, které bylo podáváno DMSO, vylučovaly celkem 8, respektive 9 dní. Nejnižší počet dní (4 dny) po které léčení jedinci vylučovali spory v trusu bylo zaznamenáno u skupin s aplikací extraktu *D. sumatrana* a *A. fagifolium*. Zvířata ostatních skupin vylučovala spory celkem v 5 dnech od zahájení léčby (Obrázek 8).

#### 4.3.2 Kvantifikace spor *E. cuniculi* v orgánech infikovaných BALB/c myši

Po usmrcení myši 34. DPI byly ze všech jedinců odebrány vzorky tkání. Celkem 12 zkoumaných orgánů každého jedince bylo podrobena qRT PCR, která umožnila kvantifikovat spory *E. cuniculi*. Průměrné množství spor pro 1 g každého orgánu v dané skupině myši je zaznamenán v tabulce 12. Pro všechny jedince byla následně spočítána celková zátěž organismu. Tato hodnota byla stanovena jako součet zjištěných počtů spor v 1 g orgánů.

**Tabulka 12:** Počet spor *E. cuniculi* v orgánech u skupin BALB/c myši 34. DPI (průměrné počty spor na 1 g tkáně $\times 10^5$ ; směrodatná odchylka počítána ze tří jedinců)

Orgány	Kontrola	Albendazol	<i>A. thaliana</i>	DMSO	<i>A. fagifolium</i>	<i>S. sumatrana</i>	<i>P. betle</i>	<i>D. sumatrana</i>
<b>Orgány trávicí trubice</b>								
žaludek	9,4			1,1	4,3	7,0	1,3	
duodenum	1,5			2,5			4,2	
jejunum	5,2		0,5	85,0	6,5	5,9		3,1
ileum							27,6	
cékum	950,0		41,8	922,1				
kolon	63,6			9,1	9,8	21,0	95,8	
<b>mezisoučet</b>	<b>1021,3<math>\pm</math>352</b>	<b>–</b>	<b>42,3<math>\pm</math>16</b>	<b>1019<math>\pm</math>378</b>	<b>20,6<math>\pm</math>7</b>	<b>30,4<math>\pm</math>6</b>	<b>101,7<math>\pm</math>40</b>	<b>3,09<math>\pm</math>3,5</b>
<b>Orgány mimo trávicí trubici</b>								
slezina	25,4	0,2	6,4	4,7	5,5	38,5	10,1	13,4
játra			5,7		2,4	144,0	116,1	
ledviny	0,4			2,5	5,9	72,5	1,0	1,5
srdce	19,8			5,7	28,7	78,7	204,0	36,8
plíce	4,4	0,2	3,0	10,6	146,0	6,15	216,0	40,1
mozek	3,2	0,3	5,1	16,0	116,0	9,9	12,1	14,5
<b>mezisoučet</b>	<b>53,2<math>\pm</math>17</b>	<b>0,6<math>\pm</math>0,5</b>	<b>20,3<math>\pm</math>11</b>	<b>67,3<math>\pm</math>5</b>	<b>304,5<math>\pm</math>134</b>	<b>349,7<math>\pm</math>13</b>	<b>559,2<math>\pm</math>133</b>	<b>106,3<math>\pm</math>6,6</b>
<b>součet</b>	<b>1074<math>\pm</math>341</b>	<b>0,6<math>\pm</math>0,5</b>	<b>62,5<math>\pm</math>27</b>	<b>1090<math>\pm</math>416</b>	<b>325,1<math>\pm</math>267</b>	<b>384,0<math>\pm</math>12</b>	<b>660,8<math>\pm</math>137</b>	<b>109,4<math>\pm</math>10</b>

Průměrný počet spor detekovaných v orgánech se pohyboval mezi hodnotami  $1,26 \times 10^4$  a  $9,25 \times 10^7$  na 1 g tkáně, přičemž nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v céku u myší kontrolní skupiny.

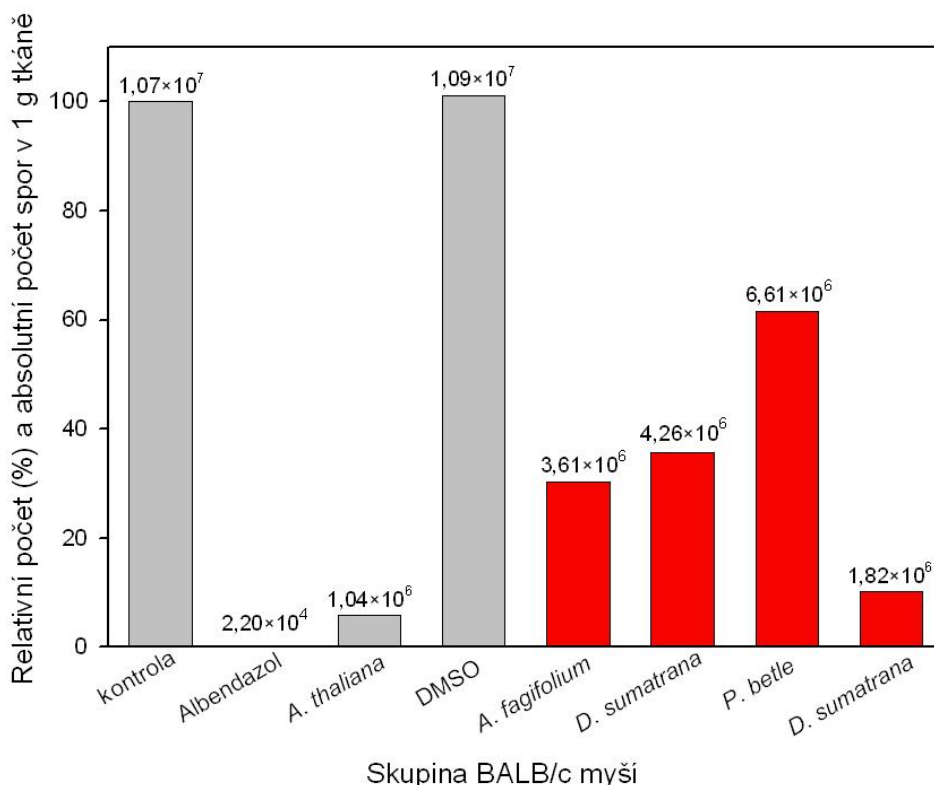
### 4.3.3 Vliv extraktů na počet spor v organismu

Největší průměrná zátěž organismu byla pozorována u kontrolní skupiny a skupiny jedinců, kterým bylo podáváno DMSO ( $1,07 \times 10^8$  a  $1,09 \times 10^8$  spor na 1 g tkáně; Obrázek 10). U jedinců z kontrolní a DMSO skupiny bylo detekováno nejvíce pozitivních orgánů (10/12). Naopak nejnižší zátěž organismu byla detekována u skupiny myší, kterým byl podáván albendazol, zde množství spor dosáhlo  $6,50 \times 10^4$  na 1 g tkáně a přítomnost spor byla prokázána pouze ve třech orgánech. U skupiny jedinců s aplikací *A. thaliana* bylo detekováno  $6,25 \times 10^6$  spor na 1 g tkáně a bylo zjištěno sedm pozitivních orgánů.

Průměrná zátěž organismu u skupin jedinců, kterým byly podávány zkoumané rostlinné extrakty, se pohybovala od  $1,09 \times 10^7$  do  $6,61 \times 10^7$  spor na 1 g tkáně. U skupiny myší, kterým byl aplikován *P. betle* bylo detekováno devět pozitivních orgánů, u skupin s podáváním *A. fagifolium* a *D. sumatrana* sedm pozitivních orgánů a u skupiny jedinců s aplikací *S. sumatrana* šest pozitivních orgánů.

Pro každou skupinu myší byl rovněž stanoven průměrný počet spor připadající na 1 g zkoumaných orgánů, který byl získán jako průměr z počtu spor pro každý orgán. Nejvyšší hodnoty byly opět zaznamenány u kontrolní skupiny a skupiny myší, kterým bylo podáváno DMSO ( $1,07 \times 10^7$  a  $1,09 \times 10^7$  spor na 1 g tkáně). U ostatních skupin byly pozorovány nižší počty spor oproti kontrolní skupině (Obrázek 10). U skupin myší s podáváním rostlinných extraktů bylo zaznamenáno snížení ve srovnání s kontrolní skupinou, a to o 39 % u skupiny s podáváním *P. betle*, o 60 % u skupiny s aplikací *S. sumatrana*, o 66 % u skupiny s *A. fagifolium* a o 83 % u skupiny s podáváním *D. sumatrana*. Největší rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou byly zaznamenány u skupiny jedinců s aplikací kontrolního extraktu *A. thaliana*, kde došlo k poklesu o více než 90 % oproti kontrolní skupině a u skupiny s podáváním albendazolu, kde bylo zaznamenáno snížení o více než 99 %.

**Obrázek 10:** Průměrný počet spor v orgánech u skupin BALB/c myši ve srovnání s kontrolní skupinou (kontrolní skupina = 100 %)



Vliv podávání léčiva nebo rostlinného extraktu na průměrnou zátěž organismu byl ověřen pomocí statistické analýzy. Ta prokázala signifikantní rozdíl v počtu spor *E. cuniculi* v orgánech mezi různými skupinami BALB/c myši ( $F_{7,16} = 13,12$ ;  $p = 1,5 \times 10^{-5}$ ). Navazující analýzy odhalily významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou myši, kterým byl podáván albendazol ( $p = 1,99 \times 10^{-5}$ ) a mezi kontrolní skupinou a skupinou jedinců, kterým byl podáván extrakt *A. thaliana* ( $p = 0,0221$ ). Mezi jinými skupinami statisticky významné rozdíly zaznamenány nebyly ( $p = 0,9999-0,2457$ ).

#### 4.3.4 Vliv extraktů na počet spor v trávící trubici a mimo trávící trubici

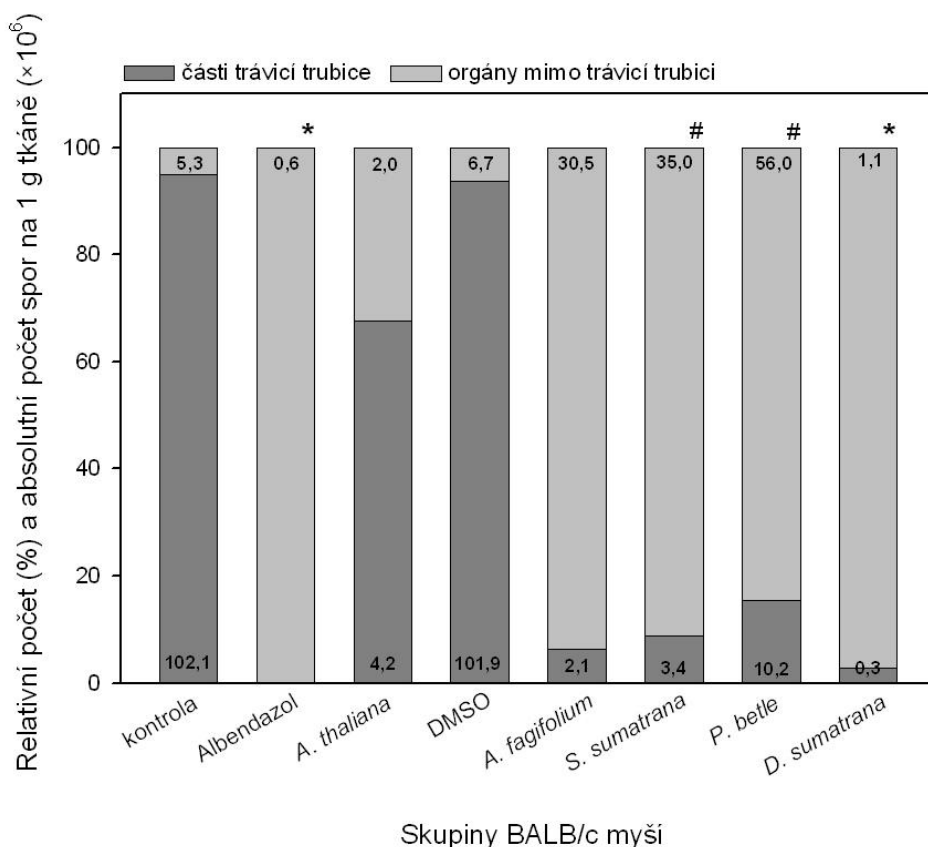
Skupiny myši se mezi sebou značně odlišovaly poměry počtů spor nalezených v trávící trubici a mimo ni. U kontrolní skupiny a skupiny myši, kterým bylo podáváno DMSO, byla většina detekovaných spor lokalizována v trávící trubici (71,2–99,2 %). Opačná byla situace u skupin, kterým byly podávány zkoumané extrakty, kde většina spor byla detekována mimo trávící trubici (87,6–94,2 %).

Vliv rostlinných extraktů a albendazolu na počet spor v trávící trubici byl posouzen pomocí statistické analýzy, která ukázala významný vliv podávaných extraktů nebo léčiva na počet spor v zažívacím traktu ( $F_{7,16} = 10,76$ ;  $p = 5,2 \times 10^{-5}$ ). Navazující analýzy odhalily

statisticky signifikantní snížení počtu spor v trávicí trubici u skupiny jedinců léčených albendazolem ( $p = 2,95 \times 10^{-4}$ ) a mezi skupinou, které byl podáván extrakt *D. sumatrana* ( $p = 0,0036$ ) oproti kontrolní skupině. Ačkoli i u jiných skupin bylo pozorováno snížení v počtu spor oproti kontrole, statisticky významný rozdíl potvrzen nebyl ( $p = 0,6953-0,9388$ ).

Mezi skupinami myší byly rovněž zaznamenány statisticky významné rozdíly v počtu spor mimo trávicí trubici ( $F_{7,16} = 5,24$ ;  $p = 0,0155$ ). I když mezi kontrolní skupinou a dalšími skupinami rozdíl zaznamenán nebyl ( $p = 0,2381-0,9999$ ), statistická analýza ukázala významné navýšení počtu spor u skupiny, které byl podáván extrakt *S. sumatrana* ( $p = 0,0441$ ) nebo extrakt *P. betle* ( $p = 0,0287$ ) oproti skupině s podáváním extraktu *A. thaliana*. U těchto jedinců s podáváním *S. sumatrana* a *P. betle* bylo při pitvě také makroskopicky zaznamenáno významné zvětšení sleziny až na 300 % oproti kontrolní skupině.

**Obrázek 11:** Poměry a absolutní počty spor *E. cuniculi* nalezených v trávicí trubici a mimo trávicí trubici; \* statisticky významné snížení absolutního počtu spor nalezených v trávicí trubici oproti kontrolní skupině; # statisticky významné navýšení absolutního počtu spor mimo trávicí trubici oproti skupině s podáváním extraktu *A. thaliana*





## 5. DISKUZE

### 5.1 Prevalence a diverzita

Lidoopi a lidé sdílejí nejen značnou část genomu a společné předky, ale také řadu patogenů, kteří mezi nimi mohou být přenášeni (Raoult et al. 2012). Tento přenos může představovat významné riziko nejen pro člověka, ale také pro lidoopy, jež se v současné době řadí mezi ohrožené a kriticky ohrožené druhy. Ačkoli byly kryptosporidie, mikrosporidie a giardie podrobně zkoumány u člověka, u lidoopů se těmito parazity zabývalo pouze několik studií (Nizeyi et al. 1999, 2002, Graczyk et al. 2002, Sak et al. 2014, 2013, 2011, Levecke et al. 2007, Lim et al. 2008, Gillespie et al. 2009, van Zijl Langhout et al. 2010, Butel et al. 2015). Navíc jen málo z nich zahrnuje detailní molekulární diagnostiku a odběr dostatečného množství vzorků, který by napomohl odhalit mechanismus šíření těchto parazitů v populacích divokých zvířat. Výzkum zmíněných protistů u lidoopů je komplikovaný už samotným určováním prevalence. Obtížnost studia je dána zejména intermitentním vylučováním parazitů, protože absence parazita v trusu hostitele nemusí znamenat, že daný hostitel není infikován (Sak et al. 2010, 2011b). Přesnější stanovení procenta infikovaných hostitelů vyžaduje dlouhodobější sledování daného jedince a opakovaný odběr vzorků v delších časových úsecích. Tento postup je však u volně žijících lidoopů jen obtížně realizovatelný. Navíc, ačkoli vyšší počet vyšetřených vzorků zvyšuje pravděpodobnost detekce parazita a nepopíratelně přispívá k hlubšímu poznání diverzity těchto protistů u lidoopů, současně komplikuje srovnání s jedinci, u kterých tento opakovaný odběr není možný. Nerovnoměrná četnost vyšetření zvířat následně vede ke zkreslení pozorovaných prevalencí v jednotlivých studovaných populacích. Toto zkreslení může být odstraněno jen částečně, a to za použití pokročilých statistických metod. Studium parazitofauny orangutanů je navíc mimořádně složité v důsledku jejich arboreálního způsobu života, vlivem kterého jsou hůře přístupní než afričtí lidoopi.

V naší práci byla poprvé popsána přítomnost mikrosporidií u orangutanů. Nejčastěji detekovaným parazitem a současně i mikrosporidií vůbec byl *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II, jehož celková prevalence dosáhla 7 %. *Encephalitozoon cuniculi* byl zaznamenán na všech zkoumaných lokalitách s výjimkou dvou. Zajímavé je, že jednou z těchto lokalit bez detekovaných případů *E. cuniculi* byla i rehabilitační stanice na Borneu, kde byla vyšetřena téměř polovina ze všech zkoumaných jedinců. U orangutanů v kontaktu s člověkem bylo na přítomnost *E. cuniculi* pozitivních 4,8 % jedinců, u divokých orangutanů

byla zjištěna prevalence 14,9 %. I přes pozorovaný rozdíl statistické analýzy vliv kontaktu s člověkem na prevalenci tohoto parazita nepotvrdily. Prevalence *E. cuniculi* zaznamenaná u polodivokých orangutanů a orangutanů v záchranné stanici byla nižší, než bylo pozorováno v obdobných studiích u habituovaných afrických lidoopů (Sak et al. 2011, 2014). V publikaci, která se zabývala mikrosporidii ve 13 evropských zoologických zahradách a dvou afrických rezervacích, prevalence tohoto parazita dosáhla 39 % u goril a 21 % u šimpanzů (Sak et al. 2011). Rovněž u goril horských ve zvýšeném kontaktu s člověkem bylo zjištěno vyšší procento nakažených jedinců, a to 11 % (Sak et al. 2014). Ačkoli většina orangutanů pozitivních na *E. cuniculi* pocházela ze Sumatry, statistické analýzy nepotvrdily vyšší pravděpodobnost nákazy na tomto ostrově ve srovnání s Borneem. *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I a genotyp III, stejně jako ostatní druhy rodu *Encephalitozoon* (*E. intestinalis* a *E. hellem*), které byly v minulosti detekovány u šimpanzů a goril, v naší studii nebyly nalezeny (Reetz et al. 2004, Sak et al. 2011, 2013, 2014, Juan Sallés et al. 2006).

Další zaznamenanou mikrosporidií byl *Enterocytozoon bieneusi*, který byl již dříve detekován u afrických lidoopů (Sak et al. 2011, 2013, 2014). V této studii byl pozorován u 2 % jedinců, což je ve shodě s prevalencí pozorovanou u šimpanzů žijících v zoologických zahradách, která činila 2,6 % a také s mírně vyšší prevalencí zaznamenanou u goril nížinných, kde byl *E. bieneusi* pozorován u 4 % zvířat (Sak et al. 2011, 2013). U goril horských byl *E. bieneusi* nalezen u 18 % z nich (Sak et al. 2014). Procento pozitivních jedinců se na jednotlivých lokalitách pohybovalo od 0 do 11,7, přičemž na většině lokalit byl zaznamenan jeden případ infekce, v Ketambe byly zjištěny dva případy a na lokalitách Suaq a Sabangau tento parazit zaznamenaný nebyl. Detekovány byly celkem dva různé genotypy *E. bieneusi* – genotyp D a nově popsany genotyp Pongo 2. Přítomnost genotypu Pongo 2 byla prokázána pouze v jednom případě, a to u orangutana ze záchranné stanice. Ve fylogenetické analýze tento genotyp klastroval s genotypem V, který byl v minulosti nalezen u HIV pozitivního pacienta a společně s řadou genotypů nalezených u afrických lidoopů (genotypy Gorilla 1–2 a 4–8, EpbA a C) spadá do hostitelsky nespecifické skupiny 1 (Thellier et Breton 2008), jejíž zástupci mají zoonotický potenciál a mohou představovat riziko pro člověka. Stejně jako v případě *E. cuniculi* nebyl u *E. bieneusi* shledán žádný vliv kontaktu orangutanů s člověkem na pravděpodobnost výskytu tohoto parazita.

Ačkoli byly kryptosporidie v minulosti u orangutanů zaznamenány ve dvou publikacích, jednalo se pouze o popis na základě morfologie bez zařazení do druhu a následné genotypizace (Foitová et al. 2005, Lim et al. 2008). Určení kryptosporidií za použití

molekulárních metod přináší až tato studie. Přítomnost tohoto parazita byla detekována celkem u osmi jedinců, celková prevalence tak dosáhla 2,7 %. Většina nálezů pocházela od jedinců ze záchranné stanice, jeden případ byl zjištěn u polodivokého jedince z Tanjung Puting a jeden u divokého orangutana na lokalitě Suaq. Ve dvou případech se jednalo o *C. parvum*, identifikovány byly dva typy: *C. parvum* typ A a méně častý *C. parvum* typ B. *Cryptosporidium parvum* typ A byl 100% shodný s izoláty získanými z telat, koz, yaků a člověka (Satoh et al. 2005, Keshavarz et al. 2009, Mi et al. 2013, 2014). Druhý získaný izolát vykazoval 100% shodu s *Cryptosporidium parvum* typ B, který detailně popsal Le Blancq (1997), byl v minulosti nalezen u několika velmi odlišných hostitelů – imunokompetentního a imunosuprimovaného pacienta, kapybary (*Hydrochoerus hydrochaeris*) a gekončika (*Eublepharis macularius*) (Šoba et al. 2006, Meamar et al. 2007, Meireles et al. 2007, Pedraza-Díaz et al. 2009). Podobně jako v předešlé studii zabývající se africkými lidoopy bylo *C. parvum* nalezeno pouze u jedinců, kteří byli v kontaktu s člověkem (Graczyk et al. 2001). Dalším nalezeným druhem v této studii byl *Cryptosporidium muris*, jenž byl zaznamenán celkem u šesti jedinců. Získané sekvence byly 100% shodné se sekvencí nalezenou u krysy a gorily horské (Satoh et al. 2003, Sak et al. 2014). Ačkoli je *C. muris* považován za původce žaludeční kryptosporidiózy hlodavců, byl nalezen také u mnohých dalších živočichů – damanů a velbloudů (Morgan et al. 2000), žiraf (Kodádková et al. 2010), pštrosů (Qi et al. 2014), koček (FitzGerald et al. 2011), tuleňů (Santín et al. 2005) a primátů včetně člověka (Dubey et al. 2002). V našem případě však nemůžeme vyloučit pouhou pasáž oocyst zaživacím traktem orangutanů. Skutečnost, že většina nálezů *C. muris* v této práci pochází od jedinců ze záchranné stanice, je možné vysvětlit zvýšeným kontaktem orangutanů s hlodavci a především s jejich trusem, ke kterému v tomto prostředí může docházet. Častější detekce kryptosporidií u jedinců v zajetí může být také způsobena stresem, který na zvířata v záchranné stanici působí, a s ním spojenou vyšší produkcí kortizolu, která vede ke snížení imunity u stresovaných jedinců (Shutt et al. 2012). Přitom paradoxně klíčovou roli v projektech záchrany orangutanů hrají společně s ochranou jejich přirozeného biotopu procesy rehabilitace a následné reintrodukce jedinců z ilegálního držení zpět do volné přírody, při kterých jedinci v reintrodukčních stanicích často žijí v nepřírodných podmínkách, které dovolují snadný přenos patogenů a mohou tak pro tato zvířata představovat významné riziko. Rovněž zavlečení patogenů s reintrodukovanými jedinci do naivních populací může vystavit tato ohrožená zvířata značnému nebezpečí (Kilbourn et al. 2003). Vyšší pravděpodobnost nákazy kryptosporidii u skupin polodivokých jedinců a u jedinců žijících v zajetí v porovnání

se skupinami divokých orangutanů prokázala také statistická analýza. Mezi skupinou polodivokých jedinců a orangutanů žijících v zajetí tento rozdíl prokázán nebyl. Tyto výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými pracemi různých autorů, které ukazují na vyšší prevalenci kryptosporidií u primátů žijících v zajetí (Graczyk et al. 2001, 2002, Nizeyi et al., 2002, van Zijll Langhout et al. 2010). Na druhou stranu statistické analýzy tento vliv v předchozích studiích u afrických lidoopů nepotvrdily, ačkoli většina pozitivních nálezů byla tehdy zaznamenána u jedinců ve zvýšeném kontaktu s člověkem (Sak et al. 2013, 2014). Neprůkaznost analýz byla dána omezeným počtem vyšetřovaných vzorků a nízkou zaznamenanou prevalencí.

V naší studii byla také u zkoumaných jedinců zjištěna vyšší pravděpodobnost nákazy kryptosporidii na Borneu ve srovnání se Sumatrou. Tento výsledek je ovšem pravděpodobně způsoben tím, že na Borneu byla většina pozitivních vzorků získána ze záchranné stanice, kdežto materiál od orangutanů v natolik blízkém kontaktu s člověkem ze Sumatry nebyl k dispozici.

V současné době rozlišujeme celkem osm asambláží *G. intestinalis*, které se navzájem liší svou hostitelskou specifitou (Monis et al. 2009). Zatímco asambláže A a B jsou považovány za zoonotické a jsou infekční pro široké spektrum hostitelů, které zahrnuje primáty včetně člověka, domácí i divoká zvířata; asambláže C až H jsou úzce hostitelsky specifické. Ačkoli bylo u orangutanů v minulosti zaznamenáno několik případů *G. intestinalis*, zařazení do asambláží nezahrnovaly (Cummings et al. 1973, Stafford et al. 1979, Mul et al. 2007, Labes et al. 2010). V naší práci byl detekován pouze jeden jedinec infikovaný giardii (0,4 %), a to na lokalitě Bukit Lawang. Tento ojedinělý výskyt je v souladu s nízkou nebo nulovou prevalencí zjištěnou v předchozích studiích u afrických lidoopů (Nizeyi et al. 2002, Sak et al. 2013, 2014). Na základě provedených fylogenetických analýz nalezený izolát náleží do asambláže B subtypu MB6 nedávno zaznamenaného u makaka rhesus žijícího v zajetí (Karim et al. 2014). Ačkoli je detekce *G. intestinalis* asambláže B ve shodě s převahou nálezů této asambláže u primátů, u afrických lidoopů byla doposud popsána pouze asambláž A (Sak et al. 2013, Nizeyi et al. 2002, Ryan et Caccio 2013). Vzhledem k tomu, že nalezený izolát pochází z Bukit Lawang, tedy z lokality, kde dochází ke kontaktu orangutanů s člověkem, je možné, že zde došlo k přenosu giardií z lidí na lidoopy. Přenos giardií mezi člověkem a primáty předpokládá i několik předchozích studií (Johnston et al. 2010, Lalle et al. 2005, Graczyk et al. 2002), nicméně nebyl v žádné z nich spolehlivě prokázán. Přítomnost giardií byla zaznamenána jak u domorodého obyvatelstva Indonésie a Malajsie (Mahdy et al. 2008, Al-Mekhlafi et al. 2005, Choy et al. 2014), tak u zvířat,

jejichž areál rozšíření se překrývá s areálem rozšíření studovaných jedinců – outloňů (*Nycticebus* spp.) a makaků (Majewska et Kasprzak 1990, Karim et al. 2014). Bohužel na základě jediného nálezu u orangutanů bez vyšetření domorodého obyvatelstva a populací divokých zvířat nelze posoudit mechanismus šíření tohoto parazita a rezervoár infekce zůstává nejasný.

Přestože výsledky této práce prokázaly přítomnost studovaných parazitů u orangutanů na téměř všech studovaných lokalitách, informace o patogenitě zmíněných protist u těchto kriticky ohrožených hostitelů stále chybí. Velmi obtížné je rovněž posouzení vlivu kontaktu lidoopů s člověkem na prevalenci těchto patogenů a následné hodnocení rizik, která z něj vyplývají.

## 5.2 Experimentální infekce

*Enterocytozoon cuniculi* je nejlépe prostudovanou mikrosporidií savců; doposud byl popsán u více než 30 druhů z nich (Cali et al. 2011). V této studii byl rovněž zaznamenán u orangutanů, u nichž byl nejčastěji detekovaným parazitem vůbec. I když je většina diagnostikovaných mikrosporidióz u člověka a lidoopů způsobena druhem *Enterocytozoon bieneusi*, výzkum mikrosporidií je zaměřen právě na *E. cuniculi*, pro jehož studium existuje nejen vhodný zvířecí model, ale současně může být také úspěšně pěstován v buněčných kulturách. Ke složitosti studia tohoto parazita v modelech *in vivo* ovšem významně přispívá jeho diseminace do téměř všech orgánů hostitele (Mertens et al. 1997). Průběh infekce *E. cuniculi* v imunokompetentním hostiteli a šíření tohoto agens v jeho organismu byl popsán v předešlé studii, v níž byl sledován průběh infekce na modelu BALB/c myši (Kotková et al. 2013). U vyšetřovaných jedinců docházelo k postupné diseminaci infekce *E. cuniculi* do jednotlivých orgánů. Zatímco 7. DPI byly spory zaznamenány pouze v ileu, ve 21. DPI byly spory prokázány již v sedmi orgánech. Nejvíce infikovaných orgánů bylo pozorováno 35. DPI, kdy byly spory detekovány ve všech testovaných orgánech s výjimkou žaludku. Od tohoto dne byl opět pozorován postupný pokles v počtu infikovaných orgánů až do ukončení pokusu 56. DPI. V tento den byla přítomnost spor zaznamenána pouze ve slezině. Zmíněná studie tedy prokázala akutní fázi infekce *E. cuniculi* mezi 21. DPI a 35. DPI. Uvedených poznatků bylo využito v naší práci a zkoumané rostlinné extrakty byly podávány právě v tomto časovém rozpětí. Ve shodě s prací Kotkové a kolektivu (2013) byla u kontrolních skupin myši bez podávání rostlinných extraktů ve 34. DPI detekována přítomnost spor *E. cuniculi* téměř ve všech zkoumaných orgánech. Infekce nebyla

zaznamenána pouze v ileu a játrech. Největší množství spor bylo nalezeno v céku, v němž jejich počet mnohonásobně převyšoval počty spor v ostatních orgánech. Z orgánů mimo gastrointestinální trakt byla největší intenzita infekce zjištěna ve slezině. U skupiny s podáváním roztoku DMSO, u které byl průběh infekce téměř shodný s průběhem pozorovaným u kontrolní skupiny, bylo rovněž detekováno největší množství spor v céku a z orgánů mimo gastrointestinální trakt v mozku.

Od kontrolní skupiny myši se nejvíce odlišovala skupina, které byl podáván derivát benzimidazolu albendazol. Ačkoli je albendazol ve veterinární i klinické medicíně používán zejména jako širokospektrální anthelmintikum, prokázána byla i jeho účinnost proti některým z protist včetně mikrosporidiových infekcí způsobených *E. cuniculi* (Elnima et al. 1981, Weiss et al. 1994). Nicméně řada studií poukazuje na to, že léčba albendazolem nemusí být zcela účinná a nemusí vést k úplnému vymizení spor z tkání (Kotková et al. 2013, Lallo et al. 2013, Hocevar et al. 2014). Tyto poznatky jsou ve shodě s naší prací, v níž bylo i po podávání maximální doporučené dávky albendazolu pozorováno malé množství spor přetrvávající ve slezině, plicích a mozku. V orgánech gastrointestinálního traktu po léčbě albendazolem žádné spory detekovány nebyly. Na skutečnost, že spory *E. cuniculi* mohou být přítomny v orgánech jinak zdravých imunokompetentních jedinců a i přítomnost malého množství spor může po imunosupresi organismu vést k rozvoji vážné infekce, upozorňují dvě nedávno publikované práce (Hocevar et al. 2014, Ladapo et al. 2014). V těchto publikacích byl popsán přenos *E. cuniculi* skrze transplantované orgány od asymptomatických dárců, které v imunosuprimovaném organismu recipientů vyvolaly systémové onemocnění. Obdobná situace byla demonstrována ve studii Kotkové a kolektivu (2013), která sledovala vliv podávání albendazolu na infekci *E. cuniculi* u BALB/c myši. Ačkoli byla po dvou týdnech léčby mezi 28. a 42. DPI zjištěna přítomnost spor ve slezině a mozku, 56. DPI spory nebyly zaznamenány v žádném z vyšetřovaných orgánů. Nicméně po imunosupresi těchto jedinců od 56. DPI došlo k opětovnému rozvoji infekce, který ukazuje na přítomnost malého množství spor v organismu i po ukončení léčby albendazolem. Naše pozorování společně s uvedenými publikacemi jednoznačně ukazuje na nutnost stanovení optimálního dávkovací schématu při léčbě infekcí *E. cuniculi* a zároveň hledání nových potencionálních léčiv.

Nápadná je rozdílnost některých výsledků naší práce a studie Kotkové a kolektivu (2013). V publikaci těchto autorů byla zaznamenána výrazně nižší frekvence vylučování spor *E. cuniculi* v trusu u jedinců se standardním průběhem infekce a také menší počet infikovaných orgánů u myši po léčbě albendazolem. Zatímco Kotková s kolektivem

detekovala spory v trusu pouze 5.–7. DPI a následně 20. DPI (po dobu čtyř dnů), v naší práci bylo ve stejném časovém úseku pozorováno vylučování spor od 3. do 25. DPI a naposledy byla přítomnost spor zaznamenána 32. DPI (spory byly tedy v trusu detekovány po dobu 25 dní). Rozdílné pozorování v těchto dvou studiích je nejspíše dáno vyšší záchytností qRT-PCR ve srovnání s nested PCR použitou v předcházející studii. Tento předpoklad může vysvětlovat i detekce spor v plicích u jedinců po léčbě albendazolem, které nebyly v práci Kotkové a kolektivu zaznamenány. Kvantitativní real-time PCR tedy umožnila nejen i) kvantifikaci spor v trusu a tkáních, ale také ii) zvýšení detekčního limitu spor. Tyto dva aspekty významně přispěly k ucelenější představě o průběhu infekce *E. cuniculi* u BALB/c myši.

U všech ze studovaných extraktů byl pozorován vliv na průběh infekce. Největší vliv na redukci infekce *E. cuniculi* měl extrakt *D. sumatrana*. U skupiny s podáváním tohoto extraktu byl ve srovnání s kontrolní skupinou pozorován nejen značný pokles počtu vyloučených spor v trusu, ale také signifikantní snížení počtu spor v orgánech gastrointestinálního traktu. *Diospyros sumatrana* je dřevina čeledi *Ebenaceae* vyskytující se na území Indočíny a Malajsie a její farmakologické účinky doposud nebyly zkoumány v žádné publikaci. Značný pokles počtu spor v orgánech gastrointestinálního traktu byl pozorován i u dalších studovaných rostlin, ovšem tyto rozdíly se neukázaly být statisticky významné. Přestože všechny testované rostlinné extrakty způsobily celkový pokles počtu spor v organismu, u extraktů *Piper betle* a *Shorea sumatrana* bylo zjištěno signifikantní navýšení počtu spor v orgánech mimo gastrointestinální trakt ve srovnání se skupinou, které byl podáván extrakt *A. thaliana*. U těchto skupin myši byla při pitvě také pozorována splenomegalie, která pravděpodobně souvisela se zvýšenou migrací buněk imunitního systému do sleziny, kde dochází ke zrání B lymfocytů produkujících protilátky. Ačkoli se protilátky v imunitní odpovědi proti mikrosporidiím neuplatňují, dochází k jejich zvýšené produkci vlivem polarizace imunity směrem k Th2 funkční imunitní odpovědi (Didier et Bessinger 1999). *Shorea sumatrana* je kriticky ohrožená dipterokarpní dřevina svým výskytem omezená pouze na Sumatru a Thajsko. Její farmakologické účinky nebyly doposud popsány v žádné publikaci. Naopak *Piper betle* (pepř betelový) patří mezi hojně studované rostliny s širokým využitím v lidovém léčitelství (Singh et al. 2009). Výsledky studií rovněž ukazují na jeho farmakologické účinky, antimikrobiální a protizánětlivou aktivitu (Sarkar et al. 2008, Singh et al. 2009). V pokusech *in vitro* byl zaznamenán účinek této rostliny proti *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* a *Leishmania donovani* a v modelech *in vivo* vliv na snížení infekce *Brugia malayi* (Sawangjaroen et al. 2006, Sarkar et al. 2008, Singh et al.

2009). Velmi překvapivý byl pozorovaný vliv rostlinného extraktu *A. thaliana* na snížení počtu spor v tkáních, u této skupiny efekt na počet spor očekáván nebyl a doposud u něj nebyly zjištěny žádné antiparazitární účinky. Do experimentu byl zařazen pouze jako negativní kontrola, ačkoli v obdobných studiích při výzkumu vlivu rostlinných látek na parazitární infekci kontrolní skupiny jedinců s podáváním rostlin bez potencionálního farmakologického účinku zařazovány běžně nejsou (Tripathi et al. 1999, Singh et al. 2009, Hewawasam et al. 2004, Squires et al. 2011).

Ačkoli výsledky této práce ukazují na významnou redukci počtu spor *E. cuniculi* u jednoho ze zkoumaných extraktů, potvrzení tohoto závěru jednoznačně vyžaduje další studium. Tento výzkum však naráží na řadu potíží – jedním ze zásadních problémů je dávkování rostlinných extraktů, jelikož neznalost účinné látky a její koncentrace v extraktu přímo vylučuje určit její vhodnou dávku. V podobných studiích je tato situace řešena jako podávání rostlinných extraktů naslepo v několika odlišných dávkách, jež se většinou pohybují mezi 50 až 1000 mg extraktu/kg váhy jedince (Tripathi et al. 1999, Hewawasam et al. 2004, Singh et al. 2009, Squires et al. 2011). V naší studii byla zvolena průměrná hodnota 400 mg extraktu/kg váhy zvířete. Ovšem ukazuje se, že stejná rostlina podávaná v různých množstvích může mít vliv pouze v jedné z dávek, přičemž ve vyšších nebo nižších množstvích mít žádný vliv nemusí (Tripathi et al. 1999, Squires et al. 2011). Jiným problémem je výběr vhodného rozpouštědla rostlinného extraktu, v němž dochází k izolaci účinných látek. V této práci byl použit pouze methanolický extrakt rostlin a další možná rozpouštědla testována nebyla. Tyto aspekty, podávání rostlinných extraktů v rozdílných dávkách a rozpouštědlech, budou zahrnuty do navazujících experimentů při testování rostliny *D. sumatrana*, u které byl v této studii pozorován největší vliv na redukci infekce *E. cuniculi*.



## 6. ZÁVĚRY

- 1) U orangutanů byla poprvé zaznamenána přítomnost mikrosporidií, kryptosporidií a giardií pomocí molekulárních metod. Byly detekovány druhy *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II, *Encephalitozoon bienersi* genotyp D a *E. bienersi* Pongo 2, *Cryptosporidium muris*, *C. parvum* Typ A, *C. parvum* Typ B a *Giardia intestinalis* subtyp MB6.
- 2) Polodivocí orangutani a jedinci žijící v zajetí jsou vystaveni vyššímu riziku infekce kryptosporidii než divocí jedinci. Nebyl prokázán vliv stupně kontaktu s člověkem na výskyt mikrosporidií.
- 3) Citlivost reakce pro detekci spor *E. cuniculi* pomocí qRT PCR ve 200 mg trusu nebo tkáně byla stanovena jako  $10^3$ .
- 4) Rostlinný extrakt z *Diospyros sumatrana* významně snižoval počet spor *E. cuniculi* v trávicí trubici u BALB/c myši s infekcí *E. cuniculi* oproti kontrolní neléčené skupině.
- 5) Extrakty z *Shorea sumatrana* a *Piper betle* významně zvýšily absolutní počet spor *E. cuniculi* v orgánech mimo trávicí trubici ve srovnání s kontrolními léčenými skupinami.
- 6) Získané výsledky naznačují potenciální farmakologické účinky použitých extraktů, především extraktu z *Diospyros sumatrana*, který bude předmětem dalšího studia.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adam R. D. 2001.** Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*. 14: 447–475.
- Adamu H., Petrosa B., Hailub A., Petryc F. 2010.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolate. *Acta Tropica*. 115: 77–83.
- Adl S. M., Simpson A. G., Farmer M. A., Andersen R. A., Anderson O. R., Barta J. R., Bowser S. S., Brugerolle G., Fensome R. A., Fredericq S. et al. 2005.** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 52: 399–451.
- Alexeieff A. 1914.** Notes Protistologiques. *Zoologischer Anzeiger*. 44: 193–213.
- Al-Mekhlafi M. S., Azlin M., Nor Aini U., Shaik A., Sa'iah A., Fatmah M. S., Ismail M. G., Ahmad Firdaus M. S., Aisah M. Y., Rozlida A. R., Norhayati M. 2005.** Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 99: 686–691.
- Amadi B., Mwiya M., Musuku J., Watuka A., Sianongo S., Ayoub A., Kelly P. 2002.** Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2: 1375–1380.
- Amadi B., Mwiya M., Sianongo S., Payne L., Watuka A., Katubulushi M., Kelly P. 2009.** High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. *MBC Infectious Diseases*. 9:195.
- Anver M. R., King M. W., Hunt R. D. 1972.** Congenital encephalitozoonosis in a squirrel monkey. *Veterinary Pathology*. 9: 475–480.
- Asakura T., Nakamura S., Ohta M., Une Y., Furuya K. 2006.** Genetically unique microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* strain type III isolated from squirrel monkeys. *Parasitology International*. 55: 159–162.
- Ashton N., Wirasinha P. A. 1973.** Encephalitozoonosis of the Cornea. *British Journal of Ophthalmology*. 57: 669–674.
- Audemard A., Le Bellec M. L., Carluet L., Dargère S., Verdon R., Castrale C., Lobbedez T., Hurault de Ligny B. 2012.** Fumagillin-induced aseptic meningoencephalitis in a kidney transplant recipient with microsporidiosis. *Transplant Infectious Disease*. 14: 147–149.

- Aufreiter S., Mahaney W. C., Milner M. W., Huffman M. A., Hancock R. G., Wink M., Reich M. 2001.** Mineralogical and chemical interactions of soils eaten by chimpanzees of the Mahale Mountains and Gombe Stream National Parks, Tanzania. *Journal of Chemical Ecology*. 27: 285–311.
- Balbani G. 1882.** Sur les microsporidies ou psorospermies des articles. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. Paris. 1168–1171.
- Baker M. 1996.** Fur rubbing: use of medicinal plants by capuchin monkeys (*Cebus capucinus*). *American Journal of Primatology*. 38: 263–270.
- Baruš V., Foitová I., Koubková B., Hodová I., Šimková A., Nurcahyo W. 2007.** A new nematode, *Pongobius hugoti* gen. et sp. n. from the orangutan *Pongo abelii* (Primates: Hominidae). 44: 162–169.
- Beck R., Sprong H., Bata I., Lucinger S., Pozio E., Cacciò S. M. 2011.** Prevalence and molecular typing of *Giardia* spp. in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia. *Veterinary Parasitology*. 175: 40–46.
- Bergquist R., Morfeldt-Månsson L., Pehrson P. O., Petrini B., Wasserman J. 1984.** Antibody against *Encephalitozoon cuniculi* in Swedish homosexual men. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 16: 389–391.
- Berrilli F., Prisco C., Friedrich K. G., Di Cerbo P., Di Cave D., De Liberato C. 2011.** *Giardia duodenalis* assemblages and *Entamoeba* species infecting non-human primates in an Italian zoological garden: zoonotic potential and management traits. *Parasites & Vectors*. 4: 199.
- 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. *Genitourinary Medicine*. 72: 445.
- Blanchard R. 1888.** Remarques sur le megastome intestinal. *Bulletin de la Société Zoologique de France*. 13: 18.
- 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. J., Trewenthan W. P., Kupper J. L., McKee A. E. 1973.** Nosematosis in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Journal of Medical Primatology*. 2: 114–123.

- Bryan R. T., Schwarz D. A. 1999.** Epidemiology of microsporidiosis In: The microsporidia and microsporidiosis, M. Wittner and L. M. Weiss (Eds.). ASM Press, Washington, D. C. 502–516.
- 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., Enriquise 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.
- 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.
- Butel C., Mundeke S. A., Drakulovski P., Krasteva D., Ngole E. M., Mallié M., Delaporte E., Peeters M., Locatelli S. 2015.** Assessment of infections with microsporidia and *Cryptosporidium* spp. in fecal samples from wild primate populations from Cameroon and Democratic Republic of Congo. *International Journal of Primatology* 36: 227–243.
- Cacciò S., Pinter E., Fantini R., Mezzaroma I., Pozio E. 2002.** Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 85–86.
- Cali A., Takvorian P. M. 2014.** Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia. In: *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, first edition. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds.). John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK. 71–133.
- 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., Neafie R. C., Takvorian P. M. 2011.** Microsporidiosis. In: *Topics on the pathology of protozoan and invasive arthropod diseases*. Meyers W. M., Firpo A., Wear D. J. (Eds.). Armed Forces Institute of Pathology Washington DC. 1–24.
- 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.
- Castella, G., Chapuisat, M., Christe, P. 2008.** Prophylaxis with resin in wood ants. *Animal Behaviour*. 75: 1591–1596.

- Cavalier-Smith T. 1983.** A 6-kingdom classification and a unified phylogeny. In: Endocytobiology II: Intracellular Space as Oligogenetic Ecosystem. Schenk H. E. A., Schwemmler W. (Eds.) Walter de Gruyter. Berlin. 1027–1034.
- Cavalier-Smith T., Chao E. E., Snell E. A., Berney C., Fiore-Donno A. M., Lewis R. 2014.** Multigene eukaryote phylogeny reveals the likely protozoan ancestors of opisthokonts (animals, fungi, choanozoans) and Amoebozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 81: 71–85.
- 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.
- Collet J. Y., Galdikas B. M., Sugarjito J., Jojosudharmo S. 1986.** A coprological study of parasitism in orangutans (*Pongo pygmaeus*) in Indonesia. *Journal of Medical Primatology*. 5: 121–129.
- 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.
- Corradi N., Keeling P. J. 2009.** Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biology Reviews*. 23: 1–8.
- Costa S. F., Weiss L. M. 2000.** Drug treatment of microsporidiosis. *Drug Resistance Update*. 3: 384–399.
- 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.
- Cui Z., Wang R., Huang J., Wang H., Zhao J., Luo N., Li J., Zhang Z., Zhang L. 2014.** Cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium parvum* subtype IIdA15G1 at a dairy farm in Northwestern China. *Parasites & Vectors*. 7: 529.
- Cummings L. B., Keeling M. E., McClure H. M. 1973.** Preventive medicine in anthropoids: parasite control. *Laboratory Animal Science*. 23: 819–822.
- Current W. L., García L. S. 1991.** Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 4: 325–358.
- Dai J., Wang P., Adusumilli S., Booth C. J., Narasimhan S., Anguita J., Fikrig E. 2009.** Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell host & Microbe*. 6: 482–492.

- da Silva A. J., Cacciò S., Williams C., Won K. Y., Nace E. K., Whittier C., Pieniazek N. J., Eberhard M. L. 2003.** Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. *Veterinary Parasitology*. 111: 297–307.
- Davis M. R., Kinsel M., Wasson K., Boonstra J., Warneke M., Langan J. N. 2008:** Fatal disseminated encephalitozoonosis in a captive, adult Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*) and subsequent serosurvey of the exposed conspecifics. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 39: 221–227.
- Dawson, D. 2005.** Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology*. 103: 207–227.
- Debenham J. J., Atencia R., Midtgaard F., Robertson L. J. 2015.** Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*), mandrills (*Mandrillus sphinx*) and wild Zanzibar red colobus monkeys (*Procolobus kirkii*). *Journal of Medical Primatology*. 44: 60–65.
- de Carvalho Filho P. R., Cardozo S. V., Ribeiro C. T., de Medeiros S. M., Lopes C. W. G. 2006.** Intestinal Protozoa in apprehended New World non human primates. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 43: 354–361.
- Decraene V., Lebbad M., Botero-Kleiven S., Gustavsson A. M., Löfdahl M. 2013.** First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiology and Infection*. 140: 519–527.
- 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.
- del Aguila C., Izquierdo F., Navajas R., Pieniazek N. J., Miró G., Alonso A. I., Da Silva A. J., Fenoy S. 1999.** *Enterocytozoon bieneusi* in animals: rabbits and dogs as new hosts. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46: 8–9.
- 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*. 48: 75–78.
- Delgado, R. A., van Schaik C. P. 2000.** The behavioral ecology and conservation of the orangutan (*Pongo pygmaeus*): a tale of two islands. *Evolutionary Anthropology*. 9: 201–218.
- Dellatore D. F., Waitt C. D., Foitová I. 2009.** Two cases of mother-infant cannibalism in orangutans. *Primates*. 50: 277–281.

- Dengjel B., Zahler M., Hermanns W., Heinritzi K., Spillmann T., Thomschke A., Löscher T., Gothe R., Rinder H. 2001.** Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. Journal of Clinical Microbiology. 12: 4495–4499.
- deRegnier D. P., Cole L., Schupp D. G., Erlandsen S. L. 1989.** Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. Applied and Environmental Microbiology. 55: 1223–1229.
- de Roode J. C., Lefevre T., Hunter M. D. 2013.** Self-medication in animals. Science 340: 150–151.
- 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 bieneusi* n. g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. Journal of Protozoology. 32: 250–254.
- Deplazes P., Mathis A., Weber R. 2000.** Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. Contributions to Microbiology. 6: 236–260.
- Didier E. S. 2005.** Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in human and animals. Acta Tropica. 94: 61–76.
- Didier E., Bessinger G. 1999.** Host-Parasite Relationships in Microsporidiosis: Animal Models and Immunology. In: Microsporidia and Microsporidiosis. Wittner M., Weiss L. (eds.). ASM Press, Washington, DC.
- Didier E. S., Didier J. P., Friedberg D. N., Stenson S. M., Oreste 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., Snowden K. F., Shadduck J. A. 1998.** Biology of microsporidian species infecting mammals. Advances in Parasitology. 40: 283–320.
- Didier E. S., Stovall M. E., Green L. C., Brindley P. J., Sestak K., Didier P. J. 2004.** Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Veterinary Parasitology. 126: 145–166.
- Didier E. S., Varner P. W., Didier P. J., Aldras A. M., 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.
- Djojoasmoro, R., Purnomo, A. 1998.** Prevalensi Nematoda Usus pada Orangutan di Taman Nasional Tanjung Puting Kalimantan Tengah. Journal of Primatology of Indonesia. 2:9–12.

- Dobell C. 1920.** The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proceedings of The Royal Society of Medicine.* 13: 1–15.
- 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.
- Dowd S. E., John D., Eliopolus J., Gerba C. P., Naranjo J., Klein R., Lopez B., de Mejia M., Mendoza C. E., Pepper I. L. 2003.** Confirmed detection of *Cyclospora cayetanensis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* in water used for drinking. *Journal of Water and Health* 1: 117–123.
- 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.
- Du S. Z., Zhao G. H., Shao J. F., Fang Y. Q., Tian G. R., Zhang L. X., Wang R. J., Wang H. Y., Qi M., Yu S. K. 2015.** *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, and *Enterocytozoon bienersi* in captive non-Human primates in Qinling Mountains. *The Korean Journal of Parasitology.* 53: 395–402.
- 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.
- 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.
- Elnima E. I., Zubair M. U., Al-Badr A. A. 1981.** Antibacterial and antifungal activities of benzimidazole and benzoxazole derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 19: 29–32.
- 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.
- Erickson M. C., Ortega Y. R. 2006.** Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. *Journal of Food Protection.* 69: 2786–2808.
- Escobedo A.A., Almirall P., Alfonso M., Salazar Y., Avila I., Cimerman S., Núñez F. A, Dawkins I.V. 2007.** Hospitalization of Cuban children for giardiasis: a retrospective study in a paediatric hospital in Havana. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 105: 47–56.



- Escobedo A. A., Almirall P., Robertson L. J., Franco R. M. B., Hanevik K., Mørch K., Cimerman S. 2010.** Giardiasis: the ever-present threat of a neglected disease. *Infectious Disorders – Drugs Targets*. 10: 329–348.
- Fayer R. 2004.** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*. 126: 37–56.
- Fayer R., Santín-Duran M. 2014.** Epidemiology of Microsporidia in Human Infections. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds.). John Wiley & Sons, Inc., Chichester UK.
- Fayer R., Xiao L. 2007.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press. 576 pp.
- Feltus D. C., Giddings C. W., Schneck B. L., Monson T., Warshauer D., McEvoy J. M. 2006.** Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 4303–4308.
- Feng Y. 2010.** *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Experimental parasitology*. 124: 128–137.
- Feng Y., Xiao L. 2011.** Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical microbiology reviews*. 24: 110–140.
- FitzGerald L., Bennett M., Ng J., Nicholls P., James F., Elliot A., Slaven M., Ryan U. 2011.** Morphological and molecular characterisation of a mixed *Cryptosporidium muris*/*Cryptosporidium felis* infection in a cat. *Veterinary Parasitology*. 175: 160–164.
- Foitová I. 2002.** Parazitofauna orangutanů (*Pongo pygmeus* Linnaeus, 1760) ve vztahu k ekologickým a etologickým faktorům. Dizertační práce, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno.
- Foitová I. 2005.** Intestinal Parasites of Semi-Wild and Wild Orangutan (*Pongo abelii*) in North Sumatra with Detailed Diagnostics of Protozoa. Report to Foundation UMI Saving of Pongidae.
- Foitová I., Baruš V., Koubková B., Masová S., Nurcahyo W. 2010.** Description of *Lemuricola pongoi* – male (Nematoda: Enterobiinae) parasitising orangutan *Pongo abelii*. *Parasitology Research*. 106: 817–820.
- Foitová I., Civaňová K., Baruš V., Nurcahyo W. 2014.** Phylogenetic relationships between pinworms (Nematoda: Enterobiinae) parasitising the critically endangered orangutan, according to the characterisation of molecular genomic and mitochondrial markers. *Parasitology Research*. 113: 2455–2466.
- Foitová I., Huffman M. A., Wisnu N., Olšanský M. 2009.** Parasites and their impacts on orangutan health. In: *Orangutans, Geographic variation in Behavioral Ecology and*

Conservation. Wich S. A., Atmoko U. S. S., Setia T. M., van Schaik C. P. (Eds.). Oxford University Press.

**Foitová I., Koubková B., Baruš V., Nurcahyo W. 2008.** Presence and species identification of the gapeworm *Mammomonogamus laryngeus* (Railliet, 1899) (Syngamidae: Nematoda) in a semi-wild population of Sumatran orangutan (*Pongo abelii*) in Indonesia. *Research in Veterinary Science*. 84: 232–236.

**Foitová I., Mašová S., Tenora F., Koubková B., Hodová I., Vyskočilová M., Baruš V., Nurcahyo W. 2011.** Redescription and resurrection of *Bertiella satyri* (Cestoda, Anoplocephalidae) parasitizing the orangutan (*Pongo abelii*) in Indonesia. *Parasitology Research*. 109: 689–697.

**Franzen C., Müller A. 2001.** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection*. 3: 389–400.

**Frazier-Tailor H., Galdikas B., Karesh B. W. 1987.** A survey of intestinal parasites in wild, ex-captive and captive orangutans (*Pongo pygmeus*). Part one. Part two. *Animal Keepers Forum* 8: 245–254.

**Fruth B., Ikombe N. B., Matshimba G. K., Metzger S., Muganza D. M., Mundry R., Fowler A. 2014.** New evidence for self-medication in bonobos: *Manniophyton fulvum* leaf- and stemstrip-swallowing from LuiKotale, Salonga National Park, DR Congo. 76: 146–158.

**Fowler A., Koutsioni Y., Sommer V. 2007.** Leaf-swallowing in Nigerian chimpanzees: evidence for assumed self-medication. *Primates*. 48: 73–76.

**Gardner T. B., Hill D. R. 2001.** Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiological Reviews*. 14: 114–128.

**Giles M., Webster K. A., Marshall J. A., Catchpole J., Goddard T. M. 2001.** Experimental infection of a lamb with *Cryptosporidium parvum* genotype 1. *The Veterinary Record*. 149: 523–525.

**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 Journal*. 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: 771–785.

**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.

**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., Sunderland D., Tamang L., Lucy F. E., Breysee P. N. 2007.** Bather density and levels of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and pathogenic microsporidian spores in recreational bathing water. *Parasitology Research*. 101: 1729–1731.

**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.

**Gross U. 2003.** Treatment of microsporidiosis including abendazole. *Parasitology Research*. 90: 14–18.

**Gonzalez-Moreno O., Hernandez-Aguilar R. A., Piel A. K., Stewart F. A., Gracenea M., Moore J. 2013.** Prevalence and climatic associated factors of *Cryptosporidium* sp. infections in savanna chimpanzees from Ugalla, Western Tanzania. *Parasitology Research*. 112: 393–399.

**Gómez M. S., Gracenea M., Gosalbez P., Feliu C., Enseñat C., Hidalgo R. 1992.** Detection of oocysts of *Cryptosporidium* in several species of monkeys and in one prosimian species at the Barcelona Zoo. *Parasitology Research*. 78: 619–620.

**Gómez M. S., Gracenea M., Montoliu I., Feliu C., Monleon A., Fernandez J. 1996.** Intestinal Parasitism—protozoa and Helminths in Primates at the Barcelona ZOO. *Journal of Medical Primatology*. 25: 419–423.

**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.

**Goossens B., Chikhi L., Ancrenaz M., Lackman-Ancrenaz I., Andau P., Bruford M. W. 2006.** Genetic signature of anthropogenic population collapse in orang-utans. *PLoS Biology*. 4: e25.

- 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.
- Guo Y., Alderisio K. A., Yang W., Cama V., Feng Y., Xiao L. 2014.** Host specificity and source of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in a drinking source watershed. *Applied and Environmental Microbiology*. 80: 218–225.
- Hahn N. E., Capuano S. V. 2010.** Successful treatment of cryptosporidiosis in 2 common marmosets (*Callithrix jacchus*) by using paromomycin. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 49: 873–875.
- Hannah J., Riordan T. 1988.** Case to case spread of cryptosporidiosis: evidence from a day nursery outbreak. *Public Health*. 102: 539–544.
- Hardus M. E., Lameira A. R., Zulfa A., Atmoko S. S., de Vries H., Wich S. A. 2012.** Behavioral, Ecological, and Evolutionary Aspects of Meat-Eating by Sumatran Orangutans (*Pongo abelii*). *International Journal of Parasitology*. 33: 287–304.
- Haro M., del Aguila C., Fenoy S., Henriques-Gil N. 2003.** Intraspecies genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. *Journal of Clinical Mikrobiology*. 41: 4166–4171.
- 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.
- Hewawasam R. P., Jayatilaka K. A., Pathirana C., Mudduwa L. K. 2004.** Hepatoprotective effect of *Epaltes divaricata* extract on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *The Indian Journal of Medical Research*. 120: 30–34.
- 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.
- Hocevar S. N., Paddock C. D., Spak C. W., Rosenblatt R., Diaz-Luna H., Castillo I., Luna S., Friedman G. C., Antony S., Stoddard R. A., Tiller R. V. et al. 2014.** Microsporidiosis acquired through solid organ transplantation: a public health investigation. *Annals of Internal Medicine*. 160: 213–220.
- Hogan J. N., Miller W. A., Cranfield M. R., Ramer J., Hassell J., Noheri J. B., Conrad P. A., Gilardi K. V. 2014.** *Giardia* in mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*), forest buffalo (*Syncerus caffer*), and domestic cattle in Volcanoes National Park, Rwanda. *Journal of Wildlife Diseases*. 50: 21–30.

- Hope K., Goldsmith M. L., Graczyk T. 2004.** Parasitic health of olive baboons in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Veterinary Parasitology*. 122: 165–170.
- Huffman M. 1997. A.** Self-medication in Primates. *Yearbook of Physical Anthropology*. 40: 171–200.
- Huffman M. A. 2003.** Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 62: 371–381.
- Huffman M. A., Caton J. M. 2001.** Self-induced increase of gut motility and the control of parasitic infections in wild chimpanzees. *International Journal of Primatology*. 22: 329–346.
- Huffman M. A., Hirata S. 2004.** An experimental study of leaf swallowing in captive chimpanzees: insights into the origin of a self-medicative behavior and the role of social learning. *Primates*. 45: 113–118.
- Huffman M. A., Seifu M. 1989.** Observations on the illness and consumption of a possibly medicinal plant *Vernonia amygdalina* (Del.), by a wild chimpanzee in the Mahale Mountains National Park, Tanzania. *Primates*. 30: 51–63.
- Hunter P. R., Nichols G. 2002.** Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Review*. 15: 145–154.
- Hunter P. R., Thompson R. C. A. 2004.** The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*. 35: 1181–1190.
- Husson S. J., Wich S. A., Marshall A. J., Dennis R. D., Ancrenaz M. 2009.** Orangutan distribution, density, abundance and impact of disturbance. In: *Orangutans, Geographic variation in Behavioral Ecology and Conservation*. Wich S. A., Atmoko U. S. S., Setia T. M., van Schaik C. P. (Eds.). Oxford University Press.
- Chako C. Z., Tyler J. W., Schultz L. G., Chiguma L., Beerntsen B. T. 2010.** Cryptosporidiosis in people: it's not just about the cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 24: 37–43.
- Chappell C. L., Okhuysen P. C., Langer-Curry R., Widmer G., Akiyoshi D. E., Tanriverdi S., Tzipori S. 2006.** *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 75: 851–857.
- Checkley W., White A. C., Jaganath D., Arrowood M. J., Chalmers R. M., Chen X. M., Fayer R., Griffiths J. K., Guerrant R. L., Hedstrom L. et al. 2015.** A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet Infectious Diseases*. 15: 85–94.

- 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.
- Choy S. H., Al-Mekhlafi H. M., Mahdy M. A., Nasr N. N., Sulaiman M., Lim Y. A., Surin J. 2014.** Prevalence and associated risk factors of *Giardia* infection among indigenous communities in rural Malaysia. *Scientific Reports*. 4: 6909.
- Itagaki T., Kinoshita S., Aoki M., Itoh N., Saeki H., Sato N., Uetsuki J., Izumiyama S., Yagita K., Endo T. 2005.** Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Veterinary Parasitology*. 133: 283–287.
- Jablonski, N. G. 1998.** The response of catarrhine primates to Pleistocene environmental fluctuations in East Asia. *Primates* 39: 29–37.
- Janzen, D. H. 1978.** Complications in interpreting the chemical defenses of trees against tropical arboreal plant-eating vertebrates. In: *The Ecology of Arboreal Folivores* Montgomerie, G.C. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- 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 & Technology*. 43: 4267–72.
- Johnston A. R., Gillespie T. R., Rwego I. B., McLachlan T. L., Kent A. D., Goldberg T. L. 2010.** Molecular epidemiology of cross-species *Giardia* duodenalis transmission in western Uganda. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 4:e683.
- 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.
- Karanis P., Maier W. A., Seitz H. M., Schoenen D. 1992.** UV Sensitivity of Protozoan Parasites. *Journal of Water Supply: Research and Technology*. 41: 95.
- Karim M. R., Zhang S., Jian F., Li J., Zhou C., Zhang L., Sun M., Yang G., Zou F., Dong H., Li J., Rume F. I., Qi M., Wang R., Ning C., Xiao L. 2014.** Multilocus typing

of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* from non-human primates in China. *International Journal of Parasitology* 44: 1039–1047.

**Katzwinkel-Wladarsch S., Lieb M., Helse W., Löscher T., Rinder H. 1996.** Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine & International Health*. 1: 373–378.

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

**Keeling P. J. 2014.** Phylogenetic Place of Microsporidia in the Tree of Eukaryotes in Microsporidia. In: *Pathogens of Opportunity*. First Edition. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds.) John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK.

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

**Keeling P. J., Luker M. J., Palmer J. D. 2000.** Evidence from beta-tubulin that microsporidia evolved from fungi. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 1–9.

**Keshavarz A., Haghghi A., Athari A., Kazemi B., Abadi A., Nazemalhosseini Mojarad E. 2009.** Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. *Veterinary Parasitology*. 160: 316–318.

**Khalifa A. M., El Tamsahy M. M., Abou El Naga I. F. 2001.** Effect of ozone on the viability of some protozoa in drinking water. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 31: 603–616.

**Kilbourn A. M., Karesh W. B., Wolfe N. D., Bosi E. J., Cook R. A., Andau M. 2003.** Health evaluation of free-ranging and semi-captive orangutans (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Sabah, Malaysia. *Journal of Wildlife Diseases*. 39: 73–83.

**Knott, C. D. 1999.** Orangutan Behavior and Ecology. In: *The Nonhuman Primates*. Dolhinow P., Fuentes A. (Eds.) Mayfield Press: Mountain View, CA. 50–57.

**Kodádková A., Kváč M., Ditrich O., Sak B., Xiao L. 2010.** *Cryptosporidium muris* in a reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). *The Journal of Parasitology*. 96: 211–212.

**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.

- Kotková M., Sak B., Květoňová D., Kváč M. 2013.** Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. PLoS One. 8:e60941.
- Kotler D. P., Oreste 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.
- Koudela B., Kučerová S., Hudkovic T. 1999.** Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. Folia Parasitologica. 46: 171–174.
- Kramer J. P. 1970.** Longevity of microsporidian spores with special reference to *Octosporea muscaedomesticae* flu. Acta Protozoologica. 8: 127–135.
- Krishnamani R., Mahaney W. C. 2000.** Geophagy among primates: adaptive significance and ecological consequences. Animal Behaviour. 59: 899–915.
- 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. Zentralblatt für Veterinärmedizin. 44: 501–512.
- Kulda J., Nohýnková E. 1996.** *Giardia* in humans and animals. In: Kreier P. P. et al. Parasitic protozoa. Academic Press, San Diego. 10: 225–422.
- Kuze N., Kanamori T., Malim T. P., Bernard H., Zamma K., Kooriyama T., Morimoto A., Hasegawa H. 2010.** Parasites found from the feces of Bornean orangutans in Danum Valley, Sabah, Malaysia, with a redescription of *Pongobius hugoti* and the description of a new species of *Pongobius* (Nematoda: Oxyuridae). The Journal of Parasitology. 96: 954–960.
- Kváč M., Tomanová V., Samková E., Koubová J., Kotková M., Hlásková L., McEvoy J., Sak B., 2015.** *Encephalitozoon cuniculi* in raw cow's milk remains infectious after pasteurization. Foodborne Pathogens and Disease, *in press*.
- Labes E. M., Hegglin D., Grimm F., Nurcahyo W., Harrison M. F., Bastian M. L., Deplazes P. 2010.** Intestinal parasites of endangered orangutans (*Pongo pygmaeus*) in Central and East Kalimantan, Borneo, Indonesia. Parasitology. 137: 123–35.
- Ladapo T. A., Nourse P., Pillay K., Frean J., Birkhead M., Poonsamy B., Gajjar P. 2014.** Microsporidiosis in pediatric renal transplant patients in Cape Town, South Africa: two case reports. Pediatric Transplantation. 18: 220–226.



- Lambl V. 1859.** Mikroskopische Untersuchungen der Darm-Excrete. Beitrag zur Pathologie des Darms zur Diagnostik am Krankenbette. Vierteljahrschrift für die praktische Heilkunde. Herausgegeben von der medicinischen Facultät in Prag 61: 1–58.
- Lallo M. A., da Costa L. F., de Castro J. M. 2013.** Effect of three drugs against *Encephalitozoon cuniculi* infection in immunosuppressed mice. Antimicrobial agents and chemotherapy. 57: 3067–3071.
- Lebbad M., Mattsson J. G., Christensson B., Ljungström B., Backhans A., Andersson J. O., Svärd S. G. 2010.** From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. Veterinary Parasitology. 25: 231–239.
- Le Blancq S. M., Khrantsov N. V., Zamani F., Upton S. J., Wu T. W. 1997.** Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. Molecular and Biochemical Parasitology. 90: 463–478.
- Lee J. H. 2008.** Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. Applied and Environmental Microbiology. 74: 1664–1666.
- 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.
- Levecke B., Dorny P., Geurden T., Vercammen F., Vercruyse J. 2007.** Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. Veterinary Parasitology. Veterinary Parasitology. 30: 236–246.
- Levecke B., Geldhof P., Claerebout E., Dorny P., Vercammen F., Cacciò S. M., Vercruyse J., Geurden T. 2009.** Molecular characterisation of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates reveals mixed assemblage A and B infections and novel polymorphisms. International Journal of Parasitology. 39: 1595–1601.
- Levine N. D. 1984.** Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). Journal of Protozoology. 31: 94–98.
- Li W., 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.
- Lim Y. A., Ngui R., Shukri J., Rohela M., Mat Naim H. R. 2008.** Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. Veterinary Parasitology. 157: 154–159.
- Locke D. P., Hillier L. W., Warren W. C., Worley K. C., Nazareth L. V., Muzny D. M., Yang S. P., Wang Z., Chinwalla A. T., Minx P. et al. 2011.** Comparative and demographic analysis of orang-utan genomes. Nature. 469: 529–533.

- 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.
- Majewska A. C., Kasprzak W. 1990.** Axenic isolation of *Giardia* strains from primates and rodents. *Veterinary Parasitology*. 35: 169–174.
- Mansfield K. G., Carville A., Herbert D., Chalifoux L., 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.
- Mahdi N. K., Ali N. H. 2002.** Cryptosporidiosis among animal handlers and their livestock in Basrah, Iraq. *East African Medical Journal*. 79: 550–553.
- Mahdy M. A. K., Lim Y. A., Surin J., Wan K. L., Al-Mekhlafi M. S. 2008.** Risk factors for endemic giardiasis: highlighting the possible association of contaminated water and food. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102: 465–470.
- Mathis A., Weber R., Deplazes P. 2005.** Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*. 18: 423–445.
- Matos O., Lobo M. L., Xiao L. 2012.** Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* Infection in Humans. *Journal of Parasitology Research*. 2012: e981424.
- Matsubayashi H., Koide T., Mikata T., Hagiwara S. 1959.** A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Archives of Pathology*. 67: 181.
- Marshall A. J., Lacy R., Ancrenaz M., Byers O., Husson S. J., Leighton M., Meijaard E., Rosen N., Singleton I., Stephens S. et al. 2008.** Orangutan population biology, life history, and conservation. Perspectives from population viability analysis models. In: *Orangutans: geographic variation in behavioral ecology and conservation*. Wich, S. A., Utami Atmoko S. S., Mitra Setia T., van Schaik C. P. (Eds.) New York, US.
- Martínez-Díaz R. A., Sansano-Maestre J., Martínez-Herrero M. del C., Ponce-Gordo F., Gómez-Muñoz M. T. 2011.** Occurrence and genetic characterization of *Giardia duodenalis* from captive nonhuman primates by multi-locus sequence analysis. *Parasitology Research*. 109: 539–344.

- Mbaya A. W., Udendeye U. J. 2011.** Gastrointestinal parasites of captive and free-roaming primates at the Afi Mountain Primate Conservation Area in Calabar, Nigeria and their zoonotic implications. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 14: 709–714.
- McLennan M. R., Huffman M. A. 2012.** High frequency of leaf swallowing and its relationship to intestinal parasite expulsion in "village" chimpanzees at Bulindi, Uganda. *American Journal of Primatology*. 74: 642–650.
- Meamar A. R., Guyot K., Certad G., Dei-Cas E., Mohraz M., Mohebali M., Mohammad K., Mehdod A. A., Rezaie S., Rezaian M. 2007.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals in Iran. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 1033–1035.
- Meijaard E., Welsh A., Ancrenaz M., Wich S., Nijman V., Marshall A. J. 2010.** Declining orangutan encounter rates from Wallace to the present suggest the species was once more abundant. *PLoS One*. 5: e12042.
- Meijaard E., Wich S. 2007.** Putting orang-utan population trends into perspective. *Current Biology*. 17: 540.
- 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.
- Meireles M. V., Soares R. M., Bonello F., Gennari S. M. 2007.** Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 147: 166–170.
- 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.
- Mi R., Wang X., Huang Y., Zhou P., Liu Y., Chen Y., Chen J., Zhu W., Chen Z. 2014.** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in goats across four provincial level areas in China. *PLoS One*. 9: e111164.
- Mi R., Wang X., Li C., Huang Y., Zhou P., Li Z., Lei M., Cai J., Chen Z. 2013.** Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* in yaks in Qinghai Province of China. *PLoS One*. 9:e97348.
- Milan N. F., Kacsoh B. Z., Schlenke T. A. 2012.** Alcohol consumption as self-medication against blood-borne parasites in the fruit fly. *Current Biology*. 20: 488–493.

- Miller R. A., Bronsdon M. A., Kuller L., Morton W. R. 1990.** Clinical and parasitologic aspects of cryptosporidiosis in nonhuman primates. *Laboratory Animal Science*. 40: 42–46.
- Molina J. M., Tourneur M., Sarfati C., Chevret S., de Gouvello A., Gobert J. G., Balkan S., Derouin F., Agence Nationale de Recherches sur le SIDA 090 Study Group. 2002.** Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *The New English Journal of Medicine*. 346: 1963–1969.
- Monis P. T., Caccio S. M., Thompson R. C. 2009.** Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*. 25: 93–100.
- Moore J. G. 1970.** Epizootic of acanthocephaliasis among primates. *JAVMA*. 157: 699–705.
- Morgan U.M., Xiao L., Fayer R., Lal A. A., Thompson R. C. 2000.** Epidemiology and strain variation of *Cryptosporidium parvum*. *Contributions to Microbiology*. 6: 116–139.
- 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.
- Morrogh-Bernard H. C. 2008.** Fur-Rubbing as a Form of Self-Medication in *Pongo pygmaeus*. *International Journal of Primatology*. 29: 1059–1064.
- Mul I. F., Paembonan W., Singleton I., Wich S. A., Van Bulhuis H. G. 2007.** Intestinal parasites of free-ranging, semicaptive and captive *Pongo abelii* in Sumatra, Indonesia. *International Journal of Parasitology*. 28: 407–420.
- Müller J. 1841.** Über eine eigentümliche krankhafte parasitische Bildung mit spezifisch organisierten Samenkörperchen. *Bericht der Preußischen Akademie der Wissenschaft*: 246–250.
- 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.
- Muriuki S. M., Farah I. O., Kagwiria R. M., Chai D. C., Njamunge G., Suleman M., Olobo J. O. 1997.** The presence of *Cryptosporidium* oocysts in stools of clinically diarrhoeic and normal nonhuman primates in Kenya. *Veterinary Parasitology*. 72: 141–147.
- 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.

**Nater A., Arora N., Greminger M. P., van Schaik C. P., Singleton I., Wich S. A., Fredriksson G., Perwitasari-Farajallah D., Pamungkas J., Krützen M. 2012.** Marked population structure and recent migration in the critically endangered Sumatran orangutan (*Pongo abelii*). *The Journal of Heredity*. 104: 2–13.

**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.

**Nizeyi J. B., Cranfield M. R., Graczyk T. K. 2002.** Cattle near the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda, as a reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* for local community and free-ranging gorillas. *Parasitology Research*. 88: 380–385.

**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.

**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.

**Pasteur L. 1870.** Etude sur la maladie des vers a soie. Gauthier-Villars, Paris.

**Parsons M. B., Gillespie T. R., Lonsdorf E. V., Travis D., Lipende I., Gilagiza B., Kamenya S., Pintea L., Vazquez-Prokopec G. M. 2014.** Global positioning system data-loggers: a tool to quantify fine-scale movement of domestic animals to evaluate potential for zoonotic transmission to an endangered wildlife population. *PloS One*. 9: e110984.

- Parsons M. B., Travis D., Lonsdorf E. V., Lipende I., Roellig D. M., Collins A., Kamenya S., Zhang H., Xiao L., Gillespie T. R. 2015.** Epidemiology and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in humans, wild primates, and domesticated animals in the Greater Gombe Ecosystem, Tanzania. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 20: e0003650.
- Pedraza-Díaz S., Amar C., McLauchlin J. 2000.** The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiology Letters*. 189: 189–194.
- Pedraza-Díaz S., Ortega-Mora L. M., Carrión B. A., Navarro V., Gómez-Bautista M. 2009.** Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. *Veterinary Parasitology*. 160: 204–210.
- Peisert W., Taborski A., Pawlowski Z., Karlewiczowa R., Zdun M. 1983.** *Giardia* infection in animals in Poznań Zoo. *Veterinary Parasitology*. 13: 183–186.
- Plutzer J., Ongerth J., Karanis P. 2010.** *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 213: 321–233.
- Preiser G., Preiser L., Madeo L. 2003.** An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. *Veterinary Record*. 51: 213–215.
- Qi M., Huang L., Wang R., Xiao L., Xu L., Li J., Zhang L. 2014.** Natural infection of *Cryptosporidium muris* in ostriches (*Struthio camelus*). *Veterinary Parasitology*. 205: 3–4.
- Rasambainarivo F. T., Gillespie T. R., Wright P. C., Arsenault J., Villeneuve A., Lair S. 2013.** Survey of *Giardia* and *Cryptosporidium* in lemurs from the Ranomafana National Park, Madagascar. *Journal of Wildlife Diseases*. 49: 741–743.
- Raoult D. 2012.** The apes as reservoir of human pathogens. *Clinical Microbiology and Infect*  
*Infection* 18: 513–513.
- 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.
- 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 oidipus*) a case report. *Parasitology International*. 53: 29–34.

- Rendtorff R. C. 1954.** The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *American Journal of Medicine*. 59: 209–220.
- Ribeiro C. D., Palmer S. R. 1985.** Family outbreak of cryptosporidiosis. *British Medical Journal*. 292: 377.
- Rijksen H. D. 1978.** A field study on Sumatran orang utans (*Pongo pygmaeus abelii* Lesson 1827): ecology, behaviour and conservation. Wageningen (The Netherlands): H. Veenman Zonen B. V. 420 pp.
- 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., Chalmers R. M. 2010.** The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. *Zoonoses and Animal Public Health*. 57: 1–13.
- Rodriguez E., Aregullin M., Nishida T., Uehara S., Wrangham R., Abramowski Z., Finlayson A., Towers G. H. N. 1985.** Thiarubrine A, a bioactive constituent of *Aspilia* (*Asteraceae*) consumed by wild chimpanzees. *Experientia*. 41: 419–420.
- Rossignol J. F., Ayoub A., Ayers M. S. 2001.** Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. *The International Journal of Infectious Diseases*. 184: 103–106.
- Rossignol J. F., Kabil S. M., el-Gohary Y., Younis A. M. 2006.** Effect of nitazoxanide in diarrhoea and enteritis caused by *Cryptosporidium* species. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 4: 320–324.
- Russell R. G., Rosenkranz S. L., Lee L. A., Howard H., DiGiacomo R. F., Bronsdon M. A., Blakley G. A., Tsai C. C., Morton W. R. 1987.** Epidemiology and etiology of diarrhea in colony-born *Macaca nemestrina*. *Laboratory Animal Science*. 37: 309–316.
- Russon A. E., Wich S. A., Ancrenaz M., Kanamori T., Knott C. D., Kuze N., Morrogh-Bernard H. C., Pratje P., Ramlee H., Rodman P. et al. 2009.** Geographic variation in orangutan diets. In: *Orangutans: geographic variation in behavioral ecology and conservation*. Wich S. A., Utami Atmoko S. S., Mitra Setia T., van Schaik C. P. (Eds.). New York, US. 311–326.

- Ryan U., Cacciò S. M. 2013.** Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal of Parasitology*. 43: 943–956.
- Sá R. M., Petrášová J., Pomajbíková K., Profousová I., Petrželková K. J., Sousa C., Cable J., Bruford M. W., Modrý D. 2013.** Gastrointestinal symbionts of chimpanzees in Cantanhez National Park, Guinea-Bissau with respect to habitat fragmentation. *American Journal of Primatology*. 75: 1032–1041.
- 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., Kašičková D., Kváč M., Květoňová D., Ditrich O. 2010.** Microsporidia in exotic birds: intermittent spore excretion of *Encephalitozoon* spp. in naturally infected budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary Parasitology*. 168: 196–200.
- Sak B., Kváč M., Kučerová Z., Květoňová D., Saková K. 2011b.** 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. 2011a.** Diversity of microsporidia (Fungi: Microsporidia) among captive great apes in European zoos and African sanctuaries: evidence for zoonotic transmission? *Folia Parasitologica*. 58: 81–86.
- Sak B., Petrželková K. J., Květoňová D., Mynářová A., Pomajbíková K., Modrý D., Cranfield M. R., Mudakikwa A., Kváč M. 2014.** Diversity of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* in mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Volcanoes National Park, Rwanda. *PLoS One* 9: e109751.
- Sak B., Petrželková K. J., Květoňová D., Mynářová A., Shutt K. A., Pomajbíková K., Kalousová B., Modrý D., Benavides J., Todd A., Kváč M. 2013.** Long-term monitoring of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at different stages of habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *PLoS One* 8: e71840.
- Sandosham A. A. 1951.** On two helminths from the orang-utan, *Leipertrema rewelli* n. g., n. sp. and *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *Journal of Helminthology*. 25: 19–26.
- Santín M., Fayer R. 2011.** Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Research in Veterinary Science*. 90: 363–371.
- Santín M., Trout J. M., Fayer R. 2005.** *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in dairy cattle in the eastern United States. *Parasitology Research*. 97: 535–538.



- Sarkar A., Sen R., Saha P., Ganguly S., Mandal G., Chatterjee M. 2008.** An ethanolic extract of leaves of *Piper betle* (Paan) Linn mediates its antileishmanial activity via apoptosis. *Parasitology Research*. 102: 1249–1255.
- Satoh M., Hikosaka K., Sasaki T., Suyama Y., Yanai T., Ohta M., Nakai Y. 2003.** Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 691–692.
- Seibold H. R., Fussell E. N. 1973.** Intestinal microsporidiosis in *Callicebus moloch*. *Laboratory Animal Science*. 23: 115–118.
- Sawangjaroen N., Phongpaichit S., Subhadhirasakul S., Visutthi M., Srisuwan N., Thammpalerd N. 2006.** The anti-amoebic activity of some medicinal plants used by AIDS patients in southern Thailand. *Parasitology Research*. 98: 588–592.
- Shadduck J. A. 1969.** *Nosema cuniculi*: *in vitro* isolation. *Science*. 166: 516–517.
- Shadduck J. A., Greeley E. 1989.** Microsporidia and human infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2: 158–165.
- 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 the *in vitro* infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi*. *The Journal of Protozoology*. 25: 491–496.
- Shadduck J. A., Watson W. T., Pakes S. P., Cali A. 1979.** Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. *The Journal of Parasitology*. 65: 123–129.
- Sharma S., Balne P. K., Das S. 2014.** Ocular microsporidiosis. In: *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. First Edition. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds). John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK.
- Shutt K., Setchell J. M., Heistermann M. 2012.** Non-invasive monitoring of physiological stress in the Western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*): validation of a fecal glucocorticoid assay and methods for practical application in the field. *General and Comparative Endocrinology*. 179: 167–177.
- 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.
- Singer M. S., Mace K. C., Bernays E. A. 2009.** Self-medication as adaptive plasticity: increased ingestion of plant toxins by parasitized caterpillars. *PloS One*. 4:e4796.

- Singh I., Carville A., Tzipori S. 2011.** Cryptosporidiosis in rhesus macaques challenged during acute and chronic phases of SIV infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 27: 989–997.
- Singh M., Shakya S., Soni V. K., Dangi A., Kumar N., Bhattacharya S. M. 2009.** The n-hexane and chloroform fractions of *Piper betle* L. trigger different arms of immune responses in BALB/c mice and exhibit antifilarial activity against human lymphatic filarid *Brugia malayi*. *International Immunopharmacology*. 9: 716–728.
- Slavin D. 1955.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*. 65: 262–270.
- Sleeman J. M., Meader L. L., Mudakikwa A. B., Foster J. W., Patton S. 2000.** Gastrointestinal parasites of mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) in the Parc National des Volcans, Rwanda. *Journal of Zoo and Wild Medicine*. 31: 322–328.
- Slodkowicz-Kowalska A., Graczyk T. K., Tamang L., Girouard A. S., Majewska A. C. 2006b.** Asymptomatic *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in captive mammals. *Parasitology Research*. 100: 505–509.
- Slodkowicz-Kowalska A., Graczyk T. K., Tamang L., Jedrzejewski S., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A. S., Majewska A. C. 2006a.** 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.
- Snowden K. F., Didier E. S., Oreste J. M. Shaddock J. A. 1998.** Animal models of human microsporidial infections. *Laboratory Animal Science*. 48: 589–592.
- Sprague V., Becnel J. J., Hazard E. I. 1992.** Taxonomy of phylum Microspora. *Critical Reviews in Microbiology*. 18:285–395.
- Sprong H., Cacciò S. M., van der Giessen J. W. 2009.** Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PloS Neglected Tropical Diseases*. 12: e558.
- Squires J. M., Ferreira J. F., Lindsay D. S., Zajac A. M. 2011.** Effects of artemisinin and Artemisia extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Veterinary Parasitology*. 175: 103–108.
- Sreedharan A., Jayshree R. S., Sridhar H. 1996.** Cryptosporidiosis among cancer patients: an observation. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*. 14: 211–213.

- Stafford E. E., Moede A. L., Brown R. J., Purmoto, Galdikas-Brindamour B., Boerner M. 1979.** Enteric parasites of orangutans (*Pongo pygmeus*) in Indonesia. Naval Aerospace Medical Research Laboratory Naval Air Station Pensacola, Florida 32508.
- Suárez-Rodríguez M, López-Rull I, Garcia C. M. 2012.** Incorporation of cigarette butts into nests reduces nest ectoparasite load in urban birds: new ingredients for an old recipe? *Biology Letters*. 9: 20120931.
- Sulaiman I. M., Fayer R., Bern C., Gilman R. H., Trout J. M., Schantz P. M., Das P., Lal A. A., Xiao L. 2003.** Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 1444–1452.
- Sulaiman I. M., Fayer R., Yang C. F., Santín 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.
- Sugardjito J., Nurhuda N. 1981.** Meat-eating Behaviour in Wild Orang Utans, *Pongo pygmeus*. *Primates*. 22: 414–416.
- Šoba B., Petrovec M., Mioc V., Logar J. 2006.** Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *Clinical Microbiology and Infection*. 12: 918–921.
- 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 Microbiology*. 48: 2651–2653.
- Tappeh K. H., Gharavi M. J., Makhdoumi 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.
- Thellier M., Breton J. 2008.** *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15: 349–358.
- Thompson R. C. 2000.** Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology*. 30: 1259–1267.
- Tripathi D. M., Gupta N., Lakshmi V., Saxena K. C., Agrawal A. K. 1999.** Antigiardial and immunostimulatory effect of *Piper longum* on giardiasis due to *Giardia lamblia*. *Phytotherapy Research*. 13: 561–565.
- 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.

- Tyzzoer E. E. 1910.** An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical Research*. 23: 487–509.
- Tyzzoer 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-infested rhesus monkeys. *Journal of Infectious Diseases*. 175: 1016–1020.
- Upton S. J., Current W. L. 1985.** The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *The Journal of Parasitology*. 71: 625–629.
- van Dellen A. F., Steward C. G., Botha W. S. 1989.** Studies of encephalitozoonis 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 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.
- van Zijll Langhout M., 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.
- van Schaik C. P., Marshall A. J., Wich A. S. 2009.** Geographic variation in orangutan behavior and biology. In: *Orangutans: geographic variation in behavioral ecology and conservation*. Wich, S. A., Utami Atmoko S. S., Mitra Setia T., van Schaik C. P. (Eds.). New York, US, 311–326.
- Vávra J. 2005.** "Polar vesicles" of microsporidia are mitochondrial remnants ("mitosomes")? *Folia Parasitologica*. 52: 193–195.
- Vávra J., Larrison J. I. R. 1999.** Structure of microsporidia. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Wittner M. Weiss L. M. (Eds.) American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Vávra J., Lukeš J. 2013.** Microsporidia and 'the art of living together'. *Advances in Parasitology*. 82: 253–319.

- Velasco Ng J., Claveria F. G. 2009.** Intestinal parasites identified in caged Orangutans (*Pongo* spp.) at the Avilon Zoo, Montalban Zoological Park, Rizal, Philippines. 19: 12–15.
- Venturini L., Bacigalupe D., Basso W., Unzaga J. M., Venturini M. C., MorÉ, G. 2006.** *Cryptosporidium parvum* en animales domésticos y en monos de un zoológico. Parasitología latinoamericana. 61: 90–93.
- Voigt K., Kirk P. M. 2011.** Recent developments in the taxonomic affiliation and phylogenetic positioning of fungi: impact in applied microbiology and environmental biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology. 90: 41–57.
- Wang Y., Yang W., Cama V., Wang L., Cabrera L., Ortega Y., Bern C., Feng Y., Gilman R., Xiao L. 2014.** Population genetics of *Cryptosporidium meleagridis* in humans and birds: evidence for cross–species transmission. International Journal of Parasitology. 44: 515–21.
- Warren K. S., Verschuur E. J., Langenhuijzen S., Heriyanto, Swan R. A., Vigilant L., Heeney J. L. 2001.** Speciation and intrasubspecific variation of Bornean orangutans, *Pongo pygmaeus pygmaeus*. Molecular Biology and Evolution. 18: 472–480.
- Waters P. F. 2006.** Molecular and in vitro growth comparisons of *Encephalitozoon hellem* isolates from human and bird hosts. Master's thesis, Texas A&M University. 107 pp.
- Weber R., Bryan R. T., Schwartz D. A., Owen R. L. 1994.** Human microsporidial infections. Clinical Microbiology Reviews. 7: 426–461.
- Weidner E., Canning E. U., Rutledge C. R., Meek C. L. 1999.** Mosquito (Diptera: Culicidae) host compatibility and vector competency for the human myositic parasite *Trachipleistophora hominis*. Journal of Medical Entomology. 36: 522–525.
- Weiss L. M. 2000.** Microsporidia: emerging pathogenic protists. Acta Topica. 78: 89–102.
- Weiss L. M. 2014.** Clinical Syndromes Associated with Microsporidiosis. In: Microsporidia: Pathogens of Opportunity. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds.). John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK.
- 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.
- Wich S. A., Meijaard E., Marshall A. J., Husson S., Ancrenaz M., Lacy R. C., van Schaik C. P., Sugardjito J., Simorangkir T., Traylor–Holzer K., Doughty M., Supriatna J., Dennis R., Gumal M., Knott C. D., Singleton I. 2008.** Distribution and conservation

status of the orang-utan (*Pongo* spp.) on Borneo and Sumatra: how many remain? *Oryx*. 42: 329–339.

**Wilson D. W., Day P. A., Brummer M. E. 1984.** Diarrhea associated with *Cryptosporidium* spp. in juvenile macaques. *Veterinary Pathology*. 21: 447–50.

**Wisnu N., Prastowo J. 2013.** *Strongyloides* spp. distribution on orangutans in Tanjung Puting National Park, Care Center in Pangkalanbun, and Sebangau National Park. *Jurnal Veteriner*. 14: 255–261.

**Wolk D. M., Schneider S. K., Wengenack N. L., Sloan L. M., Rosenblatt J. E. 2002.** Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 3922–3928.

**Wrangham R., Nishida T. 1983.** *Aspilia* spp. leaves: a puzzle in the feeding behavior of wild chimpanzees. *Primates* 24: 276–28.

**Wright J. H., Craighead E. M. 1922.** Infectious motor paralysis in young rabbits. *Journal of Experimental Medicine*. 36: 135–141.

**Xiao L. 2010.** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*. 124: 80–89.

**Xiao L., Fayer R. 2008.** Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal of Parasitology*. 38: 1239–1255.

**Xiao L., Ryan U. M. 2004.** Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion In Infectious Diseases*. 17: 483–90.

**Xiao L., Hlavsa M. C., Yoder J., Ewers C., Dearen T., Yang W., Nett R., Harris S., Brend S. M., Harris M. et. Al. 2009.** Subtype analysis of *Cryptosporidium* specimens from sporadic cases in Colorado, Idaho, New Mexico, and Iowa in 2007: widespread occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and case history of an infection with the *Cryptosporidium* horse genotype. *The Journal of Clinical Microbiology*. 47: 3017–3020.

**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., 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.

**Yabsley M. J., Jordan C. N., Mitchell S. M., Norton T. M., Lindsay D. S. 2007.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis neurona*, and *Encephalitozoon cuniculi* in three species of lemurs from St. Catherines Island, GA, USA. 144: 28–32.

- 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.
- Yason J. A., Rivera W. L. 2007.** Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. 101: 681–687.
- Ye J., Xiao L., Ma J., Guo M., Liu L., Feng Y. 2012.** Anthroponotic enteric parasites in monkeys in public park, China. *Emerging Infectious Diseases*. 18: 1640–1643.
- Zeman D. H., Baskin G. 1985.** Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Veterinary Pathology*. 22: 24–31.