

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Diverzita kryptosporidií volně žijících psovitých a medvědovitých šelem**

*Diversity of Cryptosporidium in wild canines and bears.*

Vypracovala: Bc. Klára Kellnerová

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

České Budějovice, 2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára KELLNEROVÁ**

Osobní číslo: **Z15397**

Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**

Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**

Název tématu: **Diverzita kryptosporidií volně žijících psovitých a medvědovitých šelem**

Zadávací katedra: **Katedra zootechnických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření jednobuněční paraziti infikující všechny třídy obratlovců. Studie provedené v posledních 10 letech ukazují na obrovskou rozmanitost a současně hostitelskou specifitu zástupců rodu *Cryptosporidium*. Na rozdíl od kryptosporidií parazitujících u hospodářských a zájmových zvířat a člověka, jsou naše znalosti o diverzitě, fylogenezi a biologii těchto parazitů u volně žijících obratlovců velmi omezené.

Cílem práce je popsat výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikujících volně žijící psovitě a medvědovitě šelmy.

Pomocí standardních parazitologických metod a specifických barvení diagnostikujte oocysty kryptosporidií v trusu vyšetřovaných jedinců a stanovte intenzitu infekce. V případě silných infekcí popište morfologii a morfometrii oocyst. Pomocí molekulárních metod určete druh a genotyp kryptosporidií. Využijte fylogenetické postupy k určení fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy a genotypy detekovaných kryptosporidií. Datové soubory zpracujte příslušnými statistickými metodami. Vyhodnoťte získaná data o prevalenci a výskytu. Zhodnoťte hostitelskou specifitu nalezených druhů a genotypů.

Rozsah grafických prací: **3 tabulky, 3 grafy**  
Rozsah pracovní zprávy: **40 - 50 stran**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**  
Seznam odborné literatury:

- Bryan, H.M., Darimont, C.T., Hill, J.E., Paquet, P.C., Thompson, R.C., Wagner, B. et al 2012. Seasonal and biogeographical patterns of gastrointestinal parasites in large carnivores: wolves in a coastal archipelago. *Parasitology* 139, 781-790.
- Kloch, A., Bednarska, M., Bajer, A. 2005. Intestinal macro-and microparasites of wolves (*Canis lupus* L.) from North-Eastern Poland recovered by coprological study. *Ann. Agric. Environ. Med.* 12:237-245.
- Kváč, M., McEvoy, J., Stenger, B., Clark, M. 2014. Cryptosporidiosis in other vertebrates. In: S.M. Caccio and G. Widmer (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, Wien, pp. 237-326.
- Ravaszová, P., Halánová, M., Goldová, M., Valenčáková, A., Malčková, B., Hurníková, Z. et al. 2012. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in red foxes and brown bear in the Slovak Republic. *Parasitol. Res.* 110, 469-471.
- Ziegler, P.E., Wade, S.E., Schaaf, S.L., Chang, Y.F., Mohammed, H.O., 2007. *Cryptosporidium* spp. From small mammals in the New York City watershed. *J. Wildl. Dis.* 43, 586-596.


Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.**  
Katedra zootechnických věd

Datum zadání diplomové práce: **29. března 2016**  
Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2017**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA   
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 1668, 370 05 České Budějovice

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

L.S.

  
doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 29. března 2016

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

V Českých Budějovicích 16. 4. 2018

.....

Bc. Klára Kellnerová

Mé poděkování patří především panu prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za jeho neustálou pomoc a ochotu v průběhu zpracování diplomové práce, za jeho věcné připomínky, trpělivost a cenné rady, které mi v průběhu zpracování věnoval. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i. za jejich ochotnou pomoc v laboratoři a milé jednání. Mé poděkování patří též všem, kteří mi poskytli vzorky, zejména doc. MVDr. Dušanu Rajskému, CSc. a MVDr. Janě Juránkové, Ph.D.

Tato práce byla finančně podpořena z projektu GAČR 15-01090S a grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích GAJU 002/2016/Z (řešitel prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

## ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na výskyt a prevalenci kryptosporidií u volně žijících psovitých a medvědovitých šelem na území České republiky, Slovenské republiky, Polska a Rumunska. Celkem bylo shromážděno 359 vzorků trusu od 179 lišek obecných (*Vulpes vulpes*), 83 vlků obecných (*Canis lupus*), 63 medvědů hnědých (*Ursus arctos*) a 34 šakalů obecných (*Canis aureus*). Vzorky byly mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií pomocí specifického barvení anilin-carbol-methyl violetí a pomocí molekulárních metod amplifikujících malou ribozomální podjednotku rRNA, aktin a 60kDa glykoprotein. Molekulárními metodami byla prokázána přítomnost specifické DNA *C. tyzzeri*, *C. andersoni* u lišek obecných, *C. canis* a *C. ubiquitum* u vlků obecných a *C. galli* u medvěda hnědého a lišky obecné. Subtypizace izolátů *C. tyzzeri* a *C. ubiquitum* na gp60 genu prokázala, že izolát *C. tyzzeri* patří do subtypu IXaA8 a izolát *C. ubiquitum* do XIIId. Detekce kryptosporidií hostitelsky nespecifických pro psovitě a medvědovitě šelmy, vyjma *C. canis* a *C. ubiquitum*, ukazuje spíše na potravní preference vyšetřovaných zvířat než na aktivní probíhající infekci.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** *Cryptosporidium*; liška; vlci; medvědi; šakali; masožravci; PCR

## SUMMARY

The study was focused on study of diversity of *Cryptosporidium* spp. in wild canines and bears in the Czech Republic, Slovak Republic, Poland and Romania. A total of 359 faecal samples were collected from 179 red foxes (*Vulpes vulpes*), 83 grey wolves (*Canis lupis*), 63 brown bears (*Ursus arctos*) and 34 jackals (*Canis aureus*). Faecal samples were screened for *Cryptosporidium* by microscopy and PCR/sequencing. Phylogenetic analysis of small-subunit rRNA, actin and 60-kDa glycoprotein sequences revealed the presence of *C. tyzzeri*, *C. andersoni* in red foxes, *C. canis* and *C. ubiquitum* in gray wolves and *C. galli* in a brown bear and a red fox. Subtyping of *C. ubiquitum* and *C. tyzzeri* isolate by sequence analysis of the 60-kDa glycoprotein gene showed that isolates belonged to the XIId and IXa subtype family, respectively. Detection of host-non-specific cryptosporidia, except *C. canic* and *C. ubiquitum*, in wild canine and bears shows rather a food preference of screened carnivores than on an active infection.

**KEY WORDS:** *Cryptosporidium*; foxes; wolves; bears; jackals; carnivores; PCR

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	8
<b>2. Literární přehled</b> .....	9
2.1. Historie kryptosporidií .....	9
2.2. Taxonomie.....	10
2.3. Hostitelská specifita .....	11
2.4. Vývojový cyklus.....	13
2.5. Kryptosporidióza .....	14
2.6. Terapie kryptosporidiových infekcí .....	15
2.7. Prevence kryptosporidiových infekcí .....	16
2.8. Kryptosporidiové infekce medvědovitých šelem .....	17
2.9. Kryptosporidiové infekce psových šelem .....	18
2.9.1. Vlci.....	18
2.9.2. Psi.....	18
2.9.3. Kojoti .....	21
2.9.4. Šakalové.....	21
2.9.5. Lišky .....	21
2.9.6. Kryptosporidióza a patogenita u medvědovitých a psových šelem.....	22
<b>3. Cíle</b> .....	23
<b>4. Materiál a metodika</b> .....	24
4.1. Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření .....	24
4.2. Vyšetření vzorků trusu na přítomnost kryptosporidií.....	24
4.3. Barvení oocyst anilin-carbol-methyl violetí (Miláček et Vítovec 1985).....	25
4.4. Izolace DNA z trusu .....	26
4.5. Genotypizace kryptosporidií .....	27
4.5.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	27
4.6. Gelová elektroforéza .....	29
4.7. Purifikace PCR produktu z gelu .....	30
4.8. Sekvenování .....	31
4.9. Fylogenetické analýzy .....	31
<b>5. Výsledky</b> .....	32
5.1. Výskyt a prevalence .....	32



<b>6. Diskuze</b> .....	35
<b>7. Závěr</b> .....	38
<b>8. Literatura</b> .....	39

## 1. Úvod

Paraziti rodu *Cryptosporidium* jsou obligátní, intracelulární prvoci patřící do kmene Apicomplexa. Infikují epitelální buňky gastrointestinálního, respiračního a urogenitálního traktu obratlovců, včetně lidí (Xiao et al. 2004a, Ziegler et al. 2007, Ježková et al. 2016).

Zástupci tohoto rodu způsobují onemocnění zvané kryptosporidíóza, které může být příčinou průjmových onemocnění u lidí, hospodářských zvířat a dalších obratlovců. Původce onemocnění se přenáší na hostitele přímým kontaktem s infikovaným jedincem nebo požitím kontaminovaných potravin a vody znečištěných oocystami (Xiao 2010, Shahiduzzaman et Dauschies 2012).

Přestože jsou kryptosporidie intenzivně studovány více než 30 let, výzkum je primárně zaměřen na studium těchto parazitů u člověka a hospodářských zvířat (Ježková et al. 2016). Molekulárně-epidemiologické studie provedené u volně žijících zvířat prokázaly velmi vysokou diverzitu kryptosporidií. I přes vzrůstající počet studií zabývajících se kryptosporidiovými infekcemi volně žijících zvířat, jsou naše znalosti u celé řady hostitelských skupin značně omezené (Kváč et al. 2014b).

Masožravci jsou konečnými hostiteli nebo rezervoárem pro více než 60 různých zoonotických parazitů, včetně kryptosporidií (Sarvi et al. 2018). Infekce vyvolané kryptosporidii byly potvrzeny u řady šelem včetně psů, lišek, vlků nebo medvědů (Ryan et al. 2014).

Během posledních několika desetiletí došlo ke změnám klimatu, krajiny a ekosystémů. Spolu s nárůstem nelegálního obchodu s volně žijícími zvířaty a změnou lidského chování vůči volně žijícím živočichům, došlo ke ztenčení hranic mezi divokými šelmami a jejich domácími protějšky. Toto může mít za následek šíření patogenů do nových prostředí a rozšíření infekcí z volně žijících zvířat na domácí živočichy a lidskou populaci (Otrantoa et al. 2015, Sarvi et al. 2018).

Tato práce si klade za cíl přidat další znalosti o výskytu a prevalenci kryptosporidií u volně žijících psovitých a medvědovitých šelem, které mohou představovat rezervoár původců kryptosporidiových infekcí.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Historie kryptosporidií

První popis parazitů patřících do rodu *Cryptosporidium* je datován roku 1907, kdy americký parazitolog Ernest Edward Tyzzer detekoval prvoky v žaludečních žlázách pitvaných laboratorních myší a pojmenoval tohoto parazita *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). O tři roky později popsal *C. muris* podrobněji a rozšířil rozsah hostitelů (Tyzzer 1910). Následně v roce 1912 byl stejným autorem identifikován druhý druh rodu *Cryptosporidium* parazitující v tenkém střevě laboratorních myší a byl pojmenován *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). Je třeba zmínit, že paraziti rodu *Cryptosporidium* byly zřejmě poprvé popsány již na konci 19. století jako *Coccidium falciforme* (Fayer 2008).

V roce 1955 byl popsán další, v pořadí třetí druh, *Cryptosporidium meleagridis* u krůt (Slavin 1955). A v roce 1971 byly kryptosporidie poprvé hlášeny ve spojení s průjmem u krav (Panciera et al. 1971). První dva případy lidské kryptosporidiózy byly popsány v roce 1976. Od té doby bylo dokumentováno tisíce lidských kryptosporidiiových infekcí ve více než 95 zemích (Morgan-Ryan et al. 2002, Fayer et al. 2008). Postupně se v odborné literatuře objevovaly zprávy popisující výskyt kryptosporidií a kryptosporidiózy u široké škály savců, ptáků a plazů (Kváč et al. 2014b). Až do doby nástupu genotypizace jednotlivých izolátů pomocí molekulárních technik byla identifikace druhů založena především na velikosti a tvaru oocyst, což vyústilo v řadu domněnek o široké hostitelské specifitě a nízké druhové variabilitě v rámci rodu *Cryptosporidium* (Xiao 2010). Rozvojem genotypizace se v devadesátých letech 20. století přispělo k objasnění diverzity kryptosporidií a jejich hostitelské specifity (Fayer 2004).

Dlouhou dobu nebyli tito paraziti vnímáni jako hrozba pro veřejné zdraví. To se změnilo v důsledku prokázání kryptosporidiózy jako život ohrožující infekce u HIV pacientů (Fayer et al. 1986). Zájem o studium těchto patogenů výrazně vzrostl po propuknutí masivní epidemie v Milwaukee ve Wisconsinu v roce 1993, kde došlo k infekci více než 400 000 osob lidským druhem *C. hominis* prostřednictvím kontaminované pitné vody (MacKenzie et al. 1994, Fayer et al. 2008). V posledních dvaceti letech se díky dostupnosti molekulárních metod počet platných druhů a nově

popsaných genotypů výrazně zvýšil (Kváč et al. 2014b). V současné době je uznáno 36 platných druhů rodu *Cryptosporidium* (Zahedi et al. 2016, Čondlová et al. 2018, Kváč et al. 2018), které však představují jen zlomek rozmanitosti rodu *Cryptosporidium*. Kromě uvedených jmenovaných druhů (Tabulka 1) bylo popsáno více než 200 genotypů a environmentálních izolátů kryptosporidií, které byly popsány u celé řady obratlovců, v povrchových a odpadních vodách. U většiny těchto genotypů a izolátů jsou neznámé biologické a morfologické údaje potřebné pro popis druhu (Stenger et al. 2015).

## 2.2. Taxonomie

Rod *Cryptosporidium* patří do kmene Apicomplexa, který zahrnuje všechna parazitická eukaryota mající apikální komplex alespoň v některém vývojovém stádiu v rámci vývojového cyklu. V rámci kmene Apicomplexa byly kryptosporidie z důvodů morfologie vývojových stádií a vývojového cyklu tradičně řazeny mezi kokcidie (Levine 1988). Nicméně kryptosporidie disponují řadou odlišností jako například lokalizace mimo hostitelskou buňku, způsob přichycení k hostitelské buňce, přítomnost dvou morfologicky odlišných typů oocyst, velikostí a strukturou oocyst nebo nevnímavostí k léčbě kokcidiostatiky, které je odlišují od jakýchkoliv kokcidií (Fayer 2010, Ryan et Hijjawi 2015).

Na základě genomických a biochemických analýz bylo prokázáno, že kryptosporidie jsou evolučně odlišné od kokcidií a jsou více příbuzné gregarinám, (Zhu et al. 2000, Abrahamsen et al. 2004, Clode et al. 2013, Armon et al. 2016). Nedávné celogenomové sekvenování druhu *C. muris* prokázalo, že tento druh má podobné mitochondriální struktury a proteiny jako mají gregariny (Widmer et Sullivan 2012). Budoucí studie by měly vyjasnit taxonomickou pozici rodu *Cryptosporidium*.

### 2.3. Hostitelská specifita

Dle hostitelské specifity lze zástupce rodu *Cryptosporidium* řadit do tří skupin. Většina druhů a genotypů kryptosporidií má úzkou hostitelskou specifitu, tedy infikuje jednoho nebo pouze omezený počet hostitelů (Thomas et al. 2016). Typickým zástupcem této skupiny je *C. wrairi* parazitující pouze u morčat nebo nedávno popsáný druh *C. ditrichi*, který je úzce hostitelsky specifický pro myšice (Chrisp et al. 1992, Čondlová et al. 2018). Úzkou specifitu má také jediný antropogenní druh *Cryptosporidium hominis*, který téměř výlučně parazituje u lidí (Morgan-Ryan et al. 2002). Druhou skupinu tvoří druhy a genotypy, které parazitují u různých nepříbuzných skupin hostitelů. Například *C. muris*, parazitující zejména u myší domácích, nebo *C. andersoni*, parazitující u dospělého skotu, u celé řady hlodavců a sudokopytníků (Kváč et al. 2016). Do třetí skupiny kryptosporidií se širokou hostitelskou specifitou řadíme druhy *C. ubiquitum* a *C. parvum*. Posledně jmenovaný druh, jehož primárním hostitelem jsou mláďata hospodářsky chovaných sudokopytníků, je nejméně hostitelsky specifickým zástupcem rodu *Cryptosporidium*, který byl detekován u více než 200 různých druhů obratlovců včetně člověka (Ryan et al. 2014, Hijjawi et al. 2017). Lidské infekce jsou v 90 % případů způsobené druhy *C. hominis* a *C. parvum* (Cacciò et Putignami 2016), ale člověk je vnímavý k více než 20 různým druhům a genotypům kryptosporidií (Ortega et Kváč 2014), z nichž druhy *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus* a *C. viatorum* se vyskytují s častější frekvencí (Chen et al. 2002, Adamu et al. 2014, Li et al. 2014, Morada et al. 2016, Prediger et al. 2017).

**Tabulka 1.** Platné druhy rodu *Cryptosporidium* (upraveno dle Zahedi et al. 2016, Čondlová et al. 2018, Kváč et al. 2018).

<b>Druh</b>	<b>Hostitel</b>	<b>Reference</b>
<i>C. andersoni</i>	skot ( <i>Bos taurus</i> )	Lindsay et al. 2000
<i>C. apodemi</i>	myšice ( <i>Apodemus</i> )	Čondlová et al. 2018
<i>C. avium</i>	ptáci ( <i>Aves</i> )	Holubová et al. 2016
<i>C. baileyi</i>	ptáci ( <i>Aves</i> )	Current et al. 1986
<i>C. bovis</i>	skot ( <i>Bos taurus</i> )	Fayer et al. 2005
<i>C. canis</i>	pes ( <i>Canis familiaris</i> )	Fayer et al. 2001
<i>C. cuniculus</i>	králík ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	Robinson et al. 2010
<i>C. cichlidis</i>	ryby ( <i>Osteichthyes</i> )	Paperna et Vilenkin 1996
<i>C. ditrichi</i>	myšice ( <i>Apodemus</i> )	Čondlová et al. 2018
<i>C. ducismarci</i>	terestriální želvy ( <i>Testudinidae</i> )	Ježková et al. 2016
<i>C. erinacei</i>	ježek ( <i>Erinaceus europaeus</i> )	Kváč et al. 2014a
<i>C. fayeri</i>	klokan ( <i>Macropus rufus</i> )	Ryan et al. 2008
<i>C. felis</i>	kočka ( <i>Felis</i> )	Iseki 1979
<i>C. fragile</i>	obojživelníci ( <i>Amphibia</i> )	Jirků et al. 2008
<i>C. galli</i>	ptáci ( <i>Aves</i> )	Ryan et al. 2003
<i>C. hominis</i>	člověk ( <i>Homo sapiens</i> )	Morgan-Ryan et al. 2002
<i>C. huwi</i>	ryba ( <i>Poecilia reticulata</i> , <i>Paracheirodon innesi</i> , <i>Puntius tetrazona</i> )	Ryan et al. 2015
<i>C. macropodum</i>	klokan ( <i>Macropus giganteus</i> )	Power et Ryan 2008
<i>C. meleagridis</i>	krocán ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	Slavin 1955
<i>C. molnari</i>	ryba ( <i>Sparus aurata</i> )	Alvarez-Pellitero et Sitja-Bobadilla 2002
<i>C. muris</i>	hlodavci ( <i>Mus musculus</i> )	Tyzzer 1910
<i>C. occultus</i>	potkan ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Kváč et al. 2018
<i>C. parvum</i>	savci (Mammalia)	Tyzzer 1912
<i>C. proliferans</i>	hlodavci (Rodentia)	Kváč et al. 2016
<i>C. reichenklinkei</i>	čichavci (Helostomatidae)	Paperna et Vilankin 1996
<i>C. rubeyi</i>	veverky ( <i>Spermophilus beecheyi</i> )	Li et al. 2015
<i>C. ryanae</i>	skot ( <i>Bos taurus</i> )	Fayer et al. 2008
<i>C. scophthalmi</i>	ryba ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	Alvarez-Pellitero et al. 2004
<i>C. scrofarum</i>	prase ( <i>Sus scrofa</i> )	Kváč et al. 2013a
<i>C. serpentis</i>	plazi (Reptilia)	Levine 1980
<i>C. suis</i>	prase ( <i>Sus scrofa</i> )	Ryan et al. 2004
<i>C. testudinis</i>	želvy (Testudines)	Ježková et al. 2016
<i>C. tyzzeri</i>	myš ( <i>Mus musculus</i> )	Ren et al. 2012
<i>C. ubiquitousum</i>	skot ( <i>Bos taurus</i> )	Fayer et al. 2010
<i>C. varanii</i>	plazi (Reptilia)	Pavlassek et Ryan 2008
<i>C. viatorum</i>	člověk ( <i>Homo sapiens</i> )	Elwin et al. 2012
<i>C. wrairi</i>	morče ( <i>Cavia porcellus</i> )	Vetterling et al. 1971
<i>C. xiaoi</i>	ovce ( <i>Ovis arie</i> )	Fayer et al. 2010

## 2.4. Vývojový cyklus

Všechny druhy *Cryptosporidium* jsou obligátní intracelulární paraziti, jejichž životní cyklus je monoxenní (Tzipori et Ward 2002). Infekční oocysty se přenášejí fekálně-orální cestou a cyklus zahrnuje čtyři fáze vývoje: excystaci, merogonii, gametogonii a sporogonii. Doba potřebná na ukončení vývojového cyklu závisí jak na druhu a genotypu kryptosporidie, tak i na hostiteli (Melicherová et al. 2013, Aldeyarbi et Karanis 2016).

Jediné stádium, které nalezneme mimo hostitele, je oocysta. Oocysta obsahuje infekční stádia - sporozoity, obklopené tvrdou ochrannou stěnou, která je velmi odolná proti chemickému a mechanickému narušení a zajišťuje životaschopnost sporozoitů za nepříznivých okolních podmínek a to po mnoho měsíců (Fayer 2004, Ryan et al. 2015).

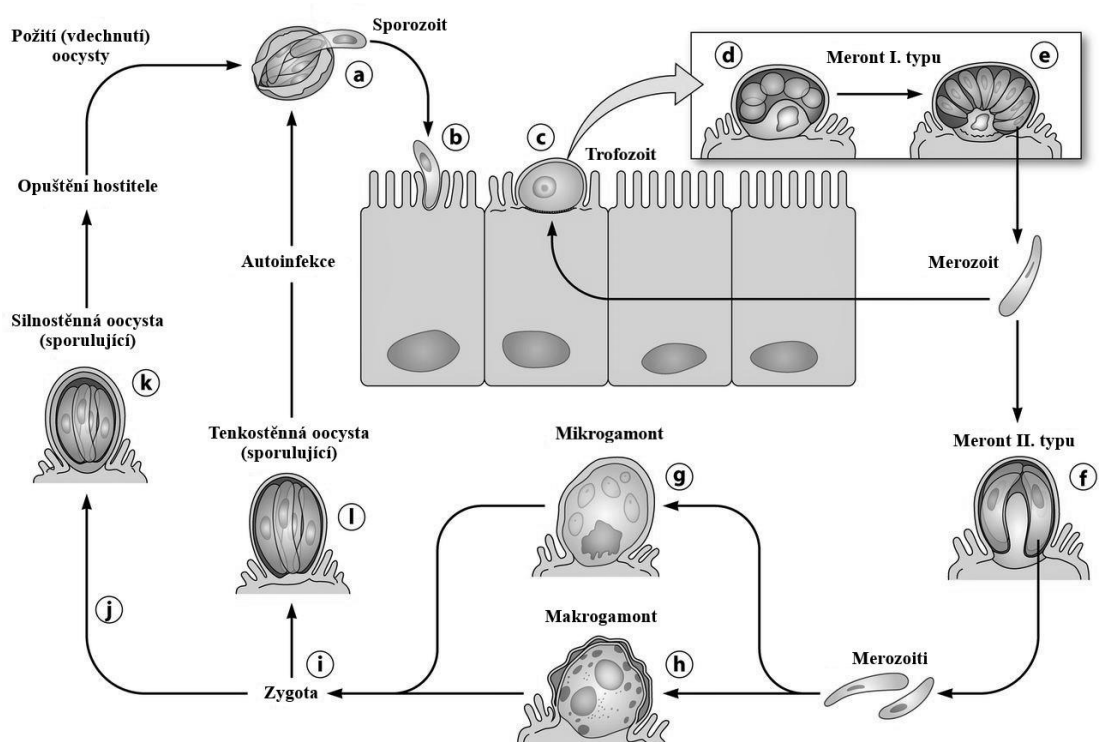
Po požití oocyst hostitelem začíná první fáze - excystace. Vlivem teploty, pH, přítomnosti rozpustných solí a pankreatických enzymů degraduje sutura a z každé oocysty excystují čtyři infekční sporozoiti, kteří infikují epitelové buňky gastrointestinálního traktu, popřípadě i extraintestinální tkáň. Sporozoiti obklopeni mikrokly se nezanořují do tkáň, ale jsou k hostitelské buňce přichyceni specializovaným orgánem tzv. Feeder organelou a vytváří tzv. multi-membránové připojení, které usnadňuje využití živin a energie z hostitele. Toto pravděpodobně ochrání vývojová stádia před imunitním systémem hostitele a extracelulárním prostředím, což umožňuje vývoj parazita (Hijjawi et al. 2002, Carey et al. 2003, Otrantoa et al. 2015).

Buněčná invaze sporozoity je následována přeměnou na trofozoity a dochází k asexuálnímu množení – merogonii (druhá fáze). Postupně se vyvíjí dva různé typy merontů - meront I typu produkující 6–8 merozoitů I typu, z něhož poté vzniká meront II typu produkující 4 merozoity II typu (Collinet-Adler et Ward 2010).

Merozoiti uvolnění z merontů typu I infikují jiné epitelální buňky a buď se vyvíjejí v meronty typu II nebo dávají vzniknout merontům typu I. Merozoiti typu II vstupují do třetí fáze - gametogonie, kdy dávají vzniknout mikrogamontům a makrogamontům (Koh et al. 2013). Mikrogamonti dávají vzniknout mikrogametám, které oplodní makrogamety vzniklé z makrogamontů za vzniku zygoty. Po oplodnění zygota dozrává do oocysty. Během sporogonie, poslední fáze cyklu, se vytvoří tenkostěnné a silnostěnné oocysty, z nichž každá obsahuje čtyři potenciálně infekční

sporozoity. Tenkostěnné oocysty zůstávají v hostiteli a mohou excystovat, což vede k autoinfekci a přetrvávajícím infekcím. Silnostěnné infekční oocysty jsou vylučovány ve stolici/trusu (Tzipori et Ward 2002, Carey et al. 2003, Melicherová et al. 2013).

**Obrázek 1.** Schematické znázornění životního cyklu kryptosporidií (Bouzid et al. 2013, upraveno).



## 2.5. Kryptosporidióza

Kryptosporidióza je klinické onemocnění, které se svými příznaky podobá gastroenteritidě. Dochází k zániku epitelálních buněk, což vede k atrofii mikrokloků, malabsorpci a narušení střevní propustnosti (Stratakos et al. 2017). U skotu způsobuje *C. andersoni* především poškození sliznice slezu (Gong et al. 2017). V některých závažných případech se infekce může rozšířit do respiračního ústrojí, což je komplikace nejčastěji pozorovaná u pacientů s virem HIV (Love et al. 2017). Kryptosporidie se přenáší přímým kontaktem s infikovanými osobami a zvířaty, nebo požitím kontaminovaných potravin a vody (Xiao 2010). Jediná oocysta



je dostačující k vyvolání infekce a k propuknutí onemocnění u vnímavých hostitelů (Ramirez et al. 2004).

V rozvojových zemích je kryptosporidíóza jednou z hlavních příčin úmrtí dětí do věku 5 let (Ehsan et al. 2016). U zdravých, imunokompetentních jedinců dochází obvykle k samovolnému vyléčení v průběhu 2 až 3 týdnů. Ovšem jedinci se sníženou imunitou, jako osoby infikované virem HIV, starší osoby a děti obvykle trpí chronickou infekcí, trvající často několik měsíců. Kryptosporidie jsou především závažným patogenem pacientů s AIDS a před použitím antiretrovirové terapie byla kryptosporidíóza spojena s vysokou mortalitou (Tzipori et Ward 2002, Ryan et Hijjawi 2015, Jumani et al. 2018).

Klinické onemocnění se projevuje vodnatým průjmem, dehydratací a ztrátou hmotnosti (Jex et al. 2008). Mezi další časté příznaky patří bolest břicha, nevolnost, zvracení a zvýšená teplota (Ryan et Hijjawi 2015). Průběh onemocnění se projevuje mírným až těžkým průběhem v závislosti na místě infekce, výživovém a imunitním stavu a věku hostitele (Ramirez et al. 2004, Chalmers et Davies 2010, O'Connor et al. 2011).

Kryptosporidiové infekce volně žijících zvířat často probíhají bezpříznakově s velmi nízkou intenzitou infekce. Patologické změny na zasažených orgánech jsou často minimální nebo nezjištěné (Ježková et al. 2017, Kváč et al. 2018, Čondlová et al. 2018).

## **2.6. Terapie kryptosporidiových infekcí**

Navzdory znalostem významu buněčné imunity a mnoha pokusům o identifikaci antigenů, které stimulují imunitní odpověď hostitele a i přes testování téměř tisíce látek nejsou v současné době schváleny žádné imunoterapeutické prostředky nebo vakcíny pro prevenci a léčbu kryptosporidíózy u zvířat nebo lidí (Fayer 2004, Stratakos et al. 2017).

Jediným léčivým přípravkem schváleným Úřadem pro kontrolu potravin (FDA) je Nitazoxanid (NTZ), jehož používání však není v Evropě schváleno. Tento přípravek zkracuje délku průjmu přibližně o 2 dny u imunokompetentních jedinců, nicméně má omezenou účinnost a vysokou míru selhání u imunodeficitních jedinců a

podvyživených dětí. Taktéž jsou popisovány recidivy ve více než 20 % případů. (Cacciò et Chalmers 2016, Schaefer et al. 2016, Hulveson et al. 2017).

Obecně platí, že imunokompetentní jedinci nepotřebují žádnou specifickou léčbu. Uplatňuje se podpůrná léčba s perorálním nebo intravenózním podáním tekutin a výměna elektrolytů, zatímco se pacient spontánně zotavuje. U pacientů s AIDS je nejlepší léčbou zlepšení imunitní funkce s vysoce aktivní antiretrovirovou terapií (HAART) (Chen et al. 2002, O'Connor et al. 2011).

## 2.7. Prevence kryptosporidiových infekcí

Oocysty jsou vysoce odolné vůči vnějším podmínkám prostředí. Při teplotě 5 až 15 °C zůstávají oocysty kryptosporidií životaschopné déle než 6 měsíců. Doba přežití se však výrazně zkracuje, klesne-li teplota prostředí pod 5 °C nebo zvýší-li se nad 15 °C (Gajadhar et al. 2015). Rovněž jsou odolné proti inaktivaci běžnými dezinfekčními látkami na bázi chloru (Carey et al. 2003). Vnější stěna oocyst je tvořena lipidovou vrstvou a vnitřní stěna glykoproteiny. Účinný dezinfekční prostředek musí proniknout do vnější vrstvy lipidů a poté poškodit stabilní glykoproteinovou vrstvu vnitřní stěny oocyst, aby zničil nebo poškodil infekční stadium parazita (Shahiduzzaman et Dauschies 2012).

Oocysty kryptosporidií může nevratně inaktivovat ultrafialové (UV) záření a vysušení. To pravděpodobně vysvětluje zjištění, že většina ohnisek souvisejících s potravinami souvisí s nápoji a čerstvými produkty (Gajadhar et al. 2015).

Opatření musí být zaměřena na prevenci a omezení šíření infekce, na eliminování nebo snížení kontaminace prostředí infekčními oocystami. Hygiena, včetně dezinfekce zůstává nejúčinnějším nástrojem (Fayer 2008, Chalmers et Davies 2010).

Pro prevenci kryptosporidiózy způsobené *C. parvum* u skotu je možné využít přípravek Halocur, který však stejně jako Nitazoxanid pouze zmírňuje klinické příznaky onemocnění a snižuje množství vyloučených oocyst do prostředí. Navíc je jeho použití limitováno aplikací, která musí být provedena buď během prvních 24–48 hodin nebo během 24 hodin po nástupu průjmů a následně po dobu 7 po sobě následujících dnů. (Hotchkiss et al. 2015).

## 2.8. Kryptosporidiové infekce medvědovitých šelem

Kryptosporidie byly detekovány u čtyř z pěti rodů čeledi Ursidae (*Helarctus*, *Tremarctos*, *Ursus* a *Ailuropoda*). Dosud nebyly publikovány žádné záznamy u medvěda pyskatého (*Melursus ursinu*), který je jediným existujícím zástupcem svého rodu. V zoologickém parku na Tchaj-wanu byly pomocí mikroskopických metod detekovány oocysty kryptosporidií u dvou v zajetí chovaných malajských medvědů (*Helarctos malayanus*) (Wang et Liew 1990). V Peru byla zjištěna mikroskopickými metodami (Ziehl-Neelsen) prevalence 14,3 % u medvěda brýlatého (*Tremarctos ornatus*), ale stejně jako v předchozím případě nebyla provedena genotypizace (Figueroa 2015).

U rodu *Ursus* byly kryptosporidie popsány u medvědů černých (*Ursus americanus*), medvědů hnědých (*Ursus arctos*) a medvědů ledních (*Ursus maritimus*) (Siam et al. 1994; Duncan et al. 1999; Xiao et al. 2000; Ravaszová et al. 2012). Ravaszová et al. (2012) v letech 2010 až 2011 odebrala na území středního a východního Slovenska 63 vzorků od medvěda hnědého (*Ursus arctos*) a pomocí serologických metod (ELISA) prokázala 55,6% (35/63) prevalenci. Analýza sekvencí genu kódujícího malou ribozomální podjednotku rRNA a 70-kDa proteinu tepelného šoku (HSP70) prokázala u medvěda černého přítomnost genotypu blízké příbuzného k druhu *C. canis* (Xiao et al. 2000).

V Číně, v provincii S'-čchuan, byl u pandy velké (*Ailuropoda melanoleuca*) chované ve výzkumném středisku pro ochranu a odchov pand velkých nalezen nový genotyp, který byl pojmenován *Cryptosporidium* giant panda genotype (Liu et al. 2013). Bližší informace o biologických vlastnostech tohoto genotypu nejsou k dispozici.

## 2.9. Kryptosporidiové infekce psovitých šelem

Psovití (Canidae) jsou většinou masožravci, případně všežravci z řádu šelem (Carnivora) zahrnující psy, vlky, lišky, kojoty a šakaly ve 12 rodech. Kryptosporidie byly detekovány u 6 druhů psovitých.

### 2.9.1. Vlci

Dvě velké studie z Kanady shodně ukázaly relativně nízkou prevalenci kryptosporidií u vlka obecného (*Canis lupus*). V Britské Kolumbii byla na základě mikroskopického vyšetření zjištěna prevalence 1,7 % z celkového počtu 1 558 vzorků trusu (Bryan et al. 2012). Podobně nízký výskyt kryptosporidií detekovaných mikroskopicky u vlka obecného byl zaznamenán v provincii Manitoba, kdy celková prevalence byla 1,2 % (7/601; Stronen et al. 2011).

Naopak vyšší výskyt kryptosporidií detekovaných mikroskopickými metodami byl prokázán u vlka obecného na severovýchodě Polska, ve studii bylo detekováno 54,9 % (28/51) pozitivních jedinců (Kloch et al. 2005). V následné studii z roku 2007, prováděné v téže oblasti Polska detekovali Paziewska et al. (2007) u vlka obecného sekvenční analýzou genu COWP výskyt druhu *C. parvum*, celková prevalence v této studii byla 35,7 %.

### 2.9.2. Psi

*Cryptosporidium canis*, následovaný *C. parvum*, *C. muris* a *C. meleagridis*, je nejčastěji detekovaným druhem kryptosporidií u psů (Tabulka 2; Jian et al. 2014).

První důkaz kryptosporidiózy u psů byl zaznamenán Tziporim a Campbellem (1981), kteří detekovali protilátky proti kryptosporidiím v séru 16 psů z 20. První klinický případ byl hlášen o 2 roky později u 1 týden starého štěněte s akutním průjmem (Wilson et al. 1983). Následně byla kryptosporidióza u psů hlášena po celém světě, zahrnující jak asymptomatické psy, tak i psy s průjmovým onemocněním. V některých zemích byly provedeny u psů rozsáhlé průzkumy infekce kryptosporidií pomocí různých diagnostických metod (Tabulka 3).

Druh *C. canis* byl popsán v roce 2001 (Fayer et al. 2001), ale o dva roky dříve Xiao et al. (1999) popsali *C. canis* (dříve označován jako *C. parvum* dog genotype) jako genotyp kryptosporidie hostitelsky specifický pro psy. Bylo prokázáno, že *C. canis* není infekční pro myši ani v případě, že jsou imunosuprimovány a je infekční pro skot (Fayer et al. 2001).

V rámci *C. canis* byly popsány 3 genotypy, krom výše uvedeného dog genotypu také *C. canis* fox genotype a *C. canis* coyote genotype (Zhou et al. 2004, Trout et al. 2006, Fayer 2010).

**Tabulka 2.** Druhy a genotypy *Cryptosporidium* spp. popsané u psů na základě genotypizace.

Druh	Země	Velikost oocyst ( $\mu\text{m}$ )	Gen	Reference
<i>C. canis</i>	Austrálie	$4,9 \times 4,4$	SSU, HSP70	Morgan et al. 2000
	Itálie	---	COWP	Giangaspero et al. 2006
	Japonsko	---	SSU	Abe et al. 2002a
	Japonsko	---	SSU	Abe et al. 2002b
	Japonsko	$4,4 \pm 0,5 \times 3,2 \pm 0,4$	SSU	Satoh et al. 2006
	USA	---	SSU	Xiao et al. 1999
	USA	$4,95 \times 4,71$	SSU, HSP70	Fayer et al. 2001
	USA	---	actin	Miller et al. 2003
<i>C. parvum</i>	Česká republika	$4,7 \pm 0,0 \times 4,3 \pm 0,3$	SSU	Hajdušek et al. 2004
	Itálie	---	COWP	Giangaspero et al. 2006
	USA	$5,19 \times 4,90$	SSU, HSP70	Fayer et al. 2001
<i>C. meleagridis</i>	Česká republika	$4,7 \pm 0,0 \times 4,3 \pm 0,4$	SSU	Hajdušek et al. 2004
<i>C. muris</i>	USA	---	SSU	Ellis et al. 2010
	USA	---	SSU	Lupo et al. 2008

SSU – gen kódující malou ribozomální podjednotku rRNA; COWP – *Cryptosporidium* oocyst wall protein; HSP70 – Heat Shock Protein 70

**Tabulka 3.** Prevalence *Cryptosporidium* spp. detekována u psů pomocí mikroskopických\* a molekulárních<sup>§</sup> metod.

Země	Počet zvířat	Prevalence (%)	Reference
Argentina	2193*	0,2	Fontanarroza et al. 2006
Argentina	113*	12,4	Ponce de León et al. 1994
Argentina	100*	1,0	Soriano et al. 2010
Austrálie	421*	0,0	Bugg et al. 1999
Austrálie	493*	11,0	Johnston et Gasser 1993
Austrálie	55*	1,8	Milstein et Goldsmit 1995
Brazílie	100*	40,0	Ederli et al. 2005
Brazílie	166*	2,4	Huber et al. 2005
Brazílie	450*	8,8	Lallo et Fernandes Bondan 2006
Brazílie	433*	1,4	Mundim et al. 2006
Brazílie	81*	4,9	Mandarino-Pereira et al. 2010
Costa-rica	58 <sup>§</sup>	1,7	Scorza et al. 2011
Česká Republika	458*	4,6	Svobodová et al. 1994
Egypt	685*	3,8	Abou-Eisha et Abdel-Aal 1995
Egypt	25*	12,0	El-Hohary et Abdel-Latif 1998
Finsko	57*	0,0	Pohjola 1984
Německo	270*	0,4	Cirak et Bauer 2004
Německo	1281*	0,0	Epe et al. 2004
Nizozemsko	152 <sup>§</sup>	8,6	Overgaauw et al. 2009
Maďarsko	36*	8,3	Nagy 1995
Indie	9*	8,53	Kumar et al. 2004
Iran	548*	2,0	Mirzaei 2012
Iran	77*	5,2	Beiromvand et al. 2013
Japonsko	140*	6,4	Abe et al. 2002b
Japonsko	213*	1,4	Uga et al. 1989
Japonsko	77 <sup>§</sup>	3,9	Yoshiuchi et al. 2010
Kanada	70*	74,3	Shukla et al. 2006
Kanada	155*	3,2	Himsworth et al. 2010
Korea	257*	9,7	Kim et al. 1998
Skotsko	101*	0,0	Simpson et al. 1988
Španělsko	81*	7,4	Causapé et al. 1996
Španělsko	79*	5,1	Dado et al. 2012
Španělsko	505*	6,3	Gracenea et al. 2009
USA	200*	2,0	El-Ahraf et al. 1991
USA	130*	3,8	Hackett et Lappin 2003
USA	100*	1,7	Juett et al. 1996
USA	49*	10,2	Jafri et al. 1993
USA	129 <sup>§</sup>	2,3	Wang et al. 2012
USA	100 <sup>§</sup>	7,0	Tupler et al. 2012
USA	120*	2,2	McKenzie et al. 2010

### 2.9.3. Kojoti

V Pensylvánii byla u kojotů (*Canis latrans*) zjištěna prevalence 27 % (6/22) (Trout et al. 2006), obdobně tomu bylo v New Yorku, kde bylo zjištěno 26,3 % (5/19) pozitivních jedinců na základě mikroskopického a serologického vyšetření trusu (Ziegler et al. 2007). Trout et al. (2006) ve své studii molekulární analýzou prokázal u jednoho izolátu přítomnost genotypu blízkce příbuzného *C. muris* a u pěti zbývajících vzorků detekoval *C. canis* coyote genotype. Tento genotyp byl rovněž popsán u kojotů v Kanadě s celkovou prevalencí 11,4 % (8/70; Thompson et al. 2009). Výskyt *C. canis* coyote genotype byl vyšší u kojotů v zimě (17,4 %) v porovnání se vzorky odebranými v létě (0 %).

### 2.9.4. Šakalové

U šakala obecného (*Canis aureus*) nebyla doposud detekována přítomnost kryptosporidií. Výskyt kryptosporidií u šakala obecného (*Canis aureus*) zjišťoval Razmjoo et al. (2014). V jeho studii bylo metodou Ziehl-Neelsen vyšetřeno 56 vzorků trusu od šakalů, nicméně žádní pozitivní jedinci nebyli detekováni.

### 2.9.5. Lišky

Kryptosporidie byly detekovány u dvou rodů lišek: *Vulpes* a *Urocyon*. Lišky obecné (*Vulpes vulpes*) jsou nejrozšířenější členové řádu šelem. Vzhledem k tomu, že často žijí v příměstských oblastech, představují potenciální rezervoár zoonóz. K nákaze u lidí zejména zoonotickými parazity dochází častěji, neboť lidské prostředí je stále více sdíleno s infikovanými zvířaty, ať už s domácími nebo s těmi divokými (Onac et al. 2015).

Výskyt kryptosporidií u lišek obecných uvádí Ravaszová et al. (2012) ve své studii ze Slovenska, kde byla zjištěna 38,7% (24/62) prevalence; vzorky byly vyšetřeny metodou ELISA. V Irsku byl detekován druh *C. parvum* u 2 lišek obecných, celková prevalence v této studii byla 8,1 % (Nagano et al. 2007). Obdobný nízký výskyt kryptosporidií u lišek obecných byl zaznamenán v Norsku a v Anglii,

kde bylo *Cryptosporidium* sp. detekováno u 2,2 % (6/269), respektive u 8,7 % (2/23) lišek (Sturdee et al. 1999, Hamnes et al. 2007).

V Ilamské provincii Írán v letech 2010-2013 bylo vyšetřeno 62 vzorků trusu od lišek obecných s prevalencí *Cryptosporidium* spp. ve výši 3,2 %. Vzorky byly vyšetřeny metodou Ziehl-Neelsen, genotypizace nebyla provedena (Razmjoo et al. 2014). Zhou et al. (2004) identifikovali *C. canis* fox genotype, *C. canis* dog genotype a *Cryptosporidium* muskrat genotype I u blíže nespecifikovaných lišek v Marylandu, USA.

Kryptosporidie byly rovněž detekovány u lišek polárních (*Vulpes lagopus*) chovaných na farmách v Číně, celková prevalence byla 15,9 % (48/302), u všech 48 pozitivních vzorků molekulární analýzy prokázaly přítomnost druhu *C. canis* (Zhang et al. 2016). U lišek polárních v Kanadě bylo mikroskopickou detekcí oocyst v trusu zjištěno 9 pozitivních jedinců z 95 vyšetřovaných vzorků (Elmore et al. 2013).

U lišky šedé (*Urocyon cinereoargenteus*) v USA popsal výskyt *Cryptosporidium* sp. Current (1989) a Davidson et al. (1992).

#### **2.9.6. Kryptosporidióza a patogenita u medvědotvých a psovitých šelem**

Z výše uvedeného vyplývá, že kryptosporidióza je pravděpodobně běžné onemocnění psů. V řadě studií byl popsán průjem jako nejčastější klinický projev kryptosporidiózy psů (Mirzaei 2012, Tupler et al. 2012). Nicméně vzhledem k časté absenci klinických příznaků a intermitentnímu vylučování oocyst jsou kryptosporidiové infekce pravděpodobně přehlíženy a množství infikovaných psů je podhodnoceno (Santín et Trout 2008). Ellis et al. (2010) popsali chronickou gastritidu u 18 měsíčního psa způsobenou druhem *C. muris*, který měl současně infekci způsobenou helicobacterem.



### 3. Cíle

- Popsat výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikujících volně žijící psovité a medvědovité šelmy.
- Pomocí standardních parazitologických metod a specifických barvení diagnostikovat oocysty kryptosporidií v trusu vyšetřovaných jedinců a stanovit intenzitu infekce.
- Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp kryptosporidií.
- Využít fylogenetické postupy k určení fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy a genotypy detekovaných kryptosporidií.
- Zhodnotit prevalenci, výskyt a hostitelskou specifitu nalezených druhů a genotypů.

## **4. Materiál a metodika**

### **4.1. Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření**

Vzorky byly odebírány v období mezi lety 2015 až 2017 od vybraných šelem žijících na území České republiky, Slovenské republiky, Polska a Rumunska (Tabulka 6). Vzorky z lišek obecných (*Vulpes vulpes*) byly získávány z tlustého střeva odstřelených jedinců. Vzorky z vlků obecných (*Canis lupus*), šakalů obecných (*Canis aureus*) a medvědů hnědých (*Ursus arctos*) byly sbírány ze země při stopování zvířat v oblastech jejich výskytu. Vzorky trusu od každého zvířete byly individuálně skladovány ve sterilním plastovém kelímku, opatřeny popisem a uskladněny při teplotě + 4 až +8 °C do doby zpracování.

### **4.2. Vyšetření vzorků trusu na přítomnost kryptosporidií**

Všechny získané vzorky byly mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií pomocí specifického barvení anilin-carbol-methyl violetí (4.3) a molekulárními metodami na přítomnost specifické DNA kryptosporidií (4.4).

### **4.3. Barvení oocyst anilin-carbol-methyl violetí (Miláček et Vítovec 1985)**

#### **Zásobní roztoky**

- Roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti; 1 ml anilinu; 1 g fenolu; 30 ml 96 % alkoholu; 70 ml dH<sub>2</sub>O).
- Roztok tartrazinu (1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové).
- 2% kyselina sírová.

#### **Pracovní postup**

- Špejlí rozetřít vzorek trusu na podložní sklíčko a fixovat metanolem v plameni.
- Vzorek barvit roztokem methylvioleti po dobu 30 minut.
- Opláchnout pod tekoucí vodou.
- Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 2 minut.
- Opláchnout pod tekoucí vodou.
- Dobarvit roztokem tartrazinu po dobu 1–2 minut.
- Opláchnout pod tekoucí vodou.
- Nechat uschnout při laboratorní teplotě a následně prohlédnout mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

#### **Výsledek**

Oocysty se barví modrofialově na žlutooranžovém pozadí. Preparáty byly vyšetřeny mikroskopem OLYMPUS BX51 při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

#### **Hodnocení intenzity infekce**

Intenzita infekce byla hodnocena dle metodiky Kváč et al. (2007). Podložní sklo bylo před a po nátěru zváženo s přesností na 0,01 g. Při mikroskopickém vyšetření byl spočítán celkový počet oocyst v nátěru. Intenzita infekce byla vyjádřena jako počet oocyst na 1 g trusu.

#### 4.4. Izolace DNA z trusu

Izolace byla provedena pomocí komerčního kitu Exgene Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology, Korea).

Součásti kitu

- FL pufr
- PB pufr
- NW pufr
- EzPass kolona
- Kolona typ G
- 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavka

Pracovní postup

- Vzorek trusu (200 mg) dát do Safe-Lock-Tube, přidat skleněné a zirkonové kuličky o průměru 0,5 mm a 1,0 mm, respektive a 1 ml FL pufru, zhomogenizovat a rozbít 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s (Fast Prep 24 Instrument, MP Bio, CA, USA).
- Inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě a následně centrifugovat 5 minut při 12 000 g.
- Supernatant přenést na EzPass kolonku, centrifugovat 1 minutu při 12 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Na kolonku napipetovat 100 µl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a znovu centrifugovat 1 minutu při 12 000 g.
- Vyhodit kolonku a do sběrné zkumavky připipetovat 500 µl PB pufru, pipetováním promíchat a obsah sběrné zkumavky přenést na MiniSpin column.
- Centrifugovat 1 minutu při 12 000 g, poté odstranit filtrát.
- Napipetovat 500 µl pufru NW na střed kolony a centrifugovat 1 minutu při 12 000 g.
- Odstranit filtrát a přenést kolonu na čistou mikrocentrifugační zkumavku.
- Na membránu kolony napipetovat 200 µl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při 12 000 g.

- Odstranit kolonu a filtrát s vyzolovanou DNA skladovat v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

## 4.5. Genotypizace kryptosporidií

### 4.5.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost specifické DNA kryptosporidií byla detekována pomocí nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou ribosomální podjednotku rRNA (SSU; Jiang et al. 2005) a aktin (Sulaiman et al. 2002). V případě pozitivního záchytu byly získané PCR produkty sekvenovány (4.8.) a na základě výsledků dále genotypizovány na genu kódujícím 60 kDA glykoprotein (gp60; Li et al. 2014).

DNA byla amplifikována v termocykleru za použití programu:

- Počáteční denaturace po dobu 3 minuty při 95 °C;
- 35 cyklů zahrnující denaturaci 45 s při 94 °C;
- nasedací teploty primerů – tabulka 4
- extenze 60 s při 72 °C;
- finální extenze 7 minut při 72 °C.

#### Chemikálie:

- PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, Česká republika)
- Primery (10 µM, Generi Biotech, Česká republika)
- PCR mastermix – 2× HS-Taq premix AmpONE (GeneAll, Korea), obsahující 2 U HS-Taq DNA polymerázy, 200 µM dNTPs, reakční pufr, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, loading dye a stabilizátor.

Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 2 µl primárního PCR produktu. Jako negativní kontrola byla použita PCR voda a jako pozitivní kontrola byla použita DNA *C. hominis*.

Sety primerů pro amplifikaci jsou uvedeny v tabulce 4 a složení reakční směsi PCR protokolu v tabulce 5.

**Tabulka 4.** Sety primerů pro amplifikaci genu kódujícího malou ribosomální podjednotku rRNA (SSU), aktin a 60 kDa glykoprotein (gp60).

<b>SSU</b>	<b>Specifické pro <i>Cryptosporidium</i> spp.</b>
<b>Primární reakce</b>	<b>55 °C (nasedací teplota)</b>
<b>F1</b>	TTCTAGAGCTAATACATGCG
<b>R1</b>	CCCATTTCTTCGAAACAGGA
<b>Sekundární reakce</b>	<b>55 °C (nasedací teplota)</b>
<b>F2</b>	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG
<b>R2</b>	CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA
<b>aktin</b>	<b>Specifické pro <i>Cryptosporidium</i> spp.</b>
<b>Primární reakce</b>	<b>50 °C (nasedací teplota)</b>
<b>F1</b>	ATGRGWGAAGAAGWARYWCAAGC
<b>R1</b>	AGAARCAYTTTCTGTGKACAAT
<b>Sekundární reakce</b>	<b>45 °C (nasedací teplota)</b>
<b>F2</b>	CAAGCWTTTRGTTGTTGAYAA
<b>R2</b>	TTTCTGTGKACAATWSWTGG
<b>gp60</b>	<b>Specifické pro <i>Cryptosporidium ubiquitum</i></b>
<b>Primární reakce</b>	<b>58 °C (nasedací teplota)</b>
<b>F1</b>	TTTACCCACACATCTGTAGCGTCG
<b>R1</b>	ACGGACGGAATGATGTATCTGA
<b>Sekundární reakce</b>	<b>55 °C (nasedací teplota)</b>
<b>F2</b>	ATAGGTGATAATTAGTCAGTCTTTAAT
<b>R2</b>	CCAAAAGCGGCTGAGTCAGCATC

**Tabulka 5.** Reakční směs primární a sekundární reakce pro PCR protokol pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribosomální podjednotku rRNA, aktinu a 60 kDa glykoproteinu kryptosporidií.

PRIMÁRNÍ REAKCE			SEKUNDÁRNÍ REAKCE		
	Koncentrace	Objem (µl)		Koncentrace	Objem (µl)
H <sub>2</sub> O	-----	7	H <sub>2</sub> O	-----	7
Primer forward	200 mM	0,50	Primer forward	10 µM	0,50
Primer reverse	200 mM	0,50	Primer reverse	200 mM	0,50
PCR master mix	2×	10	PCR master mix	2×	10
DNA	-----	2	<b>Produkt primární PCR</b>	-----	2
<b>Celkem</b>	-----	<b>20</b>	<b>Celkem</b>	-----	<b>20</b>

## 4.6. Gelová elektroforéza

Výsledný sekundární PCR produkt byl detekován na 1% agarózovém gelu s přídatkem ethidium-bromidu (EtBr) a vizualizován pomocí UV záření (302 nm) transiluminátorem (Ultra-Lum Inc, USA) a dokumentován (High Performance UV Transilluminator, Biotech, Česká republika).

### Chemikálie

50× TAE pufr (242 g tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA; pH8,00).

- Agaróza (Serva Electrophoresis, Německo).
- Ethidium bromid (10 mg/ml, Sigma Aldrich, USA).
- 100 bp DNA ladder (Fermentas International Inc., Kanada).

### Pracovní postup

- Smíchat agarózu s TAE pufrem.
- Nechat rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit na teplotu cca 50 °C pod tekoucí vodou.
- Přidat ethidium-bromid, promíchat.
- Do formy nalít gel, vložit hřeben a nechat ztuhnout.
- Po ztuhnutí vyjmout hřeben a vložit gel do elektroforetické vany s TAE pufrem.
- Vyjmout hřeben a do 1. jamky pipetovat 5 µl 100 bp DNA Ladder, do ostatních 20 µl produktu sekundární PCR.
- Spustit elektroforézu při napětí 80 V na dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA.
- Vizualizovat DNA fragmenty za pomoci UV transiluminátoru.

#### 4.7. Purifikace PCR produktu z gelu

Fragmenty DNA po elektroforetické separaci vhodné k osekvenování byly vyizolovány pomocí Gen Elute (Sigma) podle doporučení výrobce.

Součástí kitu:

- Column Preparation solution.
- Gel Solubilization Solution.
- Wash Solution Concentrate G.
- Elution Solution.

Postup:

- Vyříznout fragment DNA z gelu pod UV lampou čistým skalpelem a dát do eppendorfky.
- Do eppendorfky s fragmentem gelu připipetovat Gel Solubilization Solution. Na 100 mg gelu přidat 300 µl Gel Solubilization Solution.
- Inkubovat 10 minut při 50 °C, kontrolovat rozpouštění a každé 2–3 minuty promíchat.
- Zahřát PCR vodu na eluci na 65 °C.
- Sestavit Binding Column G, napipetovat 500 µl Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 12 000 g.
- Po rozpouštění musí být ve zkumavce žlutý roztok.
- Připipetovat ke vzorku 150 µl isopropanolu a promíchat.
- Přepipetovat veškerý objem vzorku na kolonu (Binding Column G) a centrifugovat 1 minutu při 12 000 g.
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět použít s kolonou.
- Přepipetovat 700 µl Wash Solution G a centrifugovat 1 minutu při 13 200 g.
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět ji použít s kolonou.
- Centrifugovat 1 minutu při 12 000 g.
- Otočit zkumavku v centrifuze o 180° a centrifugovat znovu 3 minuty při 12 000 g.
- Kolonu dát do nové 1,5 ml eppendorfky a provést eluci napipetováním 30 µl Elution Solution předehřátého na 65 °C přímo na střed kolony. Inkubovat 1 minutu a poté centrifugovat 1 minutu při 12 000 g.



#### **4.8. Sekvenování**

Purifikované sekundární PCR produkty (4.7) byly sekvenovány pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů v komerční laboratoři (SEQme s.r.o.).

#### **4.9. Fylogenetické analýzy**

Nukleotidové sekvence získané v této studii byly analyzovány programem Chromas Pro 2.4.1. (Technelysium, Pty, Ltd, South Brisbane, Austrálie). Finální alignment získaných sekvencí a sekvencí uložených v databázi GenBank byl vytvořen v programu MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) a následně ručně editován pomocí programu BioEdit. Pro datovou sadu sekvencí SSU a aktinu bylo použito výchozí nastavení programu a pro sadu sekvencí gp60 E-INS-i strategie. Ke konstrukci fylogenetických stromů byl použit program MEGA 7 (Guindon et Gascuel 2003, Tamura et al. 2013). Metodou Maximum likelihood (ML) byly vypočteny fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií. Analýza Best DNA/protein model v rámci programu MEGA 7 byla použita pro výběr nejvhodnějšího ML modelu. Pro datovou sadu SSU a aktin byl vybrán General Time Reversible+G model a pro gp60 General Time Reversible+G+I model. Podpora větví pro všechny modely byla získána na základě 1000 bootstrapových opakování. Fylogenetické stromy byly do finální podoby upraveny pomocí programu CorelDraw X7 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada).

## 5. Výsledky

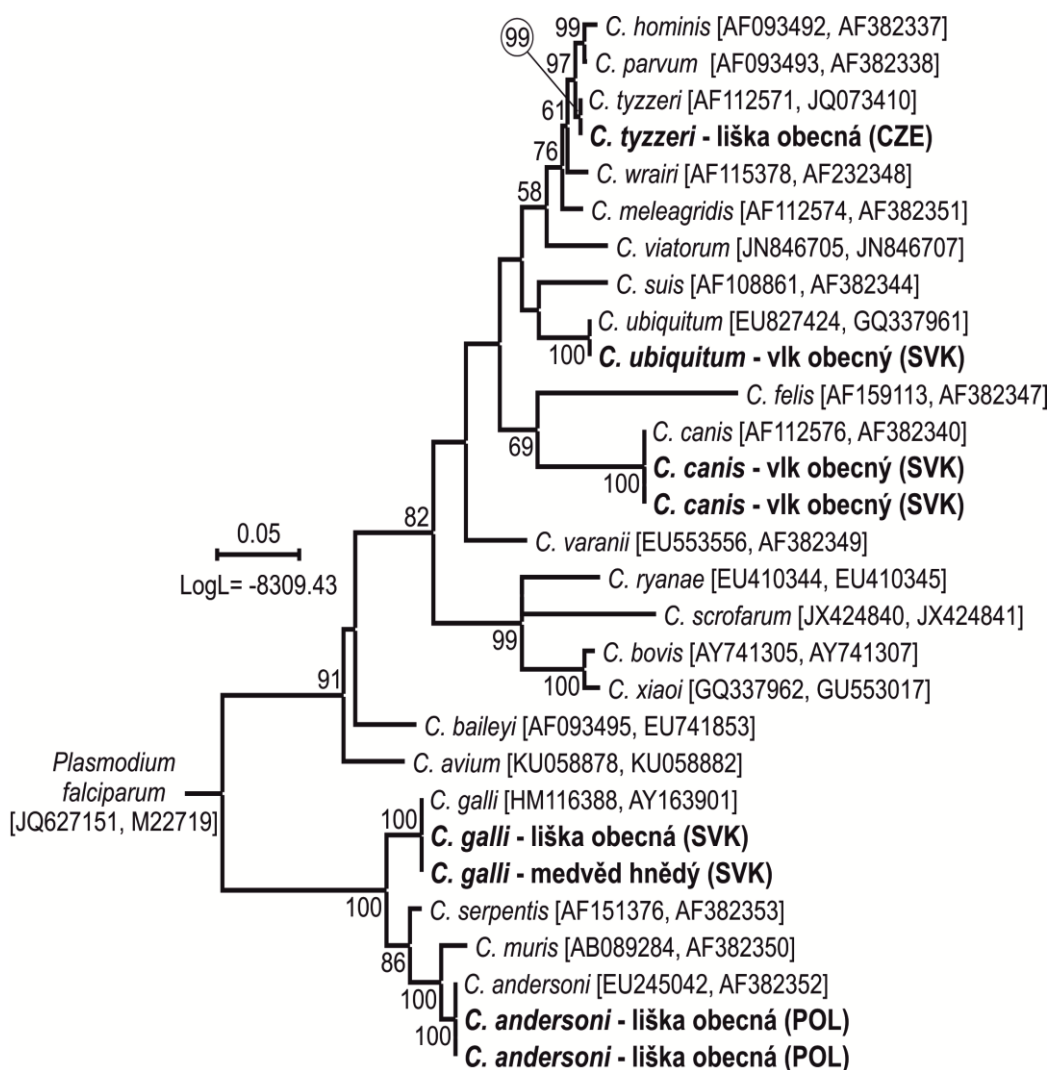
### 5.1. Výskyt a prevalence

Celkem bylo vyšetřeno 359 vzorků trusu pocházejících od lišek obecných (n=179), vlků obecných (n=83), šakalů obecných (n=34) a od medvědů hnědých (n=63). Mikroskopické vyšetření pomocí barvení anilin-carbol-methyl violetí neprokázalo přítomnost oocyst kryptosporidií u žádného z vyšetřovaných vzorků. Specifická DNA kryptosporidií genu kódujícího SSU byla úspěšně amplifikována u 8 vzorků z 359 vyšetřených, z toho u 4 lišek, 3 vlků a 1 medvěda. U šakala obecného nebyli v této práci detekováni žádní pozitivní jedinci (Tabulka 6). Následné fylogenetické analýzy (SSU a aktin) prokázaly přítomnost 5 druhů rodu *Cryptosporidium*, jmenovitě *C. tyzzeri* (n=1), *C. andersoni* (n=2), *C. galli* (n=2), *C. canis* (n=2) a *C. ubiquitum* (n=1). Subtypizace izolátů *C. tyzzeri* a *C. ubiquitum* pomocí sekvenční analýzy gp60 genu ukázala, že izolát *C. tyzzeri* patří do alelické rodiny IXa subtyp A8 a izoláty *C. ubiquitum* do alelické rodiny XIIId.

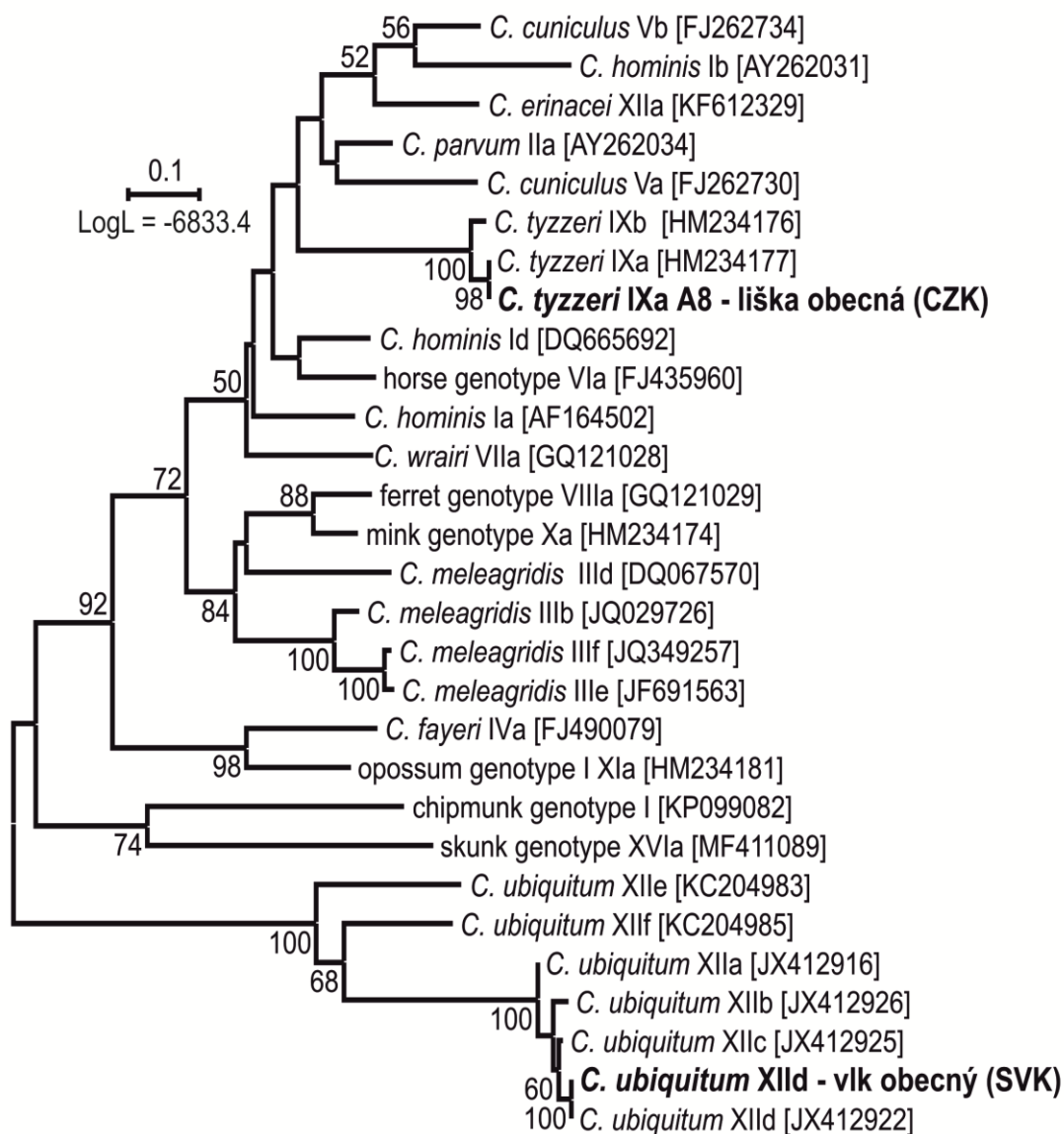
**Tabulka 6.** Výskyt kryptosporidií u lišek obecných (*Vulpes vulpes*), vlků obecných (*Canis lupus*), medvědů hnědých (*Ursus arctos*) a šakalů obecných (*Canis aureus*) na základě mikroskopického (MIC) a molekulárního (PCR) vyšetření v České republice (CZE), v Polsku (POL), na Slovensku (SVK) a v Rumunsku (ROM).

Hostitel (vědecké jméno)	Země	n	MIC/PCR	Genotypizace <i>Cryptosporidium</i> spp.		
				SSU	actin	gp60
<b>liška obecná</b> ( <i>Vulpes vulpes</i> )	CZE	58	0/1	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i>	IXaA8
	POL	74	0/2	<i>C. andersoni</i>	<i>C. andersoni</i>	-
	SVK	47	0/1	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	-
<b>vlk obecný</b> ( <i>Canis lupus</i> )	SKV	83	0/ 2	<i>C. canis</i>	<i>C. canis</i>	-
			1	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	XIIId
<b>šakal obecný</b> ( <i>Canis aureus</i> )	ROM	34	0/0	-	-	-
<b>medvěd hnědý</b> ( <i>Ursus arctos</i> )	POL	15	0/0	-	-	-
	SVK	48	0/1	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	-

**Obrázek 2.** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií detekovaných v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií z konkatenovaných sekvencí genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU) a aktin vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny a v závorce je uveden stát, kde byl příslušný izolát získán (Česká republika (CZE), Polsko (POL), Slovensko (SVK) a Rumunsko (ROM)).



**Obrázek 3.** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií detekovaných v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence kódující 60kDa glykoprotein (gp60) vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny a v závorce je uveden stát, kde byl příslušný izolát získán (Česká republika (CZE), Polsko (POL), Slovensko (SVK) a Rumunsko (ROM)).



## 6. Diskuze

Výskyt kryptosporidií u zvířat je ovlivněn řadou faktorů. Na úrovni jedince jsou infekce ovlivňovány zejména věkem a imunitou hostitele. Na úrovni populace jsou hlavními faktory lokalita a hustota populace, ale i roční období (Petersen et al. 2015, Gatti et al. 2017). Velký vliv mají i metody použité k detekci kryptosporidií.

V této studii jsme pomocí mikroskopických metod nedetkovali přítomnost oocyst kryptosporidií v žádném z vyšetřovaných vzorků, přestože následné molekulární analýzy prokázaly jejich přítomnost. Tyto nálezy jsou v souladu s většinou publikovaných údajů pocházejících z celé řady volně žijících zvířat (Kváč et al. 2014b).

Celková prevalence u lišek obecných v této studii byla 2,2 % (4/179), což je ve shodě s výsledky studií v Norsku a v Anglii, kde bylo *Cryptosporidium* sp. detekováno u 2,2 % (6/269), respektive 8,7 % (2/23) lišek (Sturdee et al. 1999, Hamnes et al. 2007). Obdobně nízká prevalence (3,2 %) byla popsána u lišek obecných v Ilamské provincii Írán (Razmjoo et al. 2014) a lišek šedých (1,9 %) v Severní Americe (Davidson et al. 1992). Vzhledem k tomu, že lišky většinou vedou samotářský život v rámci svého teritoria, neměla by nízká prevalence zjištěná v této a většině ostatních studií být překvapivá. Šestnácti procentní prevalence detekovaná pomocí molekulárních metod u farmově chovaných lišek arktických může být vysvětlena bližším kontaktem jednotlivých zvířat mezi sebou a snazším přenosem infekce v rámci chovu (Zhang et al. 2016). Výrazně odlišné procento pozitivních lišek obecných uvádějí Ravaszová et al. (2012), kteří detkovali koproantigen v trusu u téměř 40 % lišek obecných na Slovensku. Tomanová (2017) prokázala, že molekulární metody jsou citlivější než detekce koproantigenu v trusu a současně, že přítomnost koproantigenu je vázána na přítomnost oocysty ve vzorku. Rozdíl v prevalenci lišek ve studii Ravaszová et al. (2012) není možné vysvětlit.

Vyjma studií Zhou et al. (2004) a Zhang et al. (2016), nebyla v žádné jiné práci, včetně této, popsána přítomnost hostitelsky specifických kryptosporidií u lišek. V této studii byly detekovány druhy *C. tyzzeri*, *C. andersoni* a *C. galli*, které jsou hostitelsky specifické pro myši, skot a ptáky (Ren et al. 2012, Nakamura et Maireles 2015, Kváč et al. 2016). Vzhledem k tomu, že liška obecná je nenáročný všežravec a její kořisti mohou být desítky až stovky různých druhů živočichů v závislosti na

místních podmínkách, předpokládáme, že nález *C. tyzzeri*, *C. andersoni* a *C. galli* v této studii a *Cryptosporidium* muskrat genotype I (genotyp specifický pro drobné hlodavce) ve studii Zhou et al. (2004) je výsledkem mechanické pasáže oocyst, kterými byla infikována kořist. Mechanická pasáž hostitelsky nespecifických druhů a genotypů kryptosporidií byla v minulosti popsána u celé řady savců, ptáků a plazů (Crawshaw et Mehren 1987, Graczyk et al. 1996, Xiao et al. 2004b). Nález *C. tyzzeri* subtypu IXa u lišky v Polsku je v souladu s geografickou distribucí jednotlivých subtypů této kryptosporidie. Kváč et al. (2013b) prokázali, že myši domácí jsou ve východní Evropě parazitovány subtypy patřícími do alelické rodiny IXa, zatímco v západní Evropě subtypy patřícími do rodiny IXb.

Vlci a šakali jsou na rozdíl od lišek sociální zvířata žijící většinou ve smečkách. Jediná zmínka o vyšetření šakalů na přítomnost kryptosporidií pochází z roku 2014 (Razmjoo et al. 2014). V této i předchozí studii nebyly u šakalů nalezeny žádné kryptosporidiové infekce. Lze předpokládat, že v případě většího množství studií a množství vyšetřených vzorků by byly kryptosporidie detekovány i u těchto šelem. Celková prevalence u vlka obecného v této studii byla 3,6 %, což je v souladu s nálezem ze Severní Ameriky (1,2–1,7 %; Stronen et al. 2011, Bryan et al. 2012). Naopak ve dvou studiích v Polsku byla detekována vysoká promořenost populací vlků kryptosporidii v rozmezí 36–55 % (Kloch et al. 2005, Paziewska et al. 2007). V souladu s nálezy ze Severní Ameriky jsme u vlka obecného detekovali *C. canis* (Stronen et al. 2011, Bryan et al. 2012). Vzhledem k úzké hostitelské specifitě tohoto druhu lze předpokládat, že se u tohoto konkrétního jedince probíhala aktivní infekce.

V této práci jsme jako první popsali výskyt *C. ubiquitum* u vlka obecného. Na základě dosavadních studií je předpokládáno, že jednotlivé alelické rodiny v rámci *C. ubiquitum* jsou hostitelsky specifické. Zatímco XIIa bylo převážně detekováno u hospodářsky významných přežvýkavců po celém světě, XIIb–XII d byly detekovány u hlodavců v USA a u volně žijících přežvýkavců v Evropě. Alelické rodiny XIIe a XII f byly nalezeny pouze u hlodavců na Slovensku (Fayer et al. 2010, Li et al. 2014, Kotková et al. 2016). Analýzou gp60 byla prokázána příslušnost izolátu získaného v této práci k alelické rodině XII d. Vzhledem k tomu, že kořisti vlků mohou být jak jeleni, tak menší hlodavci a také s ohledem na fakt, že *C. ubiquitum* je druh s širokou hostitelskou specifitou, nelze vyloučit ani mechanickou pasáž oocyst, ani aktivní infekci.

Potrava většiny medvědů se skládá z masa různých obratlovců, hmyzu a rostlinného materiálu. Medvědi jsou z pohledu kryptosporidiových infekcí málo studovanou skupinou obratlovců. Řada popisů pochází od medvědů držených v zajetí (Wang et Liew 1990, Siam et al. 1994, Liu et al. 2013). Na základě molekulárních analýz bylo prokázáno, že medvědi jsou pravděpodobně parazitováni dvěma hostitelsky specifickými genotypy kryptosporidií (*Cryptosporidium* giant panda genotype a dog genotype) (Xiao et al. 2000, Liu et al. 2013). V naší práci byl u medvěda hnědého detekován druh *C. galli*. Shodně s nálezem u lišky obecné se domníváme, že přítomnost specifické DNA této kryptosporidie specifické pro ptáky je důsledkem mechanického transportu zažívacím traktem medvěda.

Člověk je primárně infikován druhy *C. parvum* a *C. hominis*, ostatní druhy a genotypy kryptosporidií se u lidí vyskytují méně často až ojediněle (Cacciò et al. 2005). Přestože *C. canis* patří mezi pět nejčastějších kryptosporidií infikujících člověka (Fayer et al. 2001, Xiao et al. 2001), nepředstavují volně žijící psi, vlci, šakali a lišky zdroj infekce pro člověka.

## 7. Závěr

- Byly detekovány tři pro šelmy hostitelsky nescifické druhy kryptosporidií - *C. tyzzeri*, *C. andersoni* a *C. galli*.
- Subtypizace *C. tyzzeri* na genu kódujícím gp60 prokázala příslušnost k alelické rodině IXaA8.
- U vlka obecného byl detekován hostitelsky specifický druh *C. canis*.
- U vlka obecného byl poprvé popsán druh *C. ubiquitum* subtyp XIId.
- Detekovaná DNA kryptosporidií pravděpodobně pochází z hostitelů, kteří jsou kořistí jednotlivých predátorů.
- Volně žijící psovitě a medvědovitě šelmy nepředstavují potenciální zdroj kryptosporidií pro člověka a jím chovaná zvířata.



## 8. Literatura

- Abe N., Kimata I., Iseki M. (2002a):** Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64: 165–168.
- Abe N., Sawano Y., Yamada K., Kimata I., Iseki M. (2002b):** *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. *Veterinary Parasitology*, 108: 185–193.
- Abou-Eisha A.M., Abdel-Aal A.A. (1995):** Prevalence of some zoonotic parasites in dog faecal deposits in Ismailia city. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 33: 119–126.
- Abrahamsen M.S., Templeton T.J., Enomoto S., Abrahante J.E., Zhu G., Lancto C.A., Deng M., Liu C., Widmer G., Tzipori S., Buck G.A., Xu P., Bankier A.T., Dear P.H., Konfortov B.A., Spriggs H.F., Iyer L., Anantharaman V., Aravind L., Kapur V. (2004):** Complete genome sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, 304: 441–445.
- Adamu H., Petros B., Zhang G., Kassa H., Amer S., Ye J., Feng Y., Xiao L. (2014):** Distribution and Clinical Manifestations of *Cryptosporidium* Species and Subtypes in HIV/AIDS Patients in Ethiopia. *PLOS Neglected Tropical Disease*, 8: e2831.
- Aldeyarbi H. M., Karanis P. (2016):** Electron microscopic observation of the early stages of *Cryptosporidium parvum* asexual multiplication and development in in vitro axenic culture. *European Journal of Protistology*, 52: 36–44.
- Alvarez-Pellietro P., Sitja-Bobadilla A. (2002):** *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*, 32: 1007–1021.

- Alvarez-Pellitero P., Quiroga M. I., Sitjà-Bobadilla A., Redondo M. J., Palenzuela O., Padrós F., Vázquez S., Nieto J. M. (2004):** *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62: 133–145.
- Armon R., Gold D., Zuckerman U., Kurzbaum E. (2016):** Environmental Aspects of *Cryptosporidium*. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 3: 1048.
- Beiromvand M., Akhlaghi L., Fattahi Massom S.H., Meamar A.R., Motevalian A., Oormazdi H., Razmjou E. (2013):** Prevalence of zoonotic intestinal parasites in domestic and stray dogs in a rural area of Iran. *Preventive Veterinary Medicine*, 109: 162–167.
- Bryan H.M., Darimont C.T., Hill J.E., Paquet P.C., Thompson R.C.A., Wagner B., Smiths J.E.G. (2012):** Seasonal and biogeographical patterns of gastrointestinal parasites in large carnivores: wolves in a coastal archipelago. *Parasitology*, 139: 781–790.
- Bugg, R.J., Robertson, I.D., Elliot, A.D., Thompson, R.C.A. (1999):** Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. *The Veterinary Journal*, 157: 295–301.
- Cacciò S. M., Chalmers R. M. (2016):** Human cryptosporidiosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 22: 471–480.
- Carey C.M., Lee H., Trevors J.T. (2003):** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, 38: 818–862.
- Causapé A.C., Quílez J., Sánchez-Acedo C., del Cacho E. (1996):** Prevalence of intestinal parasites, including *Cryptosporidium parvum*, in dogs in Zaragoza city, Spain. *Veterinary Parasitology*, 67: 161–167.
- Chalmers R.M., Davies A.P. (2010):** Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124: 138–146.

- Chen XM, Keithly J.S., Paya C.V., LaRusso N.F. (2002):** Cryptosporidiosis. The New England Journal of Medicine, 346: 1723–1731.
- Chrisp C.E., Suckow M.A., Fayer R., Arrowood M.J., Healey M.C., Sterling C.R. (1992):** Comparison of the host ranges and antigenicity of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium wrairi* from guinea pigs. Journal of Protozoology, 39: 406–409.
- Cirak V.Y., Bauer C. (2004):** Comparison of conventional coproscopical methods and commercial coproantigen ELISA kits for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dogs and cats. Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 117: 410–413.
- Clode Peta L., Koh Wan H., Thompson R.C.A. (2015):** Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*? Trends in Parasitology, 31: 614–624.
- Collinet-Adler S., Ward H.D. (2010):** Cryptosporidiosis: Environmental, therapeutic, and preventive challenges. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 29: 927–935.
- Čondlová Š., Horčíčková M., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R., Stanko M., McEvoy J., Kváč M. (2018):** *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. European Journal of Protistology, 63: 1–12.
- Crawshaw G.J., Mehren K.G. (1987):** Cryptosporidiosis in zoo and wild animals, Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsberichtdes 29. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zootiere, Akademie-Verlag, Berlin, Cardiff, pp. 353–362.
- Current W.L., Upton S.J., Haynes T.B. (1986):** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. The Journal of Protozoology, 33: 289–296.
- Current W.L. (1989):** *Cryptosporidium* spp. In: Genta RM, Walzer PD (Eds.) Parasitic infections in the compromised host. Marcel Dekker, New York, pp. 281–341.

- Dado D., Izquierdo F., Vera O., Montoya A., Mateo M., Fenoy S., Galván A. L., García S., García A., Aránguez E., López L., del Águila C., Miró G. (2012):** Detection of zoonotic intestinal parasites in public parks of Spain. Potential epidemiological role of microsporidia. *Zoonoses and Public Health*, 59: 23–28.
- Davidson W.R., Nettles V.F., Hayes L.E., Howerth E.W., Couvillion C.E. (1992):** Diseases diagnosed in grey foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from the southeastern United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 28: 28–35.
- Duncan R.B., Caudell D., Lindsay D.S., Moll H.D. (1999):** Cryptosporidiosis in a black bear in Virginia. *Journal of Wildlife Diseases*, 35: 381–383.
- Ederli B.B., Rodrigues M.F., Carvalho, C.B. (2005):** Oocysts of the genus *Cryptosporidium* in domiciliated dogs from city of Campos dos Goytacazes, the State of Rio de Janeiro. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 14: 129–131.
- Ehsan M.A., Akter M., Ahammed M., Ali M.A., Ahmed M.U. (2016):** Prevalence and clinical importance of *Cryptosporidium* and *Giardia* in human and animals. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 14: 109–122.
- El-Ahraf A., Tacal J.V., Sobih M., Amin M., Lawrence W., Wilcke, B.W. (1991):** Prevalence of cryptosporidiosis in dogs and human beings in San Bernardino County, California. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198: 631–624.
- El-Hohary A.H., Abdel-Latif A.M. (1998):** Zoonotic importance of cryptosporidiosis among some animals at Gharbia Province in Egypt. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 67: 305–307.
- Ellis A. E., Brown C. A., Miller D. L. (2010):** Diagnostic Exercise: Chronic Vomiting in a Dog. *Veterinary Pathology*, 47: 991–993.
- Elmore S.A., Lalonde L.F., Samelius G., Alisauskas R.T., Gajadhar A.A., Jenkins E.J. (2013):** Endoparasites in the feces of arctic foxes in a terrestrial ecosystem in Canada. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2: 90–96.

- Elwin K., Hadfield S.J., Robinson G., Crouch N.D., Chalmers R.M. (2012):** *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *International Journal for Parasitology*, 42: 675–682.
- Epe C., Coati N., Schnieder T. (2004):** Results of parasitological examination of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 111: 243–247.
- Fayer R., Ungar B.L.P. (1986):** *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, 50: 458–483.
- Fayer R., Trout J.M., Xiao L., Morgan U.M., Lai A.A., Dubey J.P. (2001):** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*, 87: 1415–1422.
- Fayer R. (2004):** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126: 37–56.
- Fayer R., Santín M., Xiao L. (2005):** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology*, 91: 624–649.
- Fayer R. (2008):** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.): *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, 2nd ed. Boca Raton, CRC Press, pp. 1–43.
- Fayer R., Santín M., Trout J.M. (2008):** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156: 191–198.
- Fayer R. (2010):** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124: 90–97.
- Figuroa J. (2015):** New records of parasites in free-ranging Andean bears from Peru. *Ursus* 26: 21–27.

- Fontanarrosa M.F., Vezzani D., Basabe J., Eiras D.E. (2006):** An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. *Veterinary Parasitology*, 136: 283–295.
- Gajadhar A.A., Lalonde L.F., Al-Adhami B., Singh B.B., Lobanov V. (2015):** Foodborne apicomplexan protozoa: Coccidia. In: Gajadhar A.A. (Eds.): *Foodborne Parasites in the Food supply web*, pp. 101–147.
- Giangaspero A., Iorio R., Paoletti B., Traversa D., Capelli G. (2006):** Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in central Italy. *Parasitology Research*, 99: 297–299.
- Gong Ch., Cao X.F., Deng L., Li W., Huang X.M., Lan J.Ch., Xiao Q.Ch., Zhong Z.J., Feng F., Zhang Y., Wang W.B., Guo P., Wu K.J., Peng G.N. (2017):** Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in cattle in China: a review. *Parasite*, 24: 1.
- Gracenea M., Gómez M.S., Torres J. (2009):** Prevalence of intestinal parasites in shelter dogs and cats in the metropolitan area of Barcelona (Spain). *Acta Parasitologica*, 54:73–77.
- Graczyk T.K., Cranfield M.R., Fayer R., Anderson M.S. (1996):** Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3234–3237.
- Guindon S., Gascuel O. (2003):** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696–704.
- Hackett T., Lappin M.R. (2003):** Prevalence of enteric pathogens in dogs of North-Central Colorado. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 39: 52–59.
- Hajdušek O., Ditrich O., Šlapeta J. (2004):** Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 122: 183–192.

- Hannes I.S., Gjerde B.K., Forberg T., Robertson L.J. (2007):** Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*, 143: 347–353.
- Hijjawi N.S., Meloni B.P., Ryan U.M., Olson M.E., Thompson R.C.A. (2002):** Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 32: 1719–1726.
- Hijjawi N., Zahedi A., Kazaleh M., Ryan U. (2017):** Prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in paediatric oncology and non-oncology patients with diarrhoea in Jordan. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 55: 127–130.
- Himsworth C.G., Skinner S., Chaban B., Jenkins E., Wagner B.A., Harms N.J., Leighton F.A., Thompson R.C.A., Hill J.E. (2010):** Multiple zoonotic pathogens identified in canine feces collected from a remote Canadian indigenous community. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 338–341.
- Holubová N., Sak B., Horčíčková M., Hlásková L., Květoňová D., Menchaca S., McEvoy J., Kváč M. (2016):** *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Birds. *Parasitology Research*, 115: 2243–2251.
- Hotchkiss E., Thomson S., Wells B., Innes E., Katzer F. (2015):** Update on the role of cryptosporidiosis in calf diarrhoea. *Livestock*, 20: 6.
- Huber F., Bomfim T.C.B., Gomes R.S. (2005):** Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. In dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Veterinary Parasitology*, 130: 69–72.

- Hulverson M.A., Vinayak S., Choi R., Schaefer D.A., Castellanos-Gonzalez A., Vidadala R.S. R., Brooks C.F., Herbert G. T., Betzer D. P., Whitman G. R., Sparks H.N., Arnold S.L.M., Rivas K.L., Barrett L.K., White A.C., Maly D.J., Riggs M.W., Striepen B., Van Voorhis W.C, Ojo K.K. (2017):** Bumped-kinase inhibitors for cryptosporidiosis therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 215: 1275–1284.
- Iseki M. (1979):** *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the Domestic cat. *Japanese Journal of Parasitology*, 28: 285–307.
- Jafri H.S., Moorhead A.R., Reedy T., Dickerson J.W., Wahlquist S.P., Schantz P.M., Bryan R.T. (1993):** Detection of pathogenic protozoa in fecal specimens from urban dwelling dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49: 269.
- Jex A.R., Smith H.V., Monis P.T., Campbell B.E., Gasser R.B. (2008):** *Cryptosporidium* - Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, 26: 304–317.
- Ježková J., Horčíčková M., Hlásková L., Sak B., Květoňová D., Novák J., Hofmannová L., McEvoy J., Kváč M. (2016):** *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium* tortoise genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitologica*, 63: 035.
- Jian F., Qi M., He X., Wang R., Zhang S., Dong H., Zhang L. (2014):** Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in dogs in Henan Province, China. *BMC Veterinary Research*, 10: 26.
- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Krízek J., Modrý D., Šlapeta J. (2008):** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*, 55: 81–94.
- Johnston J., Gasser R.B. (1993):** Copro-parasitological survey of dogs in Southern Victoria. *Australian Veterinary Practitioner*, 23: 127–131.



- Juett B.W., Otero R.B., Bischoff W.H. (1996):** *Cryptosporidium parvum* in the domestic dog population of central Kentucky. *Journal of the Kentucky Academy of Science*, 57: 18–21.
- Jumani R.S., Bessoff K., Love M.S., Miller P., Stebbins E.E., Teixeira J.E., Campbell M.A., Meyers M.J., Zambriski J.A., Nunez V., Woods A.K., McNamara C.W., Huston C.D. (2018):** Novel Piperazine-Based Drug Lead for Cryptosporidiosis from the Medicines for Malaria Venture Open Access Malaria Box. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62: 4.
- Kim J.T., Wee S.H., Lee, C.G. (1998):** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in canine fecal samples by immunofluorescence assay. *Korean Journal of Parasitology*, 36: 147–149.
- Kloch A., Bednarska M., Bajer A. (2005):** Intestinal macro - and microparasites of wolves (*Canis lupus* L.) from North - Eastern Poland recovered by coprological study. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12: 237–245.
- Koh W., Clode P.L., Monis P., Thompson R.C.A. (2013):** Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. *Parasites & Vectors*, 6: 270.
- Kumar D., Sreekrishnan R., Das S.S. (2004):** Cryptosporidiosis in man and animals in Pondicherry. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 74: 261–263.
- Kváč M., Kestránová M., Pinková M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B. (2013a):** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology*, 31: 218–227.
- Kváč M., McEvoy J., Loudová M., Stenger B., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Rašková V., Moriarty E., Rost M., Macholán M., Piálek J. (2013b):** Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *International Journal for Parasitology*, 43: 805–817.
- Kváč M., Hofmannová L., Hlásková L., Květoňová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B. (2014a):** *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology*, 201: 9–17.

- Kváč M., McEvoy J., Stenger B., Clark M., (2014b):** Cryptosporidiosis in other vertebrates. In: Cacciò S.M., Widmer G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. 1st ed. Springer, Wien, pp. 237–326.
- Kváč M., Havrdová N., Hlásková L., Daňková T., Kanděra J., Ježková J., Vítovec J., Sak B., Ortega Y., Xiao L., Modrý D., Chelladurai J.R., Prantlová V., McEvoy J. (2016):** *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of Mammals. PLOS One, 11: e0147090.
- Kváč M., Vlnatá G., Ježková J., Horčíčková M., Konečný R., Hlásková L., McEvoy J., Sak B. (2018):** *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. European Journal of Protistology, 63: 96–104.
- Lallo M.A., Fernandes Bondan E.F. (2006):** Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in institutionalized dogs in the city of São Paulo, Brazil. Revista de Saúde Pública, 40: 120–125.
- Levine N.D. (1980):** Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. Journal of Parasitology, 66: 830–834.
- Levine N.D. (1988):** Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. The Journal of Protozoology, 35: 518–520.
- Li N., Xiao L., Alderisio K., Elwin K., Cebelinski E., Chalmers R., Santín M., Fayer R., Kváč M., Ryan U., Sak B., Stanko M., Guo Y., Wang L., Zhang L., Cai J., Roelling D., Feng Y. (2014):** Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a Zoonotic Pathogen Emerging in Humans. Emerging Infectious Diseases, 20: 217–224.
- Li X., Pereira M., Larsen R., Xiao C., Phillips R., Striby K., McCowan B., Atwill E.R. (2015):** *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 4: 343–350.
- Lindsay D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R., Blagburn B.L. (2000):** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 47: 91–95.

- Liu X., He T., Zhong Z., Zhang H., Wang R., Dong H., Wang Ch., Li D., Deng J., Peng G., Zhang L. (2013):** A new genotype of *Cryptosporidium* from giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) in China. *Parasitology International*, 62: 454–458.
- Love M.S., Beasley F.C., Jumani R.S., Wright T.M., Chatterjee A.K., Huston C.D., Schultz P.G., McNamara C.W. (2017):** A high-throughput phenotypic screen identifies clofazimine as a potential treatment for cryptosporidiosis. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 11: e0005373.
- Lupo P.J., Langer-Curry R.C., Robinson M., Okhuysen P.C., Chappell C.L. (2008):** *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 917–921.
- MacKenzie W.R., Hoxie N.J., Proctor, M.E., Gradus M.S., Blair K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addiss D.G., Fox K.R., Rose J.B., Davis J.P. (1994):** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine* 331: 161–167.
- Mandarino-Pereira A., de Souza F.S., Lopes C.W., Pereira M.J. (2010):** Prevalence of parasites in soil and dog feces according to diagnostic tests. *Veterinary Parasitology*, 170: 176–181.
- McKenzie E., Riehl J., Banse H., Kass P.H., Nelson S., Marks S.L. (2010):** Prevalence of diarrhea and enteropathogens in racing sled dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24: 97–103.
- Melicherová J., Ilgová J., Kváč M., Sak B., Koudela B., Valigurová A. (2013):** Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitisation. *Parasitology* 141, 287–303.
- Miller D.L., Liggett A., Radi Z.A., Branch L.O. (2003):** Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy. *Veterinary Parasitology*, 115: 199–204.
- Milstein T.C., Goldsmid J.M. (1995):** The presence of *Giardia* and other zoonotic parasites of urban dogs in Hobart, Tasmania. *Australian Veterinary Journal*, 72: 154–155.

- Mirzaei M. (2012):** Epidemiological survey of *Cryptosporidium* spp. in companion and stray dogs in Kerman, Iran. *Veterinaria Italiana*, 48: 291–296.
- Morada M., Lee S., Gunther-Cummins L., Weiss L.M., Widmer G., Tzipori S., Yarlett N. (2016):** Continuous culture of *Cryptosporidium parvum* using hollow fiber technology. *International Journal for Parasitology*, 46: 21–29.
- Morgan U.M., Xiao L., Monis P., Irwin P.J., Fayer R., Fall A., Denholm K.M., Limor J., Lal A.A., Thompson R.C.A. (2000):** *Cryptosporidium* in domestic dogs: the dog genotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2220–2223.
- Morgan-Ryan U. M., Fall A., Ward L. A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R. C. A., Olson M., Lal A., Xuoc L. (2002):** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49: 433–440.
- Mundim M.J.S., Rosa L.A.G., Hortncio S.M., Faria E.S.M., Rodrigues R.M., Cury M.C. (2006):** Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 144: 356–359.
- Nagano Y., Finn M.B., Lowery C.J., Murphy T., Moriarty J., Power E., Toolan D., O’Loughlin A., Watabe1 M., McCorry K.A., Crothers E., Dooley J.S.G., Rao J.R., Rooney P.J., Millar B.C., Matsuda M., Elborn J.S., Moore J.E., (2007):** Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and bacterial pathogens in faecal material in the red fox (*Vulpes vulpes*) population. *Veterinary Research Communications*, 31: 559–564.
- Nagy B. (1995):** Epidemiologic data on *Cryptosporidium parvum* infection of mammalian domestic animals in Hungary. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 50: 139–144.
- Nakamura A.A., Meireles M.V. (2015):** *Cryptosporidium* infections in birds - a review. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 24: 253–267.
- O’Connor R.M., Shaffiea R., Kangb G., Warda H.D. (2011):** Cryptosporidiosis in patients with HIV/AIDS. *AIDS*, 25: 549–560.

- Onac D., Oltean M., Mircean V., Jarca A., Cozma V. (2015):** Occurrence of *Giardia duodenalis* zoonotic assemblages in red foxes from Romania. *Scientia Parasitologica*, 16: 177–180.
- Osman M., Bories J., El Safadi D., Poirel M.T., Gantois N., Benamrouz-Vanneste S., Delhaes L., Hugonnard M., Certad G., Zenner L., Viscogliosi E. (2015):** Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Veterinary Parasitology*, 214: 167–170.
- Otrantoa D., Cantacessib C., Pfefferc M., Dantas-Torresa F., Briantie E., Deplazesf P., Genchig C., Gubertih V., Capelli G. (2015):** The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part I: Protozoa and tick-borne agents. *Veterinary Parasitology*, 213: 12–23.
- Overgaauw P.A., van Zutphen L., Hoek D., Yaya F.O., Roelfsema J., Pinelli E., van Knapen F., Kortbeekc M. L. (2009):** Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 163: 115–122.
- Panciera R., Thomassen R., Gamer F. (1971):** Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, 8: 479–484.
- Paperna I., Vilenkin M. (1996):** Cryptosporidiosis in the gourami *Trichogaster leeri*: description of a new species and a proposal for a new genus, *Piscicryptosporidium*, for species infecting fish. *Disease of Aquatic Organisms*, 27: 95–101.
- Pavlásek I., Ryan U. (2008):** *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. *Experimental Parasitology*, 118: 434–437.
- Paziewska A., Bednarska M., Nieweglowski H., Karbowski G., Bajer A. (2007):** Distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in selected species of protected and game mammals from North-Eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 14: 265–270.
- Pohjola S. (1984):** Survey of cryptosporidiosis in feces of normal healthy dogs. *Nordisk Veterinaermedicin*, 36: 189–190.

- Ponce de León, P., Zdero, M., Nocito, I. (1994):** Investigación de *Cryptosporidium* sp. En heces de perro, en la ciudad de Rosario, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 28: 575–578.
- Power M.L., Ryan U.M. (2008):** A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *Journal of Parasitology*, 94: 1114–1117.
- Prediger J., Hořčíčková M., Hofmannová L., Saka., Ferrarid N., Vittoria M., Mazzamutoe M.V., Romeo C., Wauterse A. L., McEvoy J., Kváč M. (2017):** Native and introduced squirrels in Italy host different *Cryptosporidium* spp. *European Journal of Protistology*, 61: 64–75.
- Ramirez N.E., Ward L. A., Sreevatsan S. (2004):** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, 6: 773–785.
- Ravaszová P., Halánová M., Goldová M., Valenčáková A., Malčecová B., Hurníková Z., Halan M. (2012):** Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in red foxes and brown bear in the Slovak Republic. *Parasitology Research*, 110: 469–471.
- Razmjoo M., Bahrami A. M., Shamsollahi M. (2014):** Seroepidemiological survey of important parasitic infections of wild carnivores. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2: 783–792.
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning C., Jian F., Wang R., Lv C., Wang Q., Arrowood M.J., Xiao L. (2012):** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, 130: 274–281.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S.J., Katzer F., Bartley P.M., Hunter P.R., Nath M., Innes E.A., Chalmers R.M. (2010):** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, 40: 1539–1548.

- Ryan U. M., Xiao L., Read C., Sulaiman I. M., Monist P., Lal A. A., Fayert R., Pavlasek I. (2003):** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology*, 89: 809–813.
- Ryan U.M., Monis P., Enemark H.L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R.C., Xiao L. (2004):** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*, 90: 769–773.
- Ryan U.M., Power M., Xiao L. (2008):** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55: 22–26.
- Ryan U.M., Xiao L. (2014):** Taxonomy and molecular taxonomy. In: Cacciò S.M., Widmer G. (Eds.): *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer. New York. pp. 1–22.
- Ryan U., Fayer R., Xiao L. (2014):** *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* 141, 1667–1685.
- Ryan U., Hijjawi N. (2015):** New developments in *Cryptosporidium* research. *International Journal for Parasitology*, 45: 367–373.
- Ryan U.M., Papparini A., Tonq K., Yanq R., Gibson-Kueh S., O’Hara A., Lymbery A., Xiao L. (2015):** *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*, 150: 31–35.
- Santín M., Trout J. (2008):** Companion Animals. In: Fayer R., Xiao L (Eds.): *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, 2nd ed. pp 437–444.
- Satoh M., Matsubara-Nihei Y., Sasaki T., Nakai Y. (2006):** Characterization of *Cryptosporidium canis* isolated in Japan. *Parasitology Research*, 99: 746–748.

- Schaefer D.A., Betzer D.P., Smith K.D., Millman Z.G., Michalski H.C., Menchaca S.E., Zambriski J. A., Ojo K.K., Hulverson M.A., Arnold S. L.M., Rivas K.L., Vidadala R.S.R., Huang W., Barrett L.K., Maly D.J., Fan E., Van Voorhis W.C., Riggs M.W. (2016):** Novel bumped kinase inhibitors are safe and effective therapeutics in the calf clinical model for cryptosporidiosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 214: 1856–1864.
- Scorza A.V., Duncan C., Miles L., Lappin M.R. (2011):** Prevalence of selected zoonotic and vectorborne agents in dogs and cats in Costa Rica. *Veterinary Parasitology*, 183: 178–183.
- Shahiduzzaman Md., Dausgies A. (2012):** Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Veterinary Parasitology*, 188: 203–214.
- Shukla R., Giraldo P., Kraliz A., Finnigan M., Sanchez A.L. (2006):** *Cryptosporidium* spp. and other zoonotic enteric parasites in a sample of domestic dogs and cats in the Niagara region of Ontario. *Canadian Veterinary Journal*, 47: 1179–1184.
- Siam M.A., Salem G.H., Ghoneim N.H., Michael S.A., El-Refay M.A.H. (1994):** Public health importance of enteric parasitosis in captive carnivora. *Assiut Veterinary Medicine Journal*, 32: 132–140.
- Simpson J.W., Burnie A.G., Miles R.S., Scott J.L., Lindsay D.I. (1988):** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* infection in dogs in Edinburgh. *Veterinary Record*, 123: 445.
- Slavin D. (1955):** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 65: 262–270.
- Soriano S.V., Pierangeli N.B., Roccia I., Bergagna H.F., Lazzarini L.E., Celescinco A., Saiz M.S., Contreras P.A., Arias C., Basualdo J.A. (2010):** A wide diversity of zoonotic intestinal parasites infects urban and rural dogs in Neuquen, Patagonia, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 167: 81–85.



- Stenger B.L., Clark M.E., Kváč M., Khan E., Giddings C.W., Prediger J., McEvoy J.M. (2015):** North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 36: 287–293.
- Stratakos A., Sima F., Ward P., Linton M., Kelly C., Pinkerton L., Stef L., Pet I., Iancu T., Pircalabioru G., Corcionivoschi N. (2017):** The *in vitro* and *ex vivo* effect of Auranta in preventing *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* infection. *Gut Pathogens* 9: 49.
- Stronen A.V., Sallows T., Forbes G.J., Wagner B., Paquet P.C. (2011):** Diseases and parasites in wolves of the riding mountain National Park region, Manitoba, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 47: 222–227.
- Sturdee A.P., Chalmers R.M., Bull S.A. (1999):** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Veterinary Parasitology*, 80: 273–280.
- Sulaiman I.M., Morgan U.M., Thompson R.C. Lal A.A., Xiao L. (2000):** Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2385–2391.
- Sulaiman I.M., Lal A.A., Xiao L. (2002):** Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *The Journal of Protozoology*, 88: 388–394.
- Svobodová V., Konvalinová J., Svobodová M. (1994):** Coprological and serological findings in dogs and cats with giardiasis and cryptosporidiosis. *Acta Veterinaria Brno*, 63: 257–262.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. (2013):** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.

- Thomas J.L., Pintar K.D.M., Wallis P.M., Neumann N.F. (2016):** Using host-specificity of *Cryptosporidium* to understand contaminant sources, seasonality, and human health risk in three watersheds of differing land-use. *Journal of Environmental Protection*, 7: 372–381.
- Thompson R.C.A., Colwell D.D., Shury T., Appelbee A.J., Read C., Njiru Z., Olson M.E. (2009):** The molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in coyotes from Alberta, Canada, and observations on some cohabiting parasites. *Veterinary Parasitology*, 159: 167–170.
- Tomanová V. (2017):** Přítomnost specifické DNA a koproantigenu kryptosporidií jako indikátor probíhající infekce. [Diplomová práce] 53 s. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra zootechnických věd.
- Trout J.M., Santín M., Fayer R. (2006):** *Giardia* and *Cryptosporidium* species and genotypes in coyotes (*Canis latrans*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 37: 141–144.
- Tupler T., Levy J.K., Sabshin S.J., Tucker S.J., Greiner E.C., Leutenegger C.M. (2012):** Enteropathogens identified in dogs entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241: 338–343.
- Tyzzer 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.
- Tyzzer E.E. (1910):** An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of Medical Research*, 23: 394–414.
- Tyzzer E.E. (1912):** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv fur Protistenkunde*, 26: 394–412.
- Tzipory S., Campbell I. (1981):** Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. *Journal of Clinical Microbiology*, 14: 455–456.
- Tzipori S., Ward H. (2002):** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4: 1047–1058.

- Uga S., Matsumura T., Ishibashi K., Yoda Y., Yatomi K., Ataoka N. (1989):** Cryptosporidiosis in dogs and cats in Hyogo Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Parasitology*, 38: 139–143.
- Ukwah B. N., Ezeonu I. M., Ezeonu Ch. T., Roellig D., Xiao L. (2017):** *Cryptosporidium* species and subtypes in diarrheal children and HIV infected persons in Ebonyi and Nsukka, Nigeria. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11: 173–179.
- Vetterling J.M., Takeuchi A., Madden P.A. (1971):** Ultrastructure of *Cryptosporidium wairi* from the guinea pig. *The Journal of Protozoology*, 18: 248–260.
- Wang A., Ruch-Gallie R., Scorza V., Lin P., Lappin M.R. (2012):** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in dog park attending dogs compared to non-dog park attending dogs in one region of Colorado. *Veterinary Parasitology*, 184: 335–340.
- Wang J.S., Liew C.T. (1990):** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in birds in Taiwan. *Taiwan Journal of Veterinary Medicine and Animal Husbandry*, 56: 45–57.
- Widmer G., Sullivan S. (2012):** Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunology*, 34: 61–71.
- Wilson R.B., Holscher M.A., Lyle S.J. (1983):** Cryptosporidiosis in a pup. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183: 1005–1006.
- Xiao L., Morgan U.M., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Thompson R. C. A., Fayer R., Lal A.A. (1999):** Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3386–3391.
- Xiao L., Limor J.R., Sulaiman I.M., Duncan R.B., Lal A.A. (2000):** Molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from a black bear. *Journal of Parasitology*, 86: 1166–1170.

- Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton J.S. (2004a):** *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 72–97.
- Xiao L., Ryan U.M., Graczyk T.K., Limor J., Li L., Kombert M., Junge R., Sulaiman I.M., Zhou L., Arrowood M.J., Koudela B., Modrý D., Lal A.A. (2004b):** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 891–899.
- Xiao L. (2010):** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124: 80–89.
- Yoshiuchi R., Matsubayashi M., Kimata I., Furuya M., Tani H., Sasai K. (2010):** Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. *Veterinary Parasitology*, 174: 313–316.
- Zahedi A., Paparini A., Jian F., Robertson I., Ryan U. (2016):** Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5: 88–109.
- Zhang Xiao-Xuan, Cong W., Ma Jian-Gang, Lou Zhi-Long, Zheng Wen-Bin, Zhao Q., Zhu Xing-Quan (2016):** First report of *Cryptosporidium canis* in farmed Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in China. *Parasites & Vector*, 9: 126.
- Zhou L., Fayer R., Trout J.M., Ryan U.M., Schaefer F.W., 3rd and Xiao L. (2004):** Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 7574–7577.
- Zhu G., Marchewka M.J., Keithly J.S. (2000):** *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology*, 146: 315–321.
- Ziegler P.E., Wade S.E., Schaaf S.L., Stern D.A., Nadareski C.A., Mohammed H.O. (2007):** Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in Southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, 147: 176–184.