

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

Výskyt kryptosporidií u dětí

Bakalářská práce

Autor: Petra Machovcová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Oleg Ditrich CSc.

5. května 2011

Annotation:

The occurrence of cryptosporidia in children

The aim of this thesis was to determine the incidence of unicellular parasites of the genus *Cryptosporidium*, which is the causative agent of cryptosporidiosis in children.

67 stool samples of children at the age of 1-15 were analyzed in this study. Out of it, 4 children were admitted to the infectious ward of the České Budějovice Hospital, Corp. Other samples were taken due to the suspicion of pathogene presence which causes these disorders, mainly abdominal pain, diarrhoea and fever.

The samples were analyzed microscopically with the sedimentation method M.I.F.C., which serves for the intestinal parasite diagnosis, along with the staining method according to Miláček –Vítovec, which is used to prove oocyst cryptosporidia in the stool. They were also analyzed molecularly with the help of PCR.

The cryptosporidia oocysts were not detected in any sample.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Výskyt kryptosporidií u dětí“ vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích

podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce panu Doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za odborné vedení práce, za pomoc a čas, který mi věnoval. Velké poděkování také patří celému kolektivu Laboratoře oportunních parazitů PaÚ BC AV ČR za pomoc při výzkumu. Dále děkuji paní MUDr. Nadě Mallátové a celému kolektivu Laboratoře parazitologie a mykologie, Nemocnice v Českých Budějovicích, a.s. a taktéž panu MUDr. Václavu Chmelíkovi a kolektivu infekčního oddělení Nemocnice v Českých Budějovicích, a.s. za projevenou ochotu a poskytnutí vzorků.

Obsah:

Úvod	7
1. Současný stav	8
1.1. Historie.....	8
1.2. Taxonomie a fylogeneze	9
1.3. Rod <i>Cryptosporidium</i>	9
1.3.1. Vývojový cyklus	10
1.3.2. Kryptosporidióza	11
1.3.3. Druhy rodu <i>Cryptosporidium</i>	13
1.3.3.1. Druhy rodu <i>Cryptosporidium</i> infikující savce	14
1.3.3.1.1. <i>Cryptosporidium muris</i>	14
1.3.3.1.2. <i>Cryptosporidium andersoni</i>	15
1.3.3.1.3. <i>Cryptosporidium parvum</i>	15
1.3.3.1.4. <i>Cryptosporidium canis</i>	17
1.3.3.1.5. <i>Cryptosporidium hominis</i>	17
1.3.3.1.6. <i>Cryptosporidium felis</i>	18
1.3.3.1.7. <i>Cryptosporidium wrairi</i>	18
1.3.3.1.8. <i>Cryptosporidium bovis</i>	18
1.3.4. Přezítí v prostředí a cesty přenosu	19
1.3.4.1. Přenos půdou.....	20
1.3.4.2. Pasáž zažívacím traktem	20
1.3.4.3. Přenos vodou.....	20
1.3.4.4. Přenos jídlem	21
1.3.4.5. Přenos vzduchem	22
1.3.4.6. Přenos sexuální	22
1.3.5. Metody determinace jednotlivých druhů rodu <i>Cryptosporidium</i>	23
1.3.5.1. Infektivita a hostitel	23
1.3.5.2. Morfologie oocyst.....	23

1.3.5.3.	Biochemické rozdíly	23
1.3.5.4.	Molekulární metody	24
2.	Cíle a hypotézy	25
2.1.	Cíl práce	25
2.2.	Hypotézy	25
3.	Metodika	26
3.1.	Charakteristika sledovaného souboru	26
3.2.	Odběr vzorků	28
3.3.	Metody	29
3.3.1.	Mikroskopické metody	29
3.3.1.1.	M.I.F.C.	29
3.3.1.2.	Barvení podle Miláčka-Vítovce (1985)	30
3.3.2.	Molekulární metody	31
3.3.2.1.	Izolace DNA ze vzorku stolice	31
3.3.2.2.	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	33
3.3.2.3.	Gelová elektroforéza	35
4.	Výsledky	37
4.1.	Mikroskopické metody	37
4.1.1.	M.I.F.C.	37
4.1.2.	Barvení podle Miláčka-Vítovce	38
4.2.	Molekulární metody	39
4.2.1.	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	39
5.	Diskuse	40
6.	Závěr	43
7.	Seznam použitých zdrojů	44
8.	Klíčová slova	59
9.	Přílohy	60

Úvod

Cryptosporidium je rod jednobuněčných parazitů s druhy, které infikují ryby, obojživelníky, plazy, ptáky a savce, včetně člověka. Jednotlivé druhy byly popsány na začátku 20. století. Poté byly rozpoznány jako patogeny drůbeže, domácích a volně žijících zvířat. V dnešní době jsou zkoumány jako hrozba veřejného zdraví. Zjištění, že infekční stádia-oocysty-se vyskytují ve volném prostředí, zejména ve vodě kontaminované výkaly infikovaných jedinců obohatilo představy o epidemiologii kryptosporidií. Rozvoj molekulárních metod k identifikaci morfologicky nerozlišitelných druhů pomohl vymezit vztahy mezi druhy parazitů, potenciálními hostiteli a cestami přenosu.

Dříve panoval názor, že existuje pouze jediný druh kryptosporidií, a to *Cryptosporidium parvum*, infikující 155 různých savčích hostitelů, včetně člověka. Dnes je identifikováno několik různých druhů kryptosporidií infikujících různé druhy hostitelů.

1. Současný stav

1.1. Historie

V roce 1907 Ernest Edward Tyzzer jako první popsal fáze životního cyklu jednobuněčného parazita nacházejícího se často v žaludečních žlázách laboratorních myší, které choval. V jejich výkalech také objevil oocysty tohoto parazita. Pojmenoval ho *Cryptosporidium muris*. O tři roky později popsal vše detailněji a navrhl *C. muris* jako nový druh kryptosporidií. V roce 1912 zveřejnil zprávu o pojmenování dalšího nového druhu *C. parvum*, se stádií, která se vyvíjejí ve střevě laboratorních myší a s oocystami menšími než má *C. muris* (Tyzzer 1912). Po těchto zjištěních nebyla rodu *Cryptosporidium* věnována pozornost a to po dobu téměř poloviny století. Roku 1955 byl nalezen další druh, *Cryptosporidium meleagridis* u krůt (Slavin, 1955). V roce 1971 se poprvé zjistilo, že kryptosporidie jsou původci průjemových onemocnění hovězího dobytka (Panciera et al. 1971). Roku 1976 se objevily téměř současně dvě zprávy o kryptosporidioze u lidí s oslabenou imunitou (Nime et al. 1976, Meisel et al. 1976). O necelých 6 let později byla Centrem pro kontrolu nemocí v USA publikována zpráva o 21 mužích z 6 různých měst majících AIDS, kteří onemocněli kryptosporidiózou (Goldfarb et al. 1982). Všechna tato zjištění a objevy vyvolaly obrovský zájem vědců i veřejnosti. V roce 1977 publikoval Brownstein et al. první kompletní zprávu o kryptosporidiích u plazů. Následovaly zprávy popisující kryptosporidiozu u široké škály savců, ptáků i plazů.

Identifikace různých druhů byla založena především na oocystách, jejich velikosti, tvaru a hostitelské citlivosti. Po roce 1990 použitím molekulárních technik došlo k zlepšení určení hostitelské specifity. Později byly popsány další a další druhy kryptosporidií. Přestože ohniska nákazy spojená s pitnou či rekreační vodou byla hlášena již od roku 1980, uznání rodu *Cryptosporidium* jako problému veřejného zdraví přišlo až v roce 1993 s největší zaznamenanou nákazou kryptosporidíí šířenou pitnou vodou v Milwaukee, Wisconsin (MacKenzie et al. 1994).

1.2. Taxonomie a fylogeneze

Taxonomický status kryptosporidií a pojmenování jejich druhů prochází neustále, především díky molekulárním metodám, změnami.

Členové tohoto rodu byli po dlouhou dobu pokládáni za příbuzné kokcidií, parazity zvířat i lidí, nebo dokonce za ně samotné. Navzdory značné morfologické podobnosti v průběhu životního cyklu a přítomnosti specifických mitochondriálních genů (Riordan et al. 1999) nebylo prokázáno, že *C. parvum* má mitochondrii jako pravou organelu (Tetley et al. 1998), jak tomu bylo u klasických kokcidií, ale má pouze silně redukovaný zbytek mitochondrie. Zařazení kryptosporidií mimo kokcidie není vlastně žádnou novinkou, ale jen potvrzením Tyzzerova názoru, který pojmenoval rod podle „nerozlišitelné nebo chybějící spoře v oocystě“ a zdůraznil, že tím se od kokcidií liší, i když je nakonec ke kokcidiím přiřadil.

Molekulární data naznačují, že rod *Cryptosporidium* je více podobný hromadinkám z kmene Apicomplexa (Carreno et al. 1999) a zjištění podobnosti fází životního cyklu tento názor jenom podpořilo (Hijjawi et al. 2002).

Většina popsaných druhů kryptosporidií byla rozlišena jen pomocí odlišných hostitelů, pouze výjimečně se našly rozdíly ve velikosti oocyst, například u *Cryptosporidium felis*. Dnes je obecně platné, že samotná morfologie oocyst není zcela dostačující pro popis druhu rodu *Cryptosporidium*. V dnešní době se nové druhy rozlišují především na základě sekvencí vybraných genů.

1.3. Rod *Cryptosporidium*

Jednobuněční paraziti rodu *Cryptosporidium* jsou řazeny do třídy Cryptosporidiidae a kmene Apicomplexa. Parazitují v gastrointestinálním traktu savců včetně člověka a hospodářských zvířat. Nakažení jedinci vykazují různé klinické příznaky, patogenita kryptosporidií se liší podle druhu parazita, stáří a imunitního stavu hostitele. U mnoha

zvířat nejsou infekce spojeny s klinickými příznaky nebo jsou spojeny s hostitelem omezujícími onemocněními.

U některých zvířat jako třeba u plazů, ale i u lidí, kteří jsou imunosuprimováni, probíhá infekce velmi často chronicky a může skončit i smrtí.

1.3.1. Vývojový cyklus

Všechny druhy rodu *Cryptosporidium* jsou obligátní intracelulární paraziti. Endogenní stádia byla popsána nejpodrobněji u *C. parvum* (O'Donoghue 1995, Fayer et al. 1997). Jediné stádium nacházející se mimo hostitele je stádium oocysty. Vývojový cyklus kryptosporidií má 4 fáze, a to: excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie.

Poté, co je oocysta získána z vnějšího prostředí vhodným hostitelem, uvolňuje čtyři pohyblivé sporozoity, které napadají epiteliální buňky především zažívacího traktu a parazitují v nich. Sporozoiti se uzavřením v parazitoformní vakuole mění v trofozoity.

Trofozoiti prodělávají asexuální proliferaci (merogonie). Výsledkem merogonie jsou u *C. parvum* dva druhy merontů. Meronti I. typu tvoří 6-8 merozoitů, kteří se uvolňují z parazitoformní vakuoly, napadají další epiteliální buňky a nepohlavním množением dávají vznik dalším merontům I. typu. Meronti II. typu obsahují 4 merozoity. Tito meronti se dále nemnoží merogonií, ale v následné gametogonii se transformují v sexuálně reprodukční stádia: samčí mnohojaderné mikrogamonty a samičí jednojaderné makrogamonty.

Mikrogamont se vyvíjí v mikrogametocyt obsahující 14-18 samčích bičíkatých mikrogamet, které oplodní nepohyblivé zralé makrogametocyty vzniklé z makrogamontů. Vzniklá zygota prodělá sporogonii, při níž se v oocystě vytvoří 4 sporozoiti.

V konečné endogenní fázi vznikají dva typy oocyst – rezistentní silnostěnné z 80 % a tenkostěnné z 20 %, které excystují v těle původního hostitele a způsobují autoinfekci. Silnostěnné oocysty, společně s výkaly opouští tělo hostitele a stávají se tak potencionálním zdrojem infekce dalších jedinců (Fayer 1990 et 2004, Sterling et Arrowood 1992).

Podle novějších poznatků trvá celý vývojový cyklus 12-14 hodin (Smith et al. 2005). Starší zdroje uváděly delší časové úseky.

1.3.2. Kryptosporidióza

Onemocnění vyvolané parazity rodu *Cryptosporidium* se projevuje především vodnatým nekrvavým průjmem, bolestmi břicha, nevolností, zvracením, malátností, únavou, zvýšeným pocením, případně teplotou a dokonce i úbytkem váhy (Thompson et al. 2005). Vodnaté průjmy mohou být způsobeny především destrukcí epiteliálních buněk střeva, enterocytů (Sterling et Arrowood 1992). Často dochází k celkové poruše resorpce střeva.

K nákaze dochází fekálně orální cestou, skrze vehikulum, nejčastěji kontaminovanou vodou (Garcia et Bruckner 2005).

V rozvojových zemích se kryptosporidiové infekce vyskytují nejčastěji u dětí mladších 5 let, vrchol výskytu infekcí a průjmů je u dětí mladších 2 let (Bern et al. 2000, Bhattacharya et al. 1997, Newman et al. 1999). V rozvinutých zemích se infekce objevují u dospělých, kteří se nakazí nejčastěji potravinovou či vodní cestou (MacKenzie et al. 1995, Millard et al. 1994, Quiroz et al. 2000). U imunokompromitovaných osob, například u lidí HIV pozitivních (virus lidské získané imunodeficiency), se výskyt a závažnost kryptosporidiózy zvyšuje s poklesem CD4+ lymfocytů, obzvláště pokud počty těchto buněk zprostředkovávajících imunitu klesnou pod 200 buněk v mikrolitru krve (Navin et al. 1999, Pozio et al. 1997, Sorvillo et al. 1998).

Onemocnění u imunokompetentních jedinců je nejčastěji akutní, nedochází k přechodu v chronickou formu, a trvá přibližně deset dnů. Dochází k samovolnému vyléčení. U některých jedinců může infekce proběhnout bez příznaků (Hunter et al. 2004).

U imunodeficitních jedinců bývá onemocnění chronické a nejeví tendenci k samovolnému vyléčení, infekce často diseminuje do dalších orgánů, např. do respiračního traktu, slinivky břišní, močového měchýře a žlučovodů (Current et Garcia 1991). Průběh

onemocnění je závislý na stupni imunodeficitu. U těžkých případů, jako jsou pacienti s AIDS, dochází k těžké dehydrataci a metabolickému rozvratu. Tyto komplikace jsou často příčinou smrti těchto pacientů (O'Donoghue 1995, Manabe et al. 1998, Hunter et Nichols 2002).

Diagnostika kryptosporidiózy spočívá v průkazu oocyst ve výkalech jedince. Využívá se nejčastěji mikroskopického a imunofluorescenčního vyšetření nátěrů stolice. Lze využít i komerčně dostupné imunodiagnostické testy nebo testy molekulární.

Účinná léčba kryptosporidiózy zatím neexistuje (Volf et Horák 2007). Uplatňuje se především podpůrná a symptomatická léčba ke zmírnění následků infekce. U imunokompetentních jedinců se aplikují rehydratační roztoky pro zamezení dehydratace. U imunodeficitních pacientů je situace složitější, i zde se uplatňuje především hydratace a doplňování elektrolytů. Ke zmírnění průjmu lze využít kaolin či pektin (Thompson et al. 2005). Jednou možností léčby imunodeficitních pacientů je imonuterie, podávání hyperimunního kolostra či hyperimunního žloutku. Ta sice oddálí diseminaci, ale samotné onemocnění nevyléčí, je taky finančně náročná a proto se stále moc nepoužívá. Nejlepších výsledků se dosahuje léčbou samotné infekce HIV a to antiretrovirovou léčbou (Zardi et al. 2005). Zajímavou možností léčby je použití laktobacilů při tlumení či dokonce léčbě kryptosporidiózy. Metabolity *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus reuteri* snižují schopnost *C. parvum* a *C. hominis* vyvolat infekci *in vitro* (Glass et al. 2004). Úspěšná léčba kryptosporidiózy pomocí laktobacilů se už podařila (Pickerd et Tuthill 2004).

1.3.3. Druhy rodu *Cryptosporidium*

V současné době je známo asi 23 druhů rodu *Cryptosporidium*, přehled je uveden v Tab. 1.

Tab. 1: Druhy rodu *Cryptosporidium*

Druh	Hostitel	Tkáňová specifická
<i>C. muris</i> Tyzzer, 1910	Savci	Žaludeční tkáň
<i>C. andersoni</i> Lindsay et al., 2000		
<i>C. suis</i> Ryan et al., 2004		
<i>C. galli</i> Pavlásek, 1999	Ptáci	
<i>C. serpentis</i> Levine, 1980	Plazi	
<i>C. fragile</i> Jirků et al., 2008	Obojživelníci	Tkáň střeva
<i>C. parvum</i> Tyzzer, 1912		
<i>C. hominis</i> Morgan-Ryan et al., 2002		
<i>C. wrairi</i> Vetterling et al., 1971		
<i>C. felis</i> Iseki, 1979		
<i>C. canis</i> Fayer et al., 2001		
<i>C. cuniculus</i> Inman et Takeuchi, 1979		
<i>C. bovis</i> Fayer et al., 2005		
<i>C. fayeri</i> Ryan et al., 2008		
<i>C. ubiquitum</i> Fayer et al., 2010		
<i>C. macropodum</i> Power et Ryan, 2008		
<i>C. ryanae</i> Fayer et al., 2008		
<i>C. xiaoi</i> Fayer et Santin, 2009		
<i>C. meleagridis</i> Slavin, 1955	Ptáci a lidé	

<i>C. varanii</i> (Pavlásek et al., 1995) Pavlásek et Ryan 2007	Plazi	
<i>C. molnari</i> Alvarez-Pellitero et Sitja-Bobadilla, 2002	Ryby	
<i>C. scophthalmi</i> Alvarez-Pellitero et al., 2004		
<i>C. baileyi</i> Current et al., 1986	Ptáci	Bursa Fabricii, kloaka

1.3.3.1. Druhy rodu *Cryptosporidium* infikující savce

Savci tvoří největší skupinu zvířat, kteří mohou být infikováni parazity z rodu *Cryptosporidium*, toto tvrzení je ale pravděpodobně důsledkem mnoha studií provedených u této skupiny. Dnes víme, že existuje obrovská biologická i genetická rozmanitost v druzích rodu *Cryptosporidium* infikujících savce. Díky mnoha molekulárním studiím byly objeveny a popsány další nové druhy.

1.3.3.1.1. *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907

Jak bylo uvedeno v kapitole 1.1. *Historie* tento druh byl prvním, který byl popsán. Oocysty měří přibližně 8,4 na 6,3 μm (7,5 až 9,8 na 5,5 až 7,0). Přestože si Tyzzer nebyl jist systematickým zařazením, pojmenoval tohoto parazita *C. muris*. Později byly popsány podrobněji jednotlivé fáze životního cyklu (s měřením, kresbami a fotografiemi) a bylo zjištěno, že všechny formy tohoto parazita se nacházejí ve žlázách v žaludku (Tyzzer 1910). Bylo také zjištěno, že sporozoity způsobují infekci a to platí i pro jiné druhy rodu *Cryptosporidium*, nicméně patologie se zdála být nepatrná (Current et al. 1986). Oocysty byly nalezeny ve výkalech skotu ve Spojených státech (Anderson 1991), Brazílii (Mendes Maia et al. 1995, Pena et al. 1997), Skotsku (Bukhari et Smith 1996) a Japonsku (Kaneta et Nakai 1998), u skotu a velbloudů v Íránu (Nouri 2002). Identifikace druhů nebyla ale

stoprocentní, proto mnoho autorů těchto studií popsalo nalezené parazity jako *Cryptosporidium muris*-like. Nedávné studie ukázaly, že *C. muris* infikuje široké spektrum dalších hostitelů včetně křečků, veverek, sibiřského chipmunka, myšice křovinné, norníka rudého, maryl stepní, rocka damana, horské kozy, makaků a lidí (Dubey et al. 2002, Guyot et al. 2001, Morgan et al. 2000, Torres et al. 2000). Vzhledem k nízké patogenitě není riziko lidských infekcí závažné.

1.3.3.1.2. *Cryptosporidium andersoni* Lindsay et al., 2000

Tento druh infikuje slez skotu a produkuje oocysty morfologicky podobné, ale o něco menší, než oocysty *C. muris* (Lindsay et al. 2000, Guyot et al. 2001). Byl pojmenován podle Bruce Andersona. Oocysty měří 7,4 na 5,5 (6,0 až 8,1 na 5,0 až 6,5) μm s poměrem délky k šířce 1,35. Na rozdíl od oocyst *C. muris*, které byly infekční pro imunokompetentní myši, tyto byly infekční pro kuřata, kozy a skot (Anderson 1991). Dále byly oocysty této kryptosporidie nalezeny také u zubra, velblouda a sviště. Úspěšný přenos oocysty z dobytka na myš byl proveden Pavláskem (Pavlásek 1995). Také se dají experimentálně přenést na pískomily (Koudela et al. 1998). V Japonsku byl objeven takzvaný nový typ *C. andersoni*, který je schopný infikovat pouze SCID (imbrední kmen myši s těžkou imunodeficiencí) myši.

1.3.3.1.3. *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912

Nejčastěji se vyskytující druh u savců. Byl poprvé nalezen u myši. Od *C. muris* se liší menšími oocystami a lokalizací pouze v klcích tenkého střeva. Všechny fáze životního cyklu byly popsány a doplněny fotografiemi a kresbami. Tyzzer poznamenal, že stádia nejsou striktně extracelulární. Starší oocysty mají ovoidní až kuličkový tvar a jejich průměr nepřesahuje 5 μm . Životaschopné oocysty měří 4,5 až 5,4 na 4,2 až 5,0 μm a poměr délky k šířce je 1,16 (Upton et Current 1985), Tilley et al. uvedli trochu jiné rozměry, kde

konečný poměr délky k šířce byl 1,15 μm (Tilley et al. 1990). Tyzzer pozoroval podobné organismy v tenkém střevě králíka. Více než 150 druhů savců bylo rozpoznáno jako hostitelé *C. parvum*. Většina popisů však byla založena pouze na mikroskopii, bez pečlivého morfometrického měření či biologických nebo genetických údajů. Kryptosporidiové genotypy se od sebe liší v sekvenci DNA a také v infekčnosti. Dříve pod tento druh patřily 3 genotypy, *C. hominis* (lidský genotyp), *C. parvum* (genotyp skotu) a *Cryptosporidium canis* (genotyp psi). Tyto genotypy byly později popsány jako samostatné druhy. *Cryptosporidium parvum* je známo jako infekční agens především pro přežvýkavce (skot, ovce, kozy a jeleny) a lidi.

Tento druh se běžně nachází na našem území, nejčastěji v chovech hospodářských zvířat. Častý je především u dětí. Vyskytuje se také v úpravách pitné vody (Dolejš et al. 2000). U lidských dobrovolníků, kteří dostávali tři různé izoláty oocyst *C. parvum*, byla hodnota infekční dávky v rozmezí od 9 po 1024 oocyst (Okhuysen et al. 1999). Při nákaze hraje roli mnoho faktorů, jedním z nich byla už opakovaně prokázána role bezobratlých (Graczyk et al. 1999a, Mathison et Ditrich 1999). Kvůli snadnému experimentálnímu přenosu je *C. parvum* nejlépe prozkoumaným druhem.

V České republice byla provedena pětiletá studie, která zhodnocuje průzkum *C. parvum* enteritid u dětí hospitalizovaných na infekčním oddělení Nemocnice v Českých Budějovicích, a.s. v letech 1992-1996. Bylo zjištěno celkem 34 případů enteritid způsobených tímto druhem. Průměrný věk pacientů byl 31 měsíců, 59 % z nich bylo chlapců. Studie se soustředila na tuto věkovou skupinu, protože nejvíce zajímavých výsledků předchozích studií bylo zaznamenáno u dětí pod 3 roky. Studie srovnávala klinický průběh enteritid způsobených *C. parvum* s těmi způsobenými jinými patogeny nebo neidentifikovanými původci. Všechny děti byly klinicky vyšetřeny při příjmu a poté denně až do propuštění. Výsledkem studie bylo zjištění, že procento průjmů způsobených kryptosporidiiemi u dětí ve věku 0-3 let bylo překvapivě vysoké. Důvod vysoké incidence mohl být výběr pacientů, kteří pocházeli nejčastěji z rodin s nižším socioekonomickým stavem a častěji z vesnického prostředí (Chmelík et al. 1998).

1.3.3.1.4. *Cryptosporidium canis* Fayer et al., 2001

Oocysty tohoto parazita byly nalezeny v psích výkalech po celém světě. Byly morfologicky neodlišitelné od těch *C. parvum* a vlastnily stejné povrchové antigeny. Měří 4,71 až 4,95 μm a poměr délky a šířky je 1,05. Oocysty získané od psa jsou infekční pro telata, skot i člověka, na rozdíl od toho, nejsou infekční pro myši. Byl také nalezen u medvědů. Je známá značná vnitrodruhová variabilita. Genotyp z lidí se liší od genotypu z lišek či psího genotypu. Tento druh představuje pravděpodobně stejně jako *C. parvum* riziko pro všechny jedince.

1.3.3.1.5. *Cryptosporidium hominis* Morgan-Ryan et al., 2002

Tento parazit byl dříve označován jako *C. parvum* lidského genotypu, genotyp H, později na základě molekulárních a biologických rozdílů byl tento druh vymezen jako samostatný. Je morfologicky totožný s *C. parvum*, ale na rozdíl od *C. parvum* je tento druh neinfekční pro myši, krysy, kočky, psy a dobytek (Widmer et al. 2000). Jedna ze studií zjistila, že nákazy *C. parvum* jsou četnější v jarním období a *C. hominis* v pozdním létě a na podzim u pacientů s anamnézou zahraničního cestovního ruchu (McLauchlin et al. 2000). Byla popsána varianta *C. hominis* u opic a to konkrétně u makaka rhesus (Xiao et al. 2002), u jehňat a telat. Experimentální přenos se nezdařil, a to ani v případech laboratorních hlodavců. *Cryptosporidium hominis* je pro člověka značně nebezpečný. Byl identifikován jako původce doposavad té největší epidemie kryptosporidiózy v Milwaukee, USA v roce 1993. Na našem území je ale výskyt vzácný, častěji se vyskytuje na území západní Evropy a USA.

1.3.3.1.6. *Cryptosporidium felis* Iseki, 1979

První zprávy o parazitu rodu *Cryptosporidium* u japonských koček zahrnovaly popis oocyst z výkalů koček. Další nálezy s mnohem podrobnějším popisem pocházejí z Austrálie (Sargent et al. 1998). Oocysty měří běžně 4,5 až 5 μm . Infekce *C. felis* byly zjištěny u koček, skotu a lidí (Mtambo et al. 1996). Míra nebezpečnosti není dosud zcela objasněna, není dostatek údajů.

1.3.3.1.7. *Cryptosporidium wrairi* Vetterling et al., 1971

Druh popsáný z morčat. Infekcí trpěla jen malá morčata (200 až 300g) bez zjevných známek infekce a bez průjmu. Oocysty měří přibližně 5,4 na 4,6 μm . Popsána jsou jak asexuální tak i sexuální stádia životního cyklu, která se získala z čerstvých slizničních stěrů a následně byla vyfotografována.

1.3.3.1.8. *Cryptosporidium bovis* Fayer et al., 2005

Tento druh byl dříve uváděn jako genotyp *C. parvum*, který se nachází u skotu. Oocysty měří 4,76 až 5,35 μm s poměrem délka ku šířce 1,06. Oocysty nejsou infekční pro novorozené myši, a při experimentu nebyly infekční ani pro jehňata mladší než 1 týden. Byly ovšem zjištěny u dvoutýdenních jehňat. V dřívějších studiích byla zjištěna nákaza 79 z 840 telat na 14 mléčných farmách v 7 státech (Santin et al. 2004). Na základě těchto dat je považován tento velmi rozšířený druh, který infikuje především odchovaná telata, za nový druh.

1.3.4. Přežití v prostředí a cesty přenosu

Stádium oocysty obsahuje čtyři sporozoity tvaru banánku a je obklopeno tvrdým ochranným obalem. Oocysty díky tomu zůstávají infekční v chladném, vlhkém prostředí po mnoho měsíců. To jim pomáhá přežívat i v severních klimatických podmínkách, kde teplota vody v řekách, jezerech a rybnících zůstává nízká, ale nad bodem mrazu. Různé laboratorní studie se pokusily zhodnotit účinky chladu, tepla, UV záření, vlhkosti a vysušení na přežití oocyst.

Oocysty *C. parvum* zůstaly po vložení do vody o teplotě 0, 5, 10, 15 a 20°C infekční po 6 měsících skladování, zatímco při teplotě 25 a 30°C byly infekční pouze po 3 měsících skladování a nakonec při teplotě 35°C byly schopny vyvolat infekci pouze po 1 týdnu (Fayer et al. 1998a). Oocysty také přežily dlouhou dobu ve slané vodě, kde zůstaly životaschopné po dobu 35 dnů při teplotě 4°C a ve tmě (Robertson et al. 1992). Infekce způsobené těmito oocystami měly nejvyšší intenzitu při nejnižší salinitě vody, ve které byly oocysty skladovány a zároveň při nejkratší době skladování. Ovšem i za těžších podmínek, jako byla 35 % salinita v 18°C vodě, některé oocysty zůstaly infekční po dobu až 40 dnů (Freire-Santos et al. 1999).

Robertson et al. našli po 2 hodinách expozice na mikroskopickém sklíčku při pokojové teplotě pouze 3 % oocyst schopných života (Robertson et al. 1992). Po delší expozici, nebyly životaschopné žádné oocysty. To jenom dokazuje předešlou domněnku, že vlhkost případně sucho ovlivňuje přežití oocyst.

Lidé mohou získat nákazu kryptosporidii prostřednictvím několika přenosných cest. U dětí a starších lidí, zejména v denních stacionářích a domech pro seniory, hraje cesta přenosu z osoby na osobu pravděpodobně hlavní roli v šíření infekce kryptosporidií (Neill et al. 1996, Tangermann et al. 1991). Ve venkovských oblastech byla cesta přímého přenosu z hospodářských zvířat mnohokrát popsána, ale relativní význam přímého přenosu není zcela jasný (Miron et al. 1991). Četná ohniska kryptosporidie způsobená kontaminovanými potravinami či vodou (pitnou nebo rekreační) byla hlášena v několika

průmyslově vyspělých zemích a studie někdy označují vodu za hlavní cestu přenosu kryptosporidií v oblastech, kde je nemoc endemická (Gallaher et al. 1989, MacKenzie et al. 1994, Nimri et Hijazi 1994, Weinstein et al. 1993). Jeden z hlavních problémů v pochopení přenosu infekce parazity z rodu *Cryptosporidium* je nedostatek morfologických znaků, které by jasně odlišily jednotlivé druhy rodu *Cryptosporidium* (Fall et al. 2003).

1.3.4.1. Přenos půdou

Fekální kontaminace půdy může vést v konečném důsledku ke kontaminaci čerstvých potravin, pitné vody a rekreační vody. Oocysty byly detekovány v různých půdních typech (Anguish et Ghiorse 1997).

1.3.4.2. Pasáž zažívacím traktem

Roli v šíření oocyst kryptosporidií mají ptáci, prostřednictvím ptáků mohou být oocyst šířeny na rozsáhlé oblasti po celém světě (Smith et al. 1993). Například oocysty požití husou kanadskou a kachnou pekingskou prošly jejich trávicím traktem, byly vylučovány trusem po téměř týden a byly schopny vyvolat infekci. Oocysty *C. parvum* byly také nalezeny v trávicím traktu švábů nachytaných v domácnosti, kde dítě trpělo kryptosporidiózou (Zerpa et Huicho 1994).

1.3.4.3. Přenos vodou

V současnosti je nejvíce probádaná tato cesta přenosu kryptosporidií. Pomocí detekčních metod se zkoumá výskyt parazitů rodu *Cryptosporidium* ve všech vodách. Průzkumy povrchových vod v severní Americe vyvrátily předpoklady, že oocysty se nacházejí ve vodách jenom zřídka v izolovaných lokalitách (Rose et al. 1997 et 2002).

Oocysty zde byly nalezeny s koncentrací od 0,1 až 10 000 na 100 litrů vody v 4-100 % případech (Lisle et Rose 1995).

Největší vodou přenášená nákaza kryptosporidiózy byla zaznamenána na jaře roku 1993 v Milwaukee, Wisconsinu. Infekce postihla 403 000 lidí. Vědělo se že původcem je *Cryptosporidium* ale nevědělo se jaký konkrétně druh (MacKenzie et al. 1994). Na základě záznamů z úmrtních listů se po dvou letech zjistilo, že na tuto nákazu zemřelo 54 obyvatel (Hoxie et al. 1997). Pozdější molekulární analýza uložených vzorků stolice ukázala na druh *Cryptosporidium* lidského genotypu (dnes uznáván jako *C. hominis*), což znamená, že zdrojem organismů byly lidské výkaly (Peng et al. 1997). Prakticky všechny nákazy, u kterých byla prokázána jako zdroj pitná voda, byly způsobeny nedostatky v čistírnách vod. Hlavními faktory, které ovlivňují výskyt rodu *Cryptosporidium* v nádržích na pitnou vodu a v povrchových vodách, jsou dešťové srážky a jejich odtoky do těchto nádrží společně s mikrobi (Kistemann et al. 2002), obrovské riziko nastává po povodních.

Velkým problémem jsou také rekreační vody, které jsou často kontaminované fekálním znečištěním od malých dětí, batolat a inkontinentních lidí. I přes dezinfekci a filtraci v bazénech oocysty zůstávají infekčními. Jedinou cestou jako předejít nákaze je řádná osobní hygiena a snaha zamezit fekálnímu znečištění vod (koupací pleny pro děti).

1.3.4.4. Přenos jídlem

Zpráva o přenosu kryptosporidióz jídlem je poměrně málo. Oocysty byly nalezeny v měkkýších lovených v blízkosti kanalizačního vyústění v Honolulu, Havaj (Johnson et al. 1995) a při ústí řeky Chesapeake Bay (Fayer et al. 1998b). Oocysty *C. parvum* byly nalezeny v ústřicích a dalších mlžích z těchto vod (Fayer et al. 1999, Graczyk et al. 1999b). Žádný z těchto nálezů nebyl spojen s epidemií kryptosporidiózy, ale opakované virové onemocnění u lidí, požívajících tyto mořské plody, stojí za povšimnutí, varování a doporučení lepší tepelné úpravy těchto jídel. Oocysty byly také nalezeny na površích čerstvé zeleniny, salátu, ředkviček, rajčat, okurek, mrkve a zelí (Monge et al. 1996).

V příměstských slamech v Limě, Peru byly listy bazalky, koriandru, celer, zelí, pórek a mnoho dalších druhů zeleniny, ovoce a bylinek kontaminovány oocystami *C. parvum*. Zelenina může být kontaminovaná z hnojiv obsahujících výkaly zvířat a člověka, kontaminovanou vodou používanou k omývání či zavlažování, znečištěnými rukama zemědělských pracovníků, ze znečištěných ploch kde je zelenina skladována nebo prodávána (Bier 1991).

Bylo popsáno mnoho hromadných vzplanutí kryptosporidiózy s nákazou jídlem. Pro příklad uvedu několik, jablečnou šťávou v Maine, USA (Millard et al. 1994), kuřecím salátem v Minnesotě (Besser-Wiek et al. 1996), zelenými cibulkami v Spokane, Washington (Quinn et al. 1998) a mnoho dalších.

1.3.4.5. Přenos vzduchem

Ačkoliv nejsou dokázány žádné případy přenosu oocyst vzduchem, existují četné zprávy o vysoké míře kašle u dětí a osob se sníženou imunitou, které trpěly zároveň kryptosporidiózou (Griffiths 1998). Smrtelné případy kryptosporidiózy získané pravděpodobně respirační cestou byly zaznamenány u osob s AIDS, maligním lymfomem či po transplantaci kostní dřeně.

1.3.4.6. Přenos sexuální

K dispozici je série zpráv hodnotící možnost sexuálního přenosu kryptosporidiózy. Data porovnávající HIV/AIDS pacienty, homosexuály a osoby užívající nitrožilně drogy, ukázala vyšší prevalenci kryptosporidióz u homosexuálů, kteří žijí promiskuitně a dochází u nich k přenosu nákazy z tlustého střeva do tlustého střeva (Griffiths 1998).

1.3.5. Metody determinace jednotlivých druhů rodu *Cryptosporidium*

1.3.5.1. Infektivita a hostitel

Infektivita byla používána pro charakterizaci a porovnání různých izolovaných druhů rodu *Cryptosporidium*. Bylo již zveřejněno mnoho kvalitních studií infektivity (Okhuysen et al. 1999 et 2002). Infektivita bývá používána jako dobrý obecný ukazatel citlivosti hostitele a životaschopnosti oocyst. Identifikace hostitele pomáhá rozlišit druhy rodu *Cryptosporidium*. Stanovení spektra hostitelů u jednotlivých druhů *Cryptosporidium* poskytuje velmi užitečnou informaci pro podporu jejich rozlišení.

1.3.5.2. Morfologie oocyst

Oocysty jednotlivých druhů rodu *Cryptosporidium* jsou si velmi podobné, i přesto jejich morfologické měření hraje velkou roli v determinaci těchto druhů. Oocysty *C. felis* jsou oproti ostatním menší a *Cryptosporidium baileyi* jsou naopak oproti ostatním větší. Některé oocysty se snadno odliší od jiných už pouhým porovnáním jejich tvaru, zda jsou ovoidní či kulovité nebo protáhlého tvaru apod. Oocysty žaludečních kryptosporidií si jsou navzájem značně podobné, stejně tomu tak je u střevních kryptosporidií. Každý popis druhu rodu *Cryptosporidium* by měl obsahovat podrobný morfologický popis obvykle 20 až 100 oocyst (délka, šířka a tvar popřípadě poměr délky a šířky). Oocysty se obvykle pozorují pomocí světelné či elektronové mikroskopie (Current et al. 1986, Alvarez-Pellitero et Sitja-Bobadilla 2002).

1.3.5.3. Biochemické rozdíly

Mohou být potenciálně použity jako jediné kritérium při determinaci druhů rodu *Cryptosporidium*. V pokusu určit jak mezidruhové tak i vnitrodruhové rozdíly bylo použito

mnoho metod a analýz jako analýza izoenzymu (Awad-el-Kariem 1996, Awad-el-Kariem et al. 1995 et 1998); dvou-dimenzionální gelová elektroforéza (Mead et al. 1990); značení povrchových bílkovin či sacharidů oocyst a sporozoit (Llovo et al. 1993, Nichols et al. 1991). Rozdíly v elektroforetických profilech bílkovin mezi *C. parvum* a *C. wrairi* silně podpořily identifikaci *C. wrairi* (Tilley et al. 1991). Celkově se ovšem tyto metody ukázaly jako nepraktické, drahé a technicky náročné. Neexistuje žádná záruka, že různé druhy nebudou mít stejné výsledky těchto analýz.

1.3.5.4. Molekulární metody

Nedávné studie odhalily ohromující množství genetické rozmanitosti v rámci rodu *Cryptosporidium*. V posledních letech se genetické rozdíly staly klíčovým prvkem při definování druhů rodu *Cryptosporidium*. Genetické rozdíly korelují s jinými biologickými vlastnostmi, jako je spektrum hostitelů nebo infektivita. K determinaci se používají konkrétní geny, jako například gen malé ribozomální podjednotky ribozomu SSU rRNA označovaný též jako 18S rRNA, gen proteinu stěny oocysty kryptosporidií COWP, gen pro adhesivní protein kryptosporidií příbuzný thrombospondinu TRAP-C1 a další. Genetické znaky hrají významnou roli při vymezení a určování jednotlivých druhů rodu *Cryptosporidium* (Sulaiman et al. 2002 et 2000, Xiao et al. 2000).

2. Cíle a hypotézy

2.1. Cíl práce

Zpracovat literární rešerši o tématu. Vyšetřit reprezentativní vzorek průjmové stolice dětí na kryptosporidie. Nalezené izoláty kryptosporidií genotypizovat a podle zjištěného druhu či genotypu usuzovat na zdroj infekce. Výskyt kryptosporidií dát do souvislosti s věkem, diagnózou a dalšími vlivy.

2.2. Hypotézy

H₁: Na dětských průjmech se podílí převážně *Cryptosporidium parvum*, nejčastější druh na našem území se zoonotickým potenciálem.

H₂: Na dětských průjmech se podílí významně i další druhy kryptosporidií, především *Cryptosporidium hominis*.

3. Metodika

3.1. Charakteristika sledovaného souboru

Sledovaný soubor se skládal z 67 osob (Tab. 2), které nám poskytly vzorky stolice. Z celkového počtu byly 4 vzorky poskytnuty dárci hospitalizovanými na infekčním oddělení nemocnice v Českých Budějovicích a.s., a 63 vzorků nám bylo poskytnuto od dárců prostřednictvím laboratoře parazitologie a mykologie v téže nemocnici.

Pracovali jsme s věkem dárců. Někteří dárci byli opravdu hodně mladí, kolem 1 roka. Jiným bylo kolem 15 let (Tab. 3). Také nás zajímalo pohlaví dárců, 29 bylo dívek a 38 chlapců, což odpovídá 43 % dívek a 57 % chlapců. V neposlední řadě jsme se zajímali o diagnózu výše zmiňovaných dárců stolice (Tab. 4).

Jméno, příjmení a další iniciály pacientů nebyly uváděny.

Tab. 2: Sledovaný soubor (dárce)

Číslo	Věk	Pohlaví	Diagnóza	Číslo	Věk	Pohlaví	Diagnóza
1	5	M	R 104	35	13	M	A 09
2	13	Z	R 104	36	12	M	R 509
3	14	Z	K 219	37	15	Z	R 104
4	7	M	A 08	38	11	Z	L 208
5	11	Z	R 103	39	12	Z	R 104
6	9	M	R 104	40	11	M	R 104
7	9	M	R 104	41	12	Z	R 104
8	10	M	R 104	42	2	M	R 104
9	13	Z	R 104	43	2	M	R 104
10	13	Z	R 104	44	2	M	R 104
11	13	Z	R 104	45	6	Z	R 104
12	14	Z	R 104	46	6	Z	R 104
13	14	Z	R 104	47	7	M	R 10

14	14	Z	R 104	48	10	Z	R 104
15	4	M	D 899	49	10	Z	R 104
16	4	M	D 899	50	9	Z	R 104
17	4	M	D 899	51	9	Z	R 104
18	9	Z	R 509	52	11	M	A 099
19	4	M	R 104	53	11	Z	R 104
20	4	M	L 130	54	12	M	R 104
21	10	M	F 480	55	10	Z	B 80
22	4	M	R 104	56	10	Z	B 80
23	4	M	R 104	57	10	Z	B 80
24	12	M	R 104	58	5	M	K 519
25	10	M	F 480	59	9	Z	J 028
26	12	M	R 10	60	6	Z	R 10
27	12	M	R 10	61	3	M	R 104
28	9	M	F 480	62	1	M	R 509
29	7	M	R 104	63	8	Z	R 10
30	6	M	R 104	64	2	M	A 09
31	6	M	R 104	65	2	M	A 09
32	6	M	R 104	66	2	Z	A 09
33	2	M	R 509	67	1	Z	A 09
34	2	M	R 509				

Zdroj: Vlastní výzkum

Tab. 3: Věková struktura dárců

Věk dárce	Počet	Počet (%)
1 - 3	11	16,4
4 - 6	15	22,4
7 - 9	11	16,4
10 - 12	20	29,9
13 - 15	10	14,9

Zdroj: Vlastní výzkum

Tab. 4: **Diagnóza dárců**

Číslo diagnózy	Diagnóza*	Počet
A 08	Střevní infekce viry a jinými určenými mikroorganismy	1
A 09	Jiná gastroenteritida a kolitida infekčního a NS původu	5
A 099	Gastroenteritida a kolitida nespecifického původu	1
B 80	Enterobióza – enterobiasis	3
D 899	Porucha týkající se mechanismů imunity NS	3
F 480	Neurastenie	3
J 028	Akutní zánět hltanu způsobený jinými určenými organismy	1
K 219	Gastroezofageální reflexní onemocnění bez ezofagitidy	1
K 519	Ulcerózní kolitida NS	1
L 130	Dermatitis herpetiformis	1
L 208	Jiná atopická dermatitida	1
R 10	Břišní a pánevní bolest	5
R 103	Bolest umístěná do jiných míst dolní části břicha	1
R 104	Jiná a neurčená břišní bolest	35
R 509	Horečka NS	5

Zdroj: Vlastní výzkum

* MKN-10 Mezinárodní statistika klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů

3.2. Odběr vzorků

K našemu výzkumu jsme použili vzorky, které byly odebrány do nesterilních nádobek samotnými pacienty a následně zpracovány laboratoří. Po zpracování laboratoří byly tyto vzorky poskytnuty nám k výzkumu. Vzorky z infekčního oddělení byly odebírány přímo od dětí do jednorázových papírových plen.

Vzorky byly transportovány v uzavíratelné, plně dezinfikovatelné nádobě. Nejdelší interval mezi odběrem a zpracováním vzorku byl 7 dní. Vzorky, které nemohly být ihned po odběru zpracovány, byly skladovány při teplotě 5°C.

Jsem si vědoma možného vlivu transportu, skladování a časového intervalu mezi odběrem a zpracováním vzorku na výsledky výzkumu.

3.3. *Metody*

Vzorky byly vyšetřeny koncentrační metodou M.I.F.C., barvicí metodou podle Miláčka-Vítovce a molekulárně genetickou metodou PCR (polymerázová řetězová reakce).

3.3.1. *Mikroskopické metody*

3.3.1.1. *M.I.F.C.*

Tato metoda patří mezi koncentrační (sedimentační) metody a pomocí ní můžeme diagnostikovat parazity ve stolici.

Použité roztoky:

- MIF – 500 ml H₂O, 50 ml 40 % formaldehydu, 400 ml 0,1 % roztoku metriolátu sodného (0,4 g/400 ml 96 % etanolu), 10 ml glycerinu
- Lugolův roztok – 1 g krystalického jodu, 2 g jodidu draselného (KJ), 100 ml H₂O

Postup metody:

- Do zkumavky vložíme vzorek stolice velikosti hrachu.
- Přidáme 5 ml roztoku MIF a 1 ml Lugolova roztoku.
- Vzorek zhomogenizujeme.
- Homogenní směs přefiltrujeme přes gázu.
- Do přefiltrovaného extraktu přidáme 6 ml éteru, zkumavku uzavřeme gumovým špuntem a řádně roztřepeme.
- Centrifugujeme 2 minuty při 1500 ot./min.
- Vzniklý prstenec odstraníme špejlí a vzorek slijeme.

- Sediment usazený na dně zkumavky pozorujeme pod mikroskopem.

K pozorování jsem použila světelný mikroskop OLYMPUS BX 51 při celkovém zvětšení 400x.

3.3.1.2. Barvení podle Miláčka-Vítovce (1985)

Tato metoda slouží k diagnostice oocyst kryptosporidií ve stolici.

Použité roztoky:

- Roztok methylvioleti - 0,6 g methylvioleti, 1 ml anilinu, 1 g alkoholu, 70 ml deionizované vody
- Kyselina sírová – 2 % vodný roztok
- Roztok tartrazinu – 1 % roztok tartrazinu v 1 % kyselině octové

Postup metody:

- Vzorek stolice rozetřeme na podložní sklo pomocí špejle, vytvoříme rovnoměrný nátěr a necháme zaschnout.
- Fixujeme methanolem v plameni.
- Poté sklíčko se vzorkem barvíme v roztoku methylvioleti po dobu 30 minut.
- Sklíčko opláchneme dostatečně vodou a následně diferencujeme v 2 % kyselině sírové po dobu 2 minut.
- Opět opláchneme vodou.
- Nakonec dobarvíme tartrazinem.
- Sklíčko opláchneme vodou, necháme zaschnout a pozorujeme.

Obarvený preparát na skle jsem pozorovala pod světelným mikroskopem OLYMPUS BX 51 za použití olejového imerzního roztoku při zvětšení 1000x.

3.3.2. Molekulární metody

Molekulární diagnostiku jsem použila na 12 vybraných vzorků (Tab. 5).

Tab. 5: Vybrané vzorky pro diagnostiku pomocí molekulárně genetické metody PCR

Číslo	Věk	Pohlaví	Diagnóza
1	5	M	R 104
15	4	M	D 899
19	4	M	R 104
20	4	M	L 130
22	4	M	R 104
33	2	M	R 509
34	2	M	R 509
42	2	M	R 104
43	2	M	R 104
44	2	M	R 104
61	3	M	R 104
62	1	M	R 509

Zdroj: Vlastní výzkum

3.3.2.1. Izolace DNA ze vzorku stolice

K izolaci DNA ze vzorků jsem použila komerční set PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex). Před samotným procesem, jehož postup popisuji níže, jsem si připravila Proteinase K lyofylizát rozpuštěním přidáním 1,5 ml deionizované vody. Po rozpuštění se Proteinase K lyofylizát skladuje při -20°C. Dále jsem si předem odpipetovala do ependorfký Elution Buffer D (200 µl/1 vzorek) a inkubovala ho při 70°C.

Postup:

- 200-400 mg stolice dáme do Safe-Lock-Tube, přidáme skleněné kuličky o průměru 0,5 mm a 1 ml Lysis Buffer P.
- Materiál v ependorfce rozbijeme v homogenizátoru FastPrep-24 (MP Biomedicals) po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s.
- Inkubujeme 10 minut při 95°C v termostatu. Po inkubaci centrifugujeme 1 minutu při 14 000 ot./min.
- Veškerý supernatant přeneseme pomocí pipety do InviAdsorb-Tube, 15 sekund vortexujeme, 1 minutu inkubujeme při laboratorní teplotě a centrifugujeme 3 minuty při 14 000 ot./min.
- Supernatant opět přepipetujeme do čistých ependorfech a centrifugujeme 3 minuty při 14 000 ot./min.
- Do čistých ependorfech napipetujeme 25 µl Proteinase K a přidáme 400 µl supernatantu, vortexujeme, inkubujeme 10 minut při 70°C.
- Připipetujeme 400 µl Binding Buffer P, vortexujeme.
- Veškerý objem přepipetujeme do Spin Filter + Tube, inkubujeme 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugujeme 1 minutu při 14 000 ot./min.
- Vylijeme odpad z ependorfky, napipetujeme 500 µl Wash I, centrifugujeme 1 minutu při 14 000 ot./min.
- Opět vylijeme odpad z ependorfky, napipetujeme 800 µl Wash II, centrifugujeme 1 minutu při 14 000 ot./min.
- Vylijeme odpad a opět centrifugujeme 3 minuty při 14 000 ot./min.
- Na kolonu dáme čistou ependorfku, napipetujeme 200 µl Elution Buffer D (předehřátého) na kolonu a inkubujeme 3 minuty při laboratorní teplotě.
- Centrifugujeme 1 minutu při 8 500 ot./min.
- Získanou DNA uchováváme při teplotě -20°C.

3.3.2.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí metody PCR jsem pomnožila neboli amplifikovala gen kódující malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) za použití předem navržených primerů (Tab. 6). Všechny reakce byly prováděny v celkovém objemu 20 μ l. Součástí každé reakce byla pozitivní i negativní kontrola. Reakce probíhaly vždy dvakrát a to v primární amplifikaci a sekundární amplifikaci. Pro amplifikaci sekundárního produktu byly použity 3 μ l DNA z primární amplifikace. Amplifikace byly prováděny v thermocycleru MJ Mini-Personal Thermal Cycler (BIO-RAD).

Reakční cyklus začal počáteční denaturací při 94°C po dobu 3 minut, pak následovalo 35 cyklů sestavujících se z denaturace při 94°C po 45 sekund, nasedání primerů (annealing) při 55°C po 45 sekund, syntéza nového řetězce DNA při 72°C po dobu 60 sekund, konečné dosyntetizování (finální extenze) nového řetězce při 72°C trvalo 7 minut. Přehled reagentů je uveden v Tab. 7, Tab. 8 a Tab. 9.

Tab. 6: **Primery**

Primery	Sekvence
<i>Primární PCR</i>	
SSU F1	TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG
SSU R1	CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA
<i>Sekundární PCR</i>	
SSU F2	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG
SSU R2	CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A
<i>Zdroj: Vlastní výzkum</i>	

Tab. 7: Reagencie pro primární PCR

SSU			
Teplota pro nasedání primerů (°C)			55
Reagencie	Koncentrace	Objem/1 vzorek (μl)	Celkový objem (μl)* = master mix
H ₂ O	-----	11, 30	169, 50
MgCl ₂	25 mM	1, 20	18, 00
10Xbuffer	-----	2, 00	30, 00
dNTP	10 mM	0, 40	6, 00
Forward	10 μM	0, 40	6, 00
Reverse	10 μM	0, 40	6, 00
BSA	10 mg/ml	0, 80	12, 00
Taq	1 U/1 μl	0, 50	7, 50
DNA	-----	3, 00	45, 00
celkem		20, 00	300, 00

Zdroj: Vlastní výzkum *Byl přepočtem na 15 vzorků, pro případné opakování z důvodu chybného pipetování.

Tab. 8: Reagencie pro sekundární PCR

SSU			
Teplota pro nasedání primerů (°C)			55
Reagencie	Koncentrace	Objem/1 vzorek (μl)	Celkový objem (μl)* = master mix
H ₂ O	-----	12, 10	193, 60
MgCl ₂	25 mM	1, 20	19, 20
10Xbuffer	-----	2, 00	32, 00
dNTP	10 mM	0, 40	6, 40
Forward	10 μM	0, 40	6, 40
Reverse	10 μM	0, 40	6, 40
Taq	1 U/1 μl	0, 50	8, 00
DNA	-----	3, 00	48, 00
celkem		20, 00	320, 00

Zdroj: Vlastní výzkum *Byl přepočtem na 16 vzorků, pro případné opakování z důvodu chybného pipetování.

Tab. 9: Reagencie pro PCR

Zkratka reagentie	Název reagentie
H ₂ O	Deionizovaná PCR voda
MgCl ₂	Chlorid hořečnatý
10Xbuffer	Pufr o přesně definované koncentraci solí a pH
dNTP	Deoxyribonukleotid trifosfát
Forward	Začáteční primer
Reverse	Konečný primer
BSA	Hovězí sérový albumin
Taq	Taq purple DNA polymeráza

Zdroj: Vlastní výzkum

3.3.2.3. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda používaná k rozdělení DNA fragmentů v agaróze podle molekulových hmotností působením elektrického pole.

Použité roztoky:

- 50x TAE pufr
 - 242 g TRIS báze + 47,1 ml ledové kyseliny octové + 100 ml 9,5 M EDTA
- Agaróza
- Ethidium bromid
- 100 bp DNA ladder

Postup:

- Agarózu smícháme s 1x TAE a rozpustíme v mikrovlnné troubě.
- Vzniklý roztok zchladíme přibližně na 40°C a přidáme ethidium bromid tak, aby jeho koncentrace v gelu byla 0,5 µg/ml.
- Vzniklou směs nalijeme do předem připraveného nosiče s vloženým hřebem a necháme ztuhnout.

- Ztuhlý gel vložíme do elektroforetického tanku a zalijeme pufrům (1x TAE).
- Do jamek po hřebenu nanese me vzorky z PCR.
- Provedeme elektroforézu při 70 V po dobu nezbytně nutnou k separaci sledovaných fragmentů.
- Provedeme detekci fragmentů na UV transiluminátoru při vlnové délce 302 nm.

Výsledek byl zaznamenán pomocí kamery do počítače.

4. Výsledky

4.1. Mikroskopické metody

4.1.1.M.I.F.C.

Pomocí koncentrační metody M.I.F.C. nebyli ve stolici žádného z 67 vzorků nalezeni žádní mnohobuněční či jednobuněční paraziti (Tab. 10).

Tab. 10: Výsledky vyšetření vzorků stolice pomocí metody M.I.F.C.

Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení
1	-	24	-	47	-
2	-	25	-	48	-
3	-	26	-	49	-
4	-	27	-	50	-
5	-	28	-	51	-
6	-	29	-	52	-
7	-	30	-	53	-
8	-	31	-	54	-
9	-	32	-	55	-
10	-	33	-	56	-
11	-	34	-	57	-
12	-	35	-	58	-
13	-	36	-	59	-
14	-	37	-	60	-
15	-	38	-	61	-
16	-	39	-	62	-
17	-	40	-	63	-
18	-	41	-	64	-

19	-	42	-	65	-
20	-	43	-	66	-
21	-	44	-	67	-
22	-	45	-		
23	-	46	-		

Zdroj: Vlastní výzkum

4.1.2.Barvení podle Miláčka-Vítovce

Pomocí této barvicí metody nebyla zjištěna přítomnost oocyst kryptosporidií v žádném ze vzorků stejně jako v předchozím případě (Tab. 11).

Tab. 11: Výsledky vyšetření vzorků stolice pomocí barvicí metody Miláček-Vítovec

Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení
1	-	24	-	47	-
2	-	25	-	48	-
3	-	26	-	49	-
4	-	27	-	50	-
5	-	28	-	51	-
6	-	29	-	52	-
7	-	30	-	53	-
8	-	31	-	54	-
9	-	32	-	55	-
10	-	33	-	56	-
11	-	34	-	57	-
12	-	35	-	58	-
13	-	36	-	59	-
14	-	37	-	60	-
15	-	38	-	61	-

16	-	39	-	62	-
17	-	40	-	63	-
18	-	41	-	64	-
19	-	42	-	65	-
20	-	43	-	66	-
21	-	44	-	67	-
22	-	45	-		
23	-	46	-		

Zdroj: Vlastní výzkum

4.2. Molekulární metody

4.2.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Využitím této metody, která umožňuje detekovat DNA parazita přítomného ve stolici a byla použita na 12 vybraných vzorků, jsme opět nezískali žádný pozitivní výsledek (Tab. 12).

Tab. 12: Výsledky vyšetření vzorků stolice pomocí metody PCR

Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení
1	-	22	-	43	-
15	-	33	-	44	-
19	-	34	-	61	-
20	-	42	-	62	-

Zdroj: Vlastní výzkum

5. Diskuse

Cílem mé práce bylo zjistit, zda se na dětských průjmech podílejí paraziti z rodu *Cryptosporidium*. K detekci parazitů bylo použito několik metod. Koncentrační (sedimentační) metoda M.I.F.C., díky které můžeme diagnostikovat parazity ve stolici. Barvicí metoda dle Miláčka-Vítovce, která slouží k diagnostice oocyst kryptosporidií ve stolici. Pro svojí větší citlivost byla použita též molekulární metoda, polymerázová řetězová reakce (PCR). Studie byla provedena v rozsahu 67 vyšetření vzorků stolice. Molekulárně bylo vyšetřeno 12 vybraných vzorků, kvůli potížím v laboratoři (porouchaný beetbeater neumožnil izolaci DNA z většího množství vzorků). Výskyt parazitů z rodu *Cryptosporidium* nebyl prokázán ani v jednom ze vzorků.

Práce Hajdušek et al. 2004 studovala rozmanitost rodu *Cryptosporidium* u různých hostitelů včetně člověka na území České republiky. Vyšetřovány byly oocysty získané ze vzorků vody z vodní nádrže. K určení druhu kryptosporidií byla použita PCR SSU rRNA a identifikace proteinu stěny oocyst kryptosporidií (COWP). Bylo vyšetřeno 26 izolátů, v 19 z nich byly identifikovány oocysty *C. parvum*. Dále byly zjištěny oocysty *C. hominis*, *andersoni*, *meleagridis*, *serpentis*, *baileyi*, *saurophilum* a *felis*. Pomocí COWP, která byla úspěšná u 20 izolátů, byly zjištěny oocysty především *C. parvum*. U dvou izolátů z Velké Británie bylo potvrzeno zjištění *C. hominis* a *C. meleagridis* na základě sekvence genů. Analýzy ukázaly velkou rozmanitost druhů rodu *Cryptosporidium* v tomto regionu. Převažovala však *C. parvum* bovinního genotypu a byla identifikována jako hlavní příčina lidských infekcí u nás.

Ukázalo se tedy, že na našem území u dětí převládají infekce *C. parvum* na rozdíl od jiných oblastí, kde převažuje *C. hominis* (Hajdušek et al. 2004).

Xiao et al. našli 5 druhů rodu *Cryptosporidium* u dětí v Limě, Peru a zjistili převahu *C. parvum* lidského genotypu (*C. hominis*). V 67 případech z 85 vyšetřených vzorků. Identifikace tohoto druhu byla prováděna pomocí genotypové analýzy RFLP a SSU rRNA

genotypizace. Dále byly identifikovány *C. parvum* bovinního genotypu, psího genotypu, *C. meleagridis* a *C. felis* (Xiao et al. 2001).

Mor et Tzipori zveřejnili studii provedenou v subsaharské Africe o kryptosporidiózách dětí ve věku 6-36 měsíců. Opět zde převažovala infekce *C. hominis*. Děti byly často podvyživené a velké procento jich bylo HIV pozitivních. Toto zjištění lze také přikládat špatným hygienickým podmínkám (Mor et Tzipori 2008).

O'Brien et al. provedli studii, která se týkala stejného problému jako v předchozích případech. Vyšetřovaly 50 vzorků stolice od dětí s gastrointestinálními problémy a 7 izolátů od telat krmených mlékem. U studie dětí bylo zjištěno *C. hominis* v 41 případech. U všech telat byly zjištěny *C. parvum* (O'Brien et al. 2008).

Infekce *C. hominis* převládá nad *C. parvum* i v dalších regionech, jako například ve Velké Británii (Patel et al. 1998, McLauchlin et al. 2000) nebo na Haiti (Raccurt et al. 2006).

Práce Chmelík et al. 1998 odhalila kryptosporidie jako původce průjmů dětí v nás v České republice. Tato studie byla provedena v letech 1992-1996. V této periodě bylo zjištěno celkem 34 případů *C. parvum* enteritid. Věk pacientů byl v rozsahu 5-93 měsíců, 6 z nich bylo mladších 12 měsíců. 59 % dětí byli chlapci. Ve studii bylo zkoumáno celkově 198 dětí. Všechny děti vykazovaly známky gastrointestinální poruchy převážně s vodnatým průjmem. Původce nebyl zjištěn v 92 případech. Ve 110 izolátech od zbylých 106 pacientů bylo *C. parvum* identifikováno v 11 %. Dalšími identifikovanými patogeny byly rotaviry, *Salmonella*, *Campylobacter*, adenoviry a další. U 12 % dětí nebylo *C. parvum* jediné etiologické agens, ve vzorku byly nalezeny i jiné patogeny, u těchto dětí bylo *C. parvum* zjištěno náhodně a pravděpodobně pouze jako spolupatogen. Patogeny byly identifikovány pomocí parazitologických testů. Byla použita koncentrační (sedimentační) metoda M.I.F.C. a barvení podle Miláčka-Vítovce. Práce je z doby, kdy molekulární charakteristika izolátů ještě nebyla rutinně zavedena a později byly analyzovány pouze některé z nich (Hajdušek et al. 2004). Proto jsme považovali za rozumné se k podobnému souboru pacientů vrátit a získané izoláty molekulárně analyzovat.

Předpokládala jsem, že s použitím PCR přispěji k druhové determinaci dětských kryptosporidiových průjmů a ověřím tím hypotézy o podílení se *C. parvum* a *C. hominis* na dětských průjmech.

Moje studie se zabývala v podstatě stejným souborem pacientů ze stejné spádové oblasti jako studie Chmelíka et al. 1998. Přesto jsem dospěla pouze k negativním výsledkům. Tento negativní náález a rozdíl od předchozí studie by mohl mít několik příčin. V práci Chmelíka et al. 1998 byly vybrány pouze děti s průjmy, já jsem měla za celou dobu sledování průjmových stolic malé procento, i když v mém souboru převažovaly děti s gastrointestinálními potížemi. Další příčinou mého negativního výsledku mohl být nedostatek vzorků, ale přece jen dostatek k tomu, aby byly některé pozitivní, pokud by byla situace stejná jako před 13 lety.

Dalším vysvětlením může být fakt, že klesá prevalence infekčních průjmů obecně. V roce 2005 bylo v České republice hlášeno celkem 72 692 infekčních průjmových onemocnění, z toho více než polovinu tvořily průjmy dětí, nejpostiženější skupinou jsou děti od 1 do 4 let (Ambrožová 2006). V roce 2009 bylo hlášeno celkem 43 592 průjmových onemocnění (Ambrožová 2010). Zřejmě klesá i samotný podíl kryptosporidií jako původců těchto průjmů. Kryptosporidie se na našem území nejčastěji přenášejí prostřednictvím kontaminované vody a to jak pitné, užitkové tak i rekreační. Menší výskyt proto může být vysvětlen i lepší kvalitou pitné vody. Téměř všude v našem regionu byly v posledních letech zavedeny vodovody, a pokud se někde jako pitná využívá voda ze studních často se alespoň dětem podává balená voda. V posledních letech se také více dbá na zlepšení technologií úpravy vody pro vodovodní síť. Pro zamezení šíření kryptosporidií je nejdůležitější kvalitní filtrace vod.

Má studie neprokázala výskyt kryptosporidií u žádného ze sledovaných dětí. Na základě výsledků jiných studií zkoumajících podobné soubory jedinců by bylo jistě na místě provedení rozsáhlejšího výzkumu, zahrnujícího větší počet vzorků.

6. Závěr

I. Ve vyšetřovaném souboru vzorků stolice dětí od 1-15 let nebyly kryptosporidie prokázány ani mikroskopickou ani molekulární technikou.

II. Tento negativní výsledek může být odrazem skutečnosti, že v poslední době dochází především vlivem kvalitní pitné vody k poklesu střevních infekcí obecně, průjmů u dětí obecně a podílu kryptosporidií na průjmech dětí.

7. Seznam použitých zdrojů

1. ALVAREZ-PELLITERO, P., QUIROGA, M. I., SITJA-BOBADILLA, A., REDONDO, M. J., PELENZUELA, O., PADROS, F., VAZQUEZ, S., NIETO, J. M. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis Aquat Organ*, 2004, 62, 133-145.
2. ALVAREZ-PELLITERO, P. et SITJA-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int J Parasitol*, 2002, 32, 1007-1021.
3. AMBROŽOVÁ, H. Průjmová onemocnění z pohledu klinika. *Med Pro Praxi*, 2010, 7, 372-375.
4. AMBROŽOVÁ, H. Infekční průjmy u dětí a jejich léčba. *Pediatr Pro Praxi*, 2006, 3, 154-156.
5. ANDERSON, B. C. Prevalence of *Cryptosporidium muris*-like oocysts among cattle populations of the United States: preliminary report. *J Protozool*, 1991, 38, 14S-15S.
6. ANGUISH, L. J. et GHIORSE, W. C. Computer-Assisted Laser Scanning and Video Microscopy for Analysis of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Soil, Sediment, and Feces. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63, 724-733.
7. AWAD-EL-KARIEM, F. M. Significant parity of different phenotypic and genotypic markers between human and animal strains of *Cryptosporidium parvum*. *J Eukaryot Microbiol*, 1996, 43, 70S.
8. AWAD-EL-KARIEM, F. M., ROBINSON, H. A., DYSON, D. A., EVANS, D., WRIGHT, S., FOX, M. T., McDONALD, V. Differentiation between human and animal strains of *Cryptosporidium parvum* using isoenzyme typing. *Parasitology*, 1995, 110, 129-132.

9. AWAD-EL-KARIEM, F. M., ROBINSON, H. A., PETRY, F., McDONALD, V., EVANS, D., CASEMORE, D. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers. *Parasitol Res*, 1998, 84, 297-301.
10. BERN, C., HERNANDEZ, B., LOPEZ, M. B., ARROWOOD, M. J., DE MERIDA, A. M., KLEIN, R. E. The contrasting epidemiology of Cyclospora and Cryptosporidium among outpatients in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 63, 231-235.
11. BESSER-WIEK, et al. (Centers for Disease Control and Prevention (CDC)). Foodborne outbreak of diarrheal illness associated with *Cryptosporidium parvum*-Minnesota, 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1996, 44, 783-784.
12. BHATTACHARYA, M. K., TEKA, T., FARUQUE, A. S., FUCHS, G. J. *Cryptosporidium* infection in children in urban Bangladesh. *J Trop Pediatr*, 1997, 43, 282-286.
13. BIER, J. W. Isolation of parasites on fruits and vegetables. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1991, 22, 144-145.
14. BROWNSTEIN, D. G., STRANDBERG, J. D., MONTALI, R. J., BUSH, M., FORTNER, J. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. *Vet Pathol*. 1977, 14, 606-617.
15. BUKHARI, Z. et SMITH, H. V. Detection of *Cryptosporidium muris* oocysts in the faeces of adult dairy cattle in Scotland. *Vet Rec*, 1996, 138, 207-208.
16. CARRENO, R. A., MARTEN, D. S., BARTA, J. R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res*, 1999, 85, 899-904.
17. CURRENT, W. L. et GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. *Clin Lab Med*, 1991, 11, 873-897.

18. CURRENT, W. L., UPTON, S. J., HAYNES, T. B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J Protozool*, 1986, 33, 289–296.
19. DOLEJŠ, P., DITRICH, O., MACHULA, L., KALOUSKOVA, N., PUZOVA, G. Occurrence and separation of *Cryptosporidium* oocysts in drinking water treatment. *Water Sci Technol*, 2000, 41, 159-163.
20. DUBEY, J. P., MARKOVITS, J. E., KILLARY, K. A. *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet Pathol*, 2002, 39, 363-371.
21. FALL, A., THOMPSON, R. C., HOBBS, R. P., MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *J Parasitol*, 2003, 89, 399-402.
22. FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol*, 2004, 126, 37-56.
23. FAYER, R. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, 1990, USA.
24. FAYER, R., GRACZYK, T. K., LEWIS, E. J., TROUT, J. M., FARLEY, C. A. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol*, 1998b, 64, 1070-1074.
25. FAYER, R., LEWIS, E. J., TROUT, J. M., GRACZYK, T. K., JENKINS, M. C., HIGGINS, J. XIAO, L. LAL, A. A. *Cryptosporidium* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. *Emerg Infect Dis*, 1999, 5, 706-710.
26. FAYER, R. et SANTIN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet Parasitol*, 2009, 164, 192-200.
27. FAYER, R., SANTIN, M., MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet Parasitol*, 2010, 172, 23-32.

28. FAYER, R., SANTIN, M., TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol*, 2008, 156, 191-198.
29. FAYER, R., SANTIN, M., XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol*, 2005, 91, 624-629.
30. FAYER, R., SPEER, C. A., DUBEY, J. P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer, R. (Ed.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, 1997, 1-41.
31. FAYER, R., TROUT, J. M., JENKINS, M. C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J Parasitol*, 1998a, 84, 1165-1169.
32. FAYER, R., TROUT, J. M., XIAO, L., MORGAN, U. M., LAI, A. A., DUBEY, J. P. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol*, 2001, 87, 1415-1422.
33. FREIRE-SANTOS, F., OTEIZA-LOPEZ, A. M., VERGANA-CASTIBLANCO, C. A., ARES-MAZIAS, M. E. Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parazitol*, 1999, 87, 1-7.
34. GALLAHER, M. M., HERNDON, J. L., NIMS, L. J., STERLING, C. R., GRABOWSKI, D. J., HULL, H. F. Cryptosporidiosis and surface water. *Am J Public Health*, 1989, 79, 39-42.
35. GARCIA, L. S. et BRUCKNER, D. A. Diagnostic Medical Parasitology. 2nd edition, Washington, DC: American Society for Microbiology, 2005.
36. GLASS, M. D., COURTNEY, P. D., LeJEUNE, J. T., WARD, L. A. Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* cell-free supernatants on *Cryptosporidium* viability and infectivity *in vitro*. *Food Microbiol*, 2004, 21, 423-429.
37. GOLDFARB, J. et al. (Centers for Disease Control (CDC)). Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1982, 31, 589-592.

38. GRACZYK, T. K., FAYER, R., GRANFIELD, H. R., MHANGAMI-RUWENDE, B., KNIGHT, R., TROUT, J. M., BIXLER, H. Filth flies are transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg Infect Dis*, 1999a, 5, 726-727.
39. GRACZYK, T. K., FAYER, R., LEWIS, E. J., TROUT, J. M., FARLEY, C. A. *Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol Res*, 1999b, 85, 518-521.
40. GRIFFITHS, J. K. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Adv Parasitol*, 1998, 40, 37-85.
41. GUYOT, K., FOLLET-DUMOULIN, A., LELIEVRE, E., SARFATI, C., RABODONIRINA, M., NEVEZ, G., CAILLIEZ, J. C., CAMUS, D., DEI-CAS, E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J Clin Microbiol*, 2001, 39, 3472-3480.
42. HAJDUŠEK, O., DITRICH, O., ŠLAPETA, J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Vet Parasitol*, 2004, 122, 183-192.
43. HIJJAWI, N. S., MELONI, B. P., RYAN, U. M., OLSEN, M. E., THOMPSON, R. C. A. 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*. *Int J Parasitol*, 2002, 32, 1719-1726.
44. HOXIE, N. J., DAVIS, J. P., VERGERON, J. M., NASHOLD, R. D., BLAIR, K. A. Cryptosporidiosis associated mortality following a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am J Pub Health*, 1997, 87, 2032-2035.
45. HUNTER, P. R., HUGHES, S., WOODHOUSE, S., RAJ, N., SYED, Q., CHALMERS, R. M., VERLANDER, N. Q., GOODACRE, J. Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis*, 2004, 39, 504-510.
46. HUNTER, P. R. et NICHOLS, G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15, 145-149.

47. CHMELÍK, V., DITRICH, O., TRNOVCOVÁ, R., GUTVIRTH, J. Clinical features of diarrhoea in children caused by *Cryptosporidium parvum*. *Folia Parasitol* (Praha), 1998, 45, 170-172.
48. INMAN, L. R. et TAKEUCHI, A. Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Vet Parasitol*, 1979, 16, 89-95.
49. ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn J Parasitol*, 1979, 28, 285-307.
50. JIRKŮ, M., VALIGEROVÁ, A., KOUDELA, B., KŘÍŽEK, J., MODRÝ, D., ŠLAPETA, J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol* (Praha), 2008, 55, 81-84.
51. JOHNSON, D. C., REYNOLDS, K. A., GERBA, C. P., PEPPER, I. L., ROSE, J. B. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. *Water Sci Technol*, 1995, 31, 439-442.
52. KANETA, Y. et NAKAI, Y. Survey of *Cryptosporidium* oocysts from adult cattle in a slaughter house. *J Vet Med Sci*, 1998, 60, 585-588.
53. KISTEMANN, T., CLABEN, T., KOCH, C., DANGENDORF, F., FISCHEDER, R., GEBEL, J., VACATA, V., EXNER, M. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68, 2188-2197.
54. KOUDELA, B., MODRÝ, D., VÍTOVEC, J. Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. *Vet Parasitol*, 1998, 76, 181-188.
55. LEVINE, N. D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J Parasitol*, 1980, 66, 830-834.
56. LINDSAY, D. S., UPTON, S. J., OWENS, D. S., MORGAN, U. M., MEAD, J. R., BLAGBURN, B. L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol*, 2000, 47, 91-95.

57. LISLE, J. T. et ROSE, J. B. *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and UK: a minireview. *J Water Supply Res Technol*, 1995, 44, 103-105.
58. LLOVO, J., LOPEZ, A., FABREGAS, J., MUÑOZ, A. Interaction of lectins with *Cryptosporidium parvum*. *J Infect Dis*, 1993, 167, 1477-1480.
59. MacKENZIE, W. R., HOXIE, H. J., PROCTOR, M. E., GRADUS, M. S., BLAIR, K. A., PETERSON, D. E., KAZMERCZAK, J. J., ADDISS, D. G., FOX, K. R., ROSE, J. B., DAVIS, J. P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*, 1994, 331, 161-167.
60. MacKENZIE, W. R., KAZMIERCZAK, J. J., DAVIS, J. P. An outbreak of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool. *Epidemiol Infect*, 1995, 115, 545-553.
61. MANABE, Y. C., CLARK, D. P., MOORE, R. D., LUMADUE, J. A., DOHLMAN, H. R., BELITSOS, P. C., CHAISSON, R. E., SEARS, C. L. Cryptosporidiosis in patients with AIDS: Correlates of disease and survival. *Clin Infect Dis*, 1998, 27, 536-542.
62. MATHISON, B. A. et DITRICH, O. The fate of *Cryptosporidium parvum* oocysts ingested by dung beetles and their possible role in the dissemination of cryptosporidiosis. *J Parasitol*, 1999, 85, 678-681.
63. McLAUCHLIN, J., AMAR, C., PEDRAZA-DIAZ, S., NICHOLS, G. L. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J Clin Microbiol*, 2000, 38, 3984-3990.
64. MEAD, J. R., HUMPHREYS, R. C., SAMMONS, D. W., STERLING, C. R. Identification of isolate-specific sporozoite proteins of *Cryptosporidium parvum* by two-dimensional gel electrophoresis. *Infect Immun*, 1990, 58, 2071-2075.
65. MEISEL, J. L., PERERA, D. R., MELIGRO, C., RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 1976, 70, 1156-1160.

66. MENDES MAIA, A., OGASSAWARA, S., PENA, H., HOGE, A. Oocysts of *Cryptosporidium* spp in the faces of bovines in Montes Claros, MG, Brazil. *Arq. Bras. Med Vet Zootec*, 1995, 47, 717-719.
67. MILÁČEK, P. et VÍTOVEC, J. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol (Praha)*, 1985, 32, 50.
68. MILLARD, P. S., GENSHEIMER, K. F., ADDISS, D. G., SOSIN, D. M., BECKETT, G. A., HOUCK-JANKOSKI, A., HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *JAMA*, 1994, 272, 1592-1596.
69. MIRON, D., KENES, J., DAGAN, R. Calves as a source of an outbreak of cryptosporidiosis among young children in an agricultural closed community. *Pediatr Infect Dis J*, 1991, 10, 438-441.
70. MKN-10 Mezinárodní statistika klasifikace nemocí a přidržných zdravotních problémů. [online]. [citováno 2011-04-13]. URL: <<http://www.uzis.cz/cz/mkn/index.html>>
71. MONGE, R., CHINCHILLA, M., REYES, L. Seasonality of parasites and intestinal bacteria in vegetables that are consumed raw in Costa Rica. *Rev Biol Trop*, 1996, 44, 369-375.
72. MOR, S. M. et TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in children in Sub-Saharan Africa: a lingering challenge. *Clin Infect Dis*, 2008, 47, 915-921.
73. MORGAN, U. M., XIAO, L., MONIS, P., SULAIMAN, I., PAVLASEK, I., BLAGBURN, B., OLSON, M., UPTON, S. J., KHRAMTSOV, N. V., LAL, A., ELLIOT, A., THOMPSON, R. C. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. *Parasitology*, 2000, 120, 457-464.
74. MORGAN-RYAN, U. M., FALL, A., WARD, L. A., HIJJAWI, N., SULAIMAN, I., FAYER, R., THOMPSON, R. C. A., OLSON, M., LAL, A. A., XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J Eukaryot Microbiol*, 2002, 49, 433-440.

75. MTAMBO, M. M., WRIGHT, E., NASH, A. S., BLEWETT, D. A. Infectivity of a *Cryptosporidium* species isolated from a domestic cat (*Felis domestica*) in lambs and mice. *Res Vet Sci*, 1996, 60, 61-64.
76. NAVIN, T. R., WEBER, R., VUGIA, D. J., RIMLAND, D., ROBERTS, J. M., ADDISS, D. G., VISVESVARA, G. S., WALHGUIST, S. P., HOGAN, S. E., GALLAGHER, L. E., JURANEK, D. D., SCHWARTZ D. A., WILCOX, C. M., STEWART, J. M., THOMPSON, S. E., BRYAN, R. T. Declining CD4+ T-lymphocyte counts are associated with increased risk of enteric parasitosis and chronic diarrhea: results of a 3-year longitudinal study. *J Acquir Immune Defic Synd Hum Retrovirol*, 1999, 20, 154-159.
77. NEILL, M. A., RICE, S. K., AHMAD, N. V., FLANIGAN, T. P. Cryptosporidiosis: an unrecognized cause of diarrhea in elderly hospitalized patients. *Clin Infect Dis*, 1996, 22, 168-170.
78. NEWMAN, R. D., SEARS, C. L., MOORE, S. R., NATARO, J. P., WUHIB, T., AGNEW, D. A., GUERRANT, R. L., LIMA, A. A. M. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. *J Infect Dis*, 1999, 180, 167-175.
79. NICHOLS, G. L., McLAUCHLIN, J., SAMUEL, D. A technique for typing *Cryptosporidium* isolates. *J Protozool*, 1991, 38, 237S-240S.
80. NIME, F. A., BUREK, J. D., PAGE, D. L., HOLSCHEER, M. A., YARDLEY, J. H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 1976, 70, 592-598.
81. NIMRI, L. F. et HIJAZI, S. S. *Cryptosporidium*. A cause of gastroenteritis in preschool children in Jordan. *J Clin Gastroenterol*, 1994, 19, 288-291.
82. NOURI, M. A *Cryptosporidium muris* like parasite in cattle and camels in Iran. *Indian Vet J*, 2002, 79, 558-559.

83. O'BRIEN, E., McINNES, L., RYAN, U. *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. *Exp Parasitol*, 2008, 118, 118-121.
84. O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol*, 1995, 25, 139-195.
85. OKHUYSEN, P. C., CHAPPELL, C. L., CRABB, J. H., STERLING, C. R., DuPONT, H. L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J Infect Dis*, 1999, 180, 1275-1281.
86. OKHUYSEN, P. C., RICH, S. M., CHAPPELL, C. L., GRIMES, K. A., WIDMER, G., FENG, X., TZIPORI, S. Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* isolate of cervine origin for healthy adults and interferon-gamma knockout mice. *J Infect Dis*, 2002, 185, 1320-1325.
87. PANCIERA, R., THOMASSEN, R., GAMER, F. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Pathol*, 1971, 8, 479-484.
88. PATEL, S., PEDRAZA-DIAZ, S., McLAUCHLIN, J., CASEMORE, D. P. Molecular characterisation of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks. Outbreak Control Team South and West Devon 1995, Incident Management Team and Further Epidemiological and Microbiological Studies Subgroup North Thames 1997. *Commun Dis Public Health*, 1998, 1, 231-233.
89. PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia and other endoparasites in heifers imported into the Czech Republic. *Vet Med*, 1995, 40, 333-336.
90. PAVLÁSEK, I., LÁVIČKOVÁ, M., HORÁK, P., KRÁL, J., KRÁL, B. *Cryptosporidium varanii* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity at Prague zoo. *Gazella*, 1995, 22, 99-108.
91. PAVLÁSEK, I. et RYAN, U. M. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. *Exp Parasitol*, 2007, 118, 434-437.

92. PENA, H. F., KASAI, N., GENNARI, S. M. *Cryptosporidium muris* in dairy cattle in Brazil. *Vet Parasitol*, 1997, 73, 353-355.
93. PENG, M. M., XIAO, L., FREEMAN, A. R., ARROWOOD, M. J., ESCALANTE, A. A., WELTMAN, A. C., ONG, C. S. L., MacKENZIE, W. R., LAL, A. A., BEARD, C. B. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg Infect Dis*, 1997, 3, 567-573.
94. PICKERD, N. et TUTHILL, D. Resolution of cryptosporidiosis with probiotic treatment. *Postgrad Med J*, 2004, 80, 112-113.
95. POWER, M. L. et RYAN, U. M. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J Parasitol*, 2008, 94, 1114-1117.
96. POZIO, E., REZZA, G., BOSCHINI, A., PEZZOTTI, P., TAMBURRINI, A., ROSSI, P., DIFINE, M., SMACCHIA, C., SCHIESARI, A., GATTEI, E., ZUCCONI, R., BALLARINI, P. Clinical cryptosporidiosis and human immunodeficiency virus (HIV)-induced immunosuppression: findings from a longitudinal study of HIV-positive and HIV-negative former injection drug users. *J Infect Dis*, 1997, 176, 969-975.
97. QUINN, R. R. et al. (Centers for Disease Control and Prevention (CDC)). Foodborne Outbreak of Cryptosporidiosis -- Spokane, Washington, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1998, 47, 565-567.
98. QUIROZ, E. S., BERN, C., MacARTHUR, J. R., XIAO, L., FLETCHER, M., ARROWOOD, M. J., SHAY, D. K., LEVY, M. E., GLASS, R. I., LAL, A. An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. *J Infect Dis*, 2000, 181, 695-700.
99. RACCURT, C. P., BRASSEUR, P., VERDIER, R. I., LI, X., EYMA, E., STOCKMAN, C. P., AQNAMEY, P., GUYOT, K., TOTET, A., LIAUTAUD, B., NEVEZ, G., DEI-CAS, E., PAPE, J. W. Human cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* spp. in Haiti. *Trop Med Int Health*, 2006, 11, 929-934.

100. RIORDAN, C. E., LANGRETH, S.G., SANCHEZ, L. B., KAYSER, O., KEITHLY, J. S. Preliminary evidence for a mitochondrion in *Cryptosporidium parvum*: phylogenetic and therapeutic implications. *J Eukaryot Microbiol*, 1999, 46, 52S-55S.
101. ROBERTSON, L. J., CAMPBELL, A. T., SMITH, H. V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58, 3494-3500.
102. ROSE, J. B., HUFFMAN, D. E., GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26, 113-123.
103. ROSE, J. B., LISLE, J. T., LeCHEVALLIER, M. Waterborne cryptosporidiosis: incidence outbreaks, and treatment strategies. In: Fayer, R. (Ed.) *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton, 1997, 93-110.
104. RYAN, U. M., MONIS, P., ENEMARX, H. L., SULAIMAN, I., SAMARASINGHE, B., READ, C., BUDDLE, R., ROBERTSON, I., ZHOU, L., THOMPSON, R. C., XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) in pigs (*Sus scrofa*). *Vet Parasitol*, 2004, 90, 769-773.
105. RYAN, U. M., POWER, M., XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J Eukaryot Microbiol*, 2008, 55, 22-26.
106. RYAN, U. M., XIAO, L., READ, C., SULAIMAN, I. M., MONIS, P., LAL, A. A., FAYER, R., PAVLÁSEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) from birds. *J Parasitol*, 2003, 89, 809-813.
107. SANTIN, M., TROUT, J. M., XIAO, L., ZHOU, L., GREINER, E., FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol*, 2004, 122, 103-117.
108. SARGENT, K. D., MORGAN, U. M., ELLIOT, A., THOMPSON, R. C. Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. *Vet Parasitol*, 1998, 77, 221-227.

109. SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J Comp Pathol*, 1955, 65, 262-270.
110. SMITH, H. V., BROWN, J., COULSON J. C., MORRIS, G. P., GIRDWOOD, R. W. Occurrence of oocysts of *Cryptosporidium* sp. in *Larus* spp. gulls. *Epidemiol Infect*, 1993, 110, 135-143.
111. SMITH, H. V., NICHOLS, R. A., GRIMASON, A. M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol*, 2005, 21, 133-142.
112. SORVILLO, F., BEALL, G., TURNER, P. A., BEER, V. L., KOVACS, A. A., KRAUS, P., MASTERS, D., KERNDT, P. R. Seasonality and factors associated with cryptosporidiosis among individuals with HIV infection. *Epidemiol Infect*, 1998, 121, 197-204.
113. STERLING, C. R. et ARROWOOD, M. J. Cryptosporidia. In: *Parazitic Protozoa*, 2nd edition, Edited by Kreire, Academic Press, NY, 1992, 6, 1159-1125.
114. SULAMAIN, I. M., LAL, A. A., XIAO, L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J Parasitol*, 2002, 88, 388-394.
115. SULAMAIN, I. M., MORGAN, U. M., THOMPSON, R. C., LAL, A. A., XIAO, L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 2385-2391.
116. TANGERMANN, R. H., GORDON, S., WIESNER, P., KRECKMAN, L. An outbreak of cryptosporidiosis in a day-care center in Georgia. *Am J Epidemiol*, 1991, 133, 471-476.
117. TETLEY, L., BROWN, S. M. A., McDONALD, V. M., COOMBS, G. H. Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology*, 1998, 144, 3249-3255.
118. THOMPSON, R. C. et CHALMERS, R. M. *Cryptosporidium*: from molecules to disease. *Trends Parasitol*, 2002, 18, 98-100.

119. THOMPSON, R. C., OLSON, M. E., ZHU, G., ENOMOTO, S., ABRAHAMSEN, M. S., HIJJAWI, N. S. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv Parasitol*, 2005, 59, 77-158.
120. TILLEY, M., UPTON, S. J., FREED, P. S. A comparative study of the biology of *Cryptosporidium serpentis* and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *J Zoo Wildl Med*, 1990, 21, 463-467.
121. TILLEY, M., UPTON, S. J., CHRISP, C. E. A comparative study on the biology of *Cryptosporidium* sp. from guinea pigs and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *Can J Microbiol*, 1991, 37, 949-952.
122. TORRES, J., GRACENEA, M., GOMEZ, M. S., ARRIZABALAGA, A., GONZALEZ-MORENO, O. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Vet Parasitol*, 2000, 92, 253-260.
123. TYZZER, E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protistenkd*, 1912, 26, 394-412.
124. TYZZER, E. E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. & sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J Med Res*, 1910, 23, 487-510.
125. TYZZER, E. E. A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1907, 5, 12-13.
126. UPTON, S. J. et CURRENT, W. L. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *J Parasitol*, 1985, 71, 625-629.
127. VETTERLING, J. M., JERVIS, H. R., MERRILL, T. G., SPRINZ, H. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *J Protozool*, 1971, 18, 243-247.
128. VOLF, P. et HORÁK, P. Paraziti a jejich biologie. 1. vydání. Praha: Triton, 2007.
129. WEINSTEIN, P., MACAITIS, M., WALKER, C., CAMERON, S. Cryptosporidial diarrhoea in South Australia. An exploratory case-control study of risk factors for transmission. *Med J Aust*, 1993, 158, 117-119.

130. WIDMER, G., AKIYOSHI, D., BUCKHOLT, M. A., FENG, X., RICH, S. M., DEARY, K. M., BOWMAN, C. A., XU, P., WANG, Y., WANG, X., BUCK, G. A., TZIPORI, S. Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, 108, 187-197.
131. XIAO, L., BERN, C., LIMOR, J., SULAIMAN, I., ROBERTS, J., CHECKLEY, W., CABRERA, L., GILMAN, R. H., LAL, A. A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis*, 2001, 183, 492-497.
132. XIAO, L., LIMOR, J., MORGAN, U. M., SULAIMAN, I. M., THOMPSON, R. C., LAL, A. A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 5499-5502.
133. XIAO, L., SULAIMAN, I. M., RYAN, U. M., ZHOU, L., ATWILL, E. R., TISCHLER, M. L., ZHANG, X., FAYER, R., LAL, A. A. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int J Parasitol*, 2002, 32, 1773-1785.
134. ZARDI, E. M., PICARDI, A., AFELTRA, A. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised hosts-Still an open question. *Chemotherapy*, 2005, 51, 193-196.
135. ZERPA, R. et HUICHO, L. Childhood cryptosporidial diarrhea associated with identification of *Cryptosporidium* sp. in the cockroach *Periplaneta americana*. *Pediatr Infect Dis*, 1994, 13, 546-548.

8. Klíčová slova

kryptosporidióza

infekce dětí

diagnostické metody

9. Přílohy