

Barbara Šoba¹, Jernej Logar²

Molekularna epidemiologija humane kriptosporidioze

Molecular Epidemiology of Human Cryptosporidiosis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: kriptosporidioza, *Cryptosporidium*, epidemiologija molekularna, genotip

Praživali iz rodu *Cryptosporidium* so za ljudi in živali patogeni paraziti. Povzročajo bolezen kriptosporidiozo, ki se kaže v akutni ali kronični driski. Kužne oblike parazita so izredno odporne oociste, ki jih gostitelj izloča z blatom. Človek se z njimi okuži neposredno od okuženih ljudi in živali ali posredno z onesnaženo vodo in hrano. Uspešnega zdravlila za zdravljenje kriptosporidioze zaenkrat še ni, zato je zelo pomembno preprečevanje te okužbe. Uporaba molekularno-bioloških metod na področju raziskav kriptosporidijev in kriptosporidioze je razkrila obsežno genetično raznolikost teh parazitov. Danes je znanih štirinajst vrst in preko trideset genotipov kriptosporidijev. Pri človeku so opisali okužbe s sedmimi vrstami in enim genotipom. Molekularno ugotavljanje vrst oz. genotipov kriptosporidijev, ki najpogosteje okužijo ljudi na nekem področju, nam omogoča sklepati o virih okužbe in načinih širjenja bolezni ter uvedbo ukrepov za preprečevanje okužb s temi praživalmi. Pred nedavnim smo z uvedeno molekularno-biološko metodo ugotavljali, katere vrste oz. genotipi kriptosporidijev najpogosteje povzročajo kriptosporidiozo pri ljudeh v Sloveniji.

ABSTRACT

KEY WORDS: cryptosporidiosis, *Cryptosporidium*, epidemiology molecular, genotype

The protozoan parasite *Cryptosporidium* is a pathogen that infects humans and animals. It causes cryptosporidiosis, which results in an acute or chronic diarrhea. The infectious agents of this parasite are oocysts, which are excreted into the environment with feces of the infected host. Humans can become infected either directly through contact with infected humans and animals, or indirectly via contaminated water and food. In the absence of effective therapeutics against this parasite, preventing the infection is very important. The development of molecular biology-based techniques gave the insight into the extensive genetical variation within *Cryptosporidium*. In addition to the thirteen accepted species of *Cryptosporidium*, over thirty *Cryptosporidium* genotypes have been described. Thus far, seven species and one genotype have been identified in humans. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species/genotypes that infect humans in a certain area most frequently enables us to infer about the sources of infection and transmission routes of Cryptosporidiosis in this area and to introduce appropriate intervention measures to prevent the infection. A molecular biology based technique was used in our laboratory to determine the species and genotypes of *Cryptosporidium* that infect humans in Slovenia.

¹ Mag. Barbara Šoba, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

² Prof. dr. Jernej Logar, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

UVOD

Pražival *Cryptosporidium* je leta 1907 prvi opazil in opisal Tyzzer v želodčnih žlezah miši (*Mus musculus*) (1). Kasneje so kriptosporidije našli še pri drugih živalskih vrstah. Z boleznijo, kriptosporidiozo, so to pražival prvič povezali leta 1955, ko je Slavin poročal o driskah pri puranih, pri katerih je našel oociste tega parazita (2). Pri človeku sta okužbo s tem parazitom prva zasledila Nime in Meisel s sodelavci leta 1976 (3, 4). Kriptosporidiji danes veljajo za ene najpogostejših povzročiteljev drisk tako pri imunsko oslabljenih osebah kot tudi pri osebah z normalno imunostjo. Center za nadzor in preprečevanje bolezni v Atlanti, ZDA, je kriptosporidiozo uvrstil med t. i. »porajajoče se« nalezljive bolezni (5). Med te bolezni uvrščajo tiste, ki se zaradi vpliva družbenih dejavnikov, tehnološkega razvoja in spreminjanja naravnega okolja na novo porajajo, vendar jih večinoma ne povzročajo novi neznani povzročitelji, temveč dobro znani mikrobi (6).

Kriptosporidioza se pri večini bolnikov z normalno imunostjo kaže v obilni vodeni ali sluzasti driski tudi pet do desetkrat na dan. Driska se pojavi 7 do 10 dni po okužbi. Navadno jo spremljajo še bolečine v trebuhu, slabost, bruhanje, pomanjkanje teka in nekoliko zvišana telesna temperatura. Driska traja približno 9 do 15 dni, redkeje več tednov. Bolezen, ki je lahko tudi brez bolezenskih znakov, navadno preneha sama od sebe (7, 8). Kriptosporidioza predstavlja velik problem pri bolnikih s pomanjkljivo imunostjo, saj njihov imunski sistem ni sposoben sam zamejiti okužbe, uspešnega zdravlila za zdravljenje kriptosporidioze pa zaenkrat še ni. Pri teh bolnikih se driska ponavlja, traja več mesecev in se lahko konča s smrtjo. Bolniki močno shujšajo, saj zaradi driske izgubijo veliko tekočine, okoli tri litre na dan, lahko pa tudi mnogo več. Okužba lahko pri omenjenih bolnikih povzroči tudi vnetje dihalnih poti, žolčnika, jeter in trebušne slinavke. Bolezensko stanje se izboljša, če se izboljša imunsko stanje (npr. prenehanje jemanja raznih imunosupresivnih sredstev, protiretrovirusno zdravljenje pri bolnikih z aidsom) (7, 9).

O pojavljanju parazita *Cryptosporidium* pri ljudeh obeh spolov poročajo povsod po sve-

tu. Obolevnost s kriptosporidiji je večja v državah v razvoju (6,1 % pri bolnikih z drisko in 1–5,2 % pri osebah brez driske) kot v razvitih državah (2,2 % pri bolnikih z drisko in 0,2 % pri osebah brez driske). V Sloveniji so kriptosporidije kot edine povzročitelje driske našli pri 3,2 % bolnikov (10). Pri otrocih v razvitih državah je okužba s kriptosporidiji vzrok za 7 % drisk, v državah v razvoju pa za 12 %. Okužba je pogostejša tudi pri bolnikih z oslabljeno imunostjo, predvsem pri bolnikih z aidsom, pri katerih število limfocitov T CD4+ že pade pod 200 na μ l. Pri njih je kriptosporidioza ena izmed najpomembnejših oportunističnih okužb. V razvitih državah je pri bolnikih z aidsom okužba s kriptosporidiji vzrok za 14 % drisk, v državah v razvoju pa za 24 % (11).

Kriptosporidioza se pojavlja sporadično in epidemično. Kužne oblike parazitov so 4 do 6 μ m velike in izredno odporne oociste, ki jih gostitelj izloča z blatom. Človek se z oocistami kriptosporidijev okuži na različne načine: neposredno od okuženih ljudi ali živali in posredno z onesnaženo vodo ali hrano (12).

Uspešnega zdravlila za zdravljenje kriptosporidioze zaenkrat še ni, zato je zelo pomembno preprečevanje te okužbe (13). Pri uvajanju ustreznih ukrepov za preprečevanje okužbe je pomembno poznavanje virov okužbe in načinov širjenja bolezni. Tradicionalne diagnostične metode za ugotavljanje okužb s kriptosporidiji (histološke preiskave bioptičnega materiala črevesa, preiskave razmazov iztrebkov obarvanih z različnimi specifičnimi barvanji, specifične imunodiagnostične metode za dokazovanje antigenov kriptosporidijev) samo potrdijo oz. izključijo okužbo, o viru okužbe pa na podlagi teh rezultatov ne moremo sklepati. Ravno zaradi te pomanjkljivosti so na področju raziskav kriptosporidijev in kriptosporidioze v začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja uvedli molekularno-biološke metode. Z njihovo uporabo se je razkrila obsežna genetična raznolikost teh parazitov. Molekularno-biološke metode so omogočile razločevanje po obliki in zgradbi izredno podobnih vrst oz. genotipov kriptosporidijev in pokazale, da lahko človeka okužijo različne vrste oz. genotipi teh parazitov ter da se človek z njimi okuži iz različnih virov. Molekularno-biološke metode zato pomenijo pomemben napredek pri proučevanju epidemiologije kriptosporidijev.

Izsledki teh raziskav so ključni tudi pri uvažanju ustreznih ukrepov za preprečevanje okužb s temi paraziti (14).

MOLEKULARNO-BIOLOŠKE METODE

Od razvoja prve verižne reakcije s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*) za raziskave kriptosporidijev in kriptosporidioze so opisali številne molekularno-biološke metode za ugotavljanje prisotnosti DNA kriptosporidijev tako v kliničnih vzorcih kot tudi v vzorcih iz okolja. Danes največ uporabljajo metode, s katerimi je mogoča tudi opredelitev vrste oz. genotipa kriptosporidijev (14):

- Analiza polimorfizma dolžin restriksijskih fragmentov (RFLP, angl. *restriction fragment length polymorphism*) pridelkov PCR, predvsem gena za malo ribosomsko podenoto (SSU rRNA, angl. *small subunit ribosomal RNA*), gena za protein stene oocist kriptosporidijev (COWP, angl. *Cryptosporidium oocyst wall protein*), in gena za 60 kDa glikoprotein (GP60). Pri tej metodi se pridelek PCR za določen čas izpostavi delovanju ustreznih restriksijskih endonukleaz (encimi, ki režejo dvojno vijačnico DNA na točno določenem mestu), nato pa se analizira razlike v vzorcih encimske razgradnje pridelkov PCR.
- Analiza mobilnosti heterodupleksov (HMA, angl. *heteroduplex mobility assay*). Pri tej metodi se k pridelku PCR najprej primeša znana t. i. referenčna DNA, to mešanico pa se segreje do temperature, pri kateri se začnejo komplementarne vijačnice DNA razdvojevati. Mešanico se nato počasi ohlaja, pri čemer se komplementarne vijačnice ponovno povežejo v dvojnovijačno DNA (v t. i. homoduplekse), nastanejo pa tudi t. i. heterodupleksi med enojnimi vijačnicami pridelka PCR in referenčne DNA, ki se od homodupleksov razlikujejo po hitrosti potovanja v gelu.
- Analiza polimorfizma konformacije enovijačnic (SSCP, angl. *single strand conformation polymorphism*) pridelkov PCR, predvsem gena za SSU rRNA, gena za ITS (angl. *internal transcribed spacer*), gena za 70 kDa protein toplotnega šoka (HSP70, angl. *70 kDa heat shock protein*) in gena za

GP60. Pri tej metodi se komplementarne vijačnice DNA pridelkov PCR najprej razdvoji pri visoki temperaturi. Nastale enovijačnice pod določenimi pogoji oblikujejo sekundarne strukture. Sekundarna struktura enovijačnic je odvisna od njihove nukleotidne sestave, nanjo lahko vpliva že razlika v enem samem nukleotidu. Razlike v sekundarni strukturi enovijačnic se analizira glede na hitrost potovanja enovijačnic v gelu.

- Sekvenčna analiza pridelkov PCR, predvsem gena za SSU rRNA, 23 kDa glikoprotein (p23), GP60 in 900 kDa glikoprotein (GP900), s katero se pridelkom PCR določi njihovo nukleotidno zaporedje in s tem opredeli vrsta oz. genotip kriptosporidija.

Prve tri od naštetih metod posredno opredelijo vrsto oz. genotip kriptosporidijev s primerjavo vzorcev encimske razgradnje pridelkov PCR in razlik v potovanju heterodupleksov oz. enovijačnic v gelu. Te metode so dokaj enostavne, hitre in poceni. V nekaterih primerih s temi metodami vrst oz. genotipov ni mogoče dokončno opredeliti. V teh primerih si pomagamo s sekvenčno analizo pridelkov PCR. Ta metoda neposredno in dokončno opredeli vrsto oz. genotip kriptosporidijev z določitvijo nukleotidnega zaporedja. Metoda je zanesljiva, vendar časovno zamudna, draga in tehnično zahtevna (15).

Molekularno-biološke metode so omogočile razločevanje med različnimi vrstami oz. genotipi kriptosporidijev. Z nekaterimi je mogoče kriptosporidije opredeliti celo pod nivojem vrste, kar dodatno razširi njihovo uporabnost pri proučevanju epidemiologije teh prazivali (14, 16). Iz ugotovitev molekularno-bioloških metod, tj. iz spoznavne različnih vrst oz. genotipov kriptosporidijev, lahko ugotavljamo različne vire kriptosporidijev in načine njihovega prenosa ter tudi sklepamo na njihovo patogenost (16).

VRSTE OZ. GENOTIPI KRIPTOSPORIDIJEV IN POMEN NJIHOVEGA DOLOČANJA ZA JAVNO ZDRAVSTVO

Za rod *Cryptosporidium* je značilna obsežna genetična raznolikost. Danes je poimenovanih štirinajst vrst in preko trideset genotipov

Tabela 1. Vrste in genotipi kriptosporidijev ter njihovi glavni gostitelji (14).

Vrsta/genotip kriptosporidija	Glavni gostitelj	Vrsta/genotip kriptosporidija	Glavni gostitelj
	Ptiči		Divje živali
<i>C. baileyi</i>	kokoši, purani, ostali ptiči	<i>C. canis</i> lisičji genotip	lisice
<i>C. galli</i>	ščinkavci, kokoši, divji petelini, dleski	<i>C. hominis</i> opičji genotip	opice
<i>C. meleagridis</i>	purani in ostali ptiči, ljudje	genotip belega dihurja	beli dihurji
gosji genotip I in II	gosi	genotip jelenjadi in srnjadi	jelenjad in srnjad
klunačji genotip	evrazijski kljunači	genotip miši vrste <i>Peromyscus maniculatus</i>	miši vrste <i>Peromyscus maniculatus</i>
neimenovan gosji genotip 3b	gosi	genotip mungov	mungi
neimenovan gosji genotip 7	gosi	genotip oposumov	oposumi
račji genotip	race, gosi	genotip pižmovk I in II	pižmovke
	Ljudje in domače živali	genotip vrečarjev I in II	vrečarji
<i>C. andersoni</i>	govedo, azijske kamele, ovce	jelenji genotip	jelenjad in srnjad, ovce, lemuri
<i>C. canis</i>	psi	lisičji genotip	lisice
<i>C. felis</i>	mačke	medvedji genotip	medvedi
<i>C. hominis</i>	ljudje, opice	mišji genotip	miši, podgane
<i>C. parvum</i>	ljudje, govedo, ovce, koze, jelenjad in srnjad, rakuni, konji	skunčji genotip	skunki, rakuni
<i>C. suis</i>	prašiči	veveričji genotip	veverice
<i>C. wrairi</i>	morski prašički	zajčji genotip	zajci
bovini genotip B	govedo, ovce		Plazilci, ribe
genotip podoben genotipu jelenjadi in srnjadi	govedo	<i>C. molnari</i>	ribe
konjski genotip	konji	<i>C. saurophilum</i>	kuščarji
prašičji genotip II	prašiči	<i>C. serpentis</i>	kače, kuščarji
	Divje živali	neimenovan genotip kuščarjev	kuščarji
<i>C. muris</i>	glodavci, azijske kamele	neimenovan kačji genotip	kače
<i>C. canis</i> kojočji genotip	kojoti	neimenovan kačji genotip W11	kače
		želvjji genotip	želve

kriptosporidijev (tabela 1). Kriptosporidiji so uvrščeni v vrste glede na biološke (oblika in zgradba oocist, zanje značilni gostitelji) in genetske značilnosti. Mnogi kriptosporidiji danes še niso uvrščeni v vrste, ker so proučene le njihove genetske značilnosti, zgolj na osnovi katerih pa uvrstitev ni mogoča. Govorimo o genotipih kriptosporidijev (skupini organizmov z isto dedno zasnovo), ki so običajno poimenovani po gostitelju, v katerem so jih prvič opisali (npr. gosji genotip so prvič opisali pri goseh). Genetske značilnosti teh genotipov se razlikujejo od genetskih značilnosti že obstoječih vrst. Številni genotipi bodo v prihodnje, ko bodo proučili tudi njihove biološke značilnosti, najverjetneje predstavljali samostojne vrste (14, 17).

Molekularno-biološke raziskave so pokazale, da so vrste oz. genotipi kriptosporidijev večinoma prilagojeni na zanje značilne gostitelje. Raziskovalci zato menijo, da večina vrst oz. genotipov ne ogroža zdravja ljudi (14, 17).

Dolgo časa je prevladovalo mnenje, da je *C. parvum* edina vrsta, ki povzroča okužbo pri človeku. Prazivali iz vrste *C. parvum* so do nedavnega razvrščali v dva genotipa; humani genotip in bovini genotip. Za humani genotip (genotip 1) so menili, da okuži izključno človeka, za bovini genotip (genotip 2) pa so menili, da poleg goveda, ovc, koz ter jelenjadi in srnjadi okuži tudi človeka. Danes predstavljata oba genotipa ločeni vrsti, ki se različno prenašata. V vrsto *C. parvum* uvrščajo parazite, ki so jih prej uvrščali v bovini genotip. Na človeka se ti paraziti prenesejo posredno ali neposredno predvsem z okuženih živali lahko pa tudi z okuženih ljudi. Humani genotip zaradi svojih bioloških in genetskih značilnosti danes tvori samostojno vrsto *C. hominis*. Ta se lahko na človeka prenese posredno ali neposredno le z okuženih ljudi (18).

Številne molekularno-biološke raziskave so pokazale, da sta vrsti *C. parvum* in *C. hominis* najpogostejši povzročiteljici okužbe pri

človeku (17). V različnih državah obstajajo razlike v pogostnosti pojavljanja okužbe ljudi z eno ali drugo vrsto. Iz takšnih ugotovitev je mogoče sklepati, da so ljudje na različnih geografskih področjih izpostavljeni različnim virom okužbe in načinom prenosa tega parazita. V Avstraliji je 83 % primerov humane kriptosporidioze posledica okužbe s *C. hominis*, kar kaže na to, da so vir okužbe običajno okuženi ljudje in ne živali (19). Tudi v ZDA, na Japonskem, Danskem, Kitajskem, Tajskem, v Kanadi, Indiji, Gvatemali, Malaviju, Peruju, Keniji in Ugandi večino okužb pri človeku povzroča vrsta *C. hominis* (16, 20–31). Nasprotno pa na Novi Zelandiji, v Veliki Britaniji, Švici in Franciji, Severni Irski, na Portugalskem in drugih delih Evrope prevladujejo okužbe ljudi z vrsto *C. parvum*, iz česar je mogoče sklepati, da na teh področjih predstavlja živina poglaviti vir okužbe za človeka (32–41).

Vrsti *C. parvum* in *C. hominis* sta najpogostejši povzročiteljci okužbe pri človeku in le njiju povezujejo z epidemijami humane kriptosporidioze (16). Opisanih je več epidemij kriptosporidioze, od katerih je bila najboljšežnejša epidemija v južnem Milwaukeeju leta 1993. V njej je zaradi onesnaženosti pitne vode zbolelo preko 400.000 ljudi (42). Epidemija kriptosporidioze v Milwaukeeju je do danes najboljšežnejša epidemija povezana z onesnaženostjo pitne vode v zgodovini ZDA. Poleg epidemij povezanih z onesnaženostjo pitne vode so pogoste tudi epidemije kriptosporidioze v otroških vrtcih, v bolnišnicah, med starostniki v domovih za starejše in delavcih na kmetijah, ki prihajajo v stik z okuženimi živalmi.

Vrsti *C. parvum* in *C. hominis* nista edini vrsti, ki okužita človeka. Pri imunsko oslavljenih osebah in otrocih so opisali še vrste *C. meleagridis*, *C. felis* in *C. canis*, ki sicer povzročajo okužbo pri živalih (16, 23, 27, 28, 34, 36–38, 43). Ljudi lahko, ne glede na njihovo imunsko stanje, okužijo tudi *C. muris*, *C. suis* in jelenji genotip kriptosporidija, vendar je pogostost okužb s temi kriptosporidiji izredno nizka (20, 24, 28, 30, 34, 39, 44, 45).

Rezultati molekularno-bioloških raziskav podpirajo domnevo, da je antropofilna vrsta *C. hominis* na človeka bolj prilagojena in s tem zanj tudi bolj kužna kot zoofilne vrste

oz. genotipi kriptosporidijev. Ljudje, okuženi z vrsto *C. hominis*, v svojem blatu izločajo večje število oocist in tudi dalj časa kot tisti okuženi z zoofilnimi vrstami oz. genotipi kriptosporidijev (30). Domnevo o večji prilagojenosti *C. hominis* na človeka potrjuje tudi dejstvo, da je večina epidemij humane kriptosporidioze navadno povezanih z vrsto *C. hominis* in to celo na področjih, kjer sicer večino sporadičnih okužb povzroča vrsta *C. parvum* (34).

Vrste oz. genotipi kriptosporidijev pri ljudeh s kriptosporidiozo v Sloveniji

Pred nedavnim smo za raziskave kriptosporidijev in kriptosporidioze na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani uvedli molekularno-biološko metodo – sekvenčno analizo pridelkov PCR. Z njo proučujemo, katere vrste oz. genotipi kriptosporidijev najpogostejše povzročajo kriptosporidiozo pri ljudeh v Sloveniji, da bi na podlagi tega lahko sklepali o virih okužbe in načinih širjenja bolezni. Po naših dosedanjih raziskavah povzroča pri nas, podobno kot tudi drugod po Evropi, večino okužb ljudi vrsta *C. parvum*. Ugotovili smo, da je bilo od 29 bolnikov s kriptosporidiozo 26 bolnikov okuženih s *C. parvum*, dva sta bila okužena s *C. hominis* in eden z jelenjim genotipom, ki okuži človeka le izjemoma. Glede na ugotovitve, da pri nas večino okužb ljudi povzroča vrsta *C. parvum*, je mogoče zaključiti, da je v Sloveniji poglaviti vir okužbe človeka okuženo govedo ter drobnica in le redko okuženi ljudje. Ugotovljen jelenji genotip pri enem izmed bolnikov s kriptosporidiozo pa kaže, da določeno tveganje za okužbo ljudi pri nas predstavljajo tudi divje živali. Vse te ugotovitve bo potrebno upoštevati pri uvajanju ukrepov za preprečevanje kriptosporidioze v Sloveniji (46). Ti ukrepi naj bi bili predvsem:

- umik živinoreje s področij, kjer so zajetja pitne vode;
- preprečevanje nenadzorovanega iztoka odplak iz hlevov, ker lahko le-te onesnažijo podtalnico;
- zagotavljanje neoporečne pitne vode tudi s sistemom filtracije vode skozi filtre s porami manjšimi od 1 µm, saj kloriranje vode oocist kriptosporidijev ne uniči;

- občasno preverjanje pitne vode na oociste kriptosporidijev s strani za to pristojnih ustanov.

ZAKLJUČEK

Uspesnega zdravlila za zdravljenje kriptosporidioze zaenkrat še ni, zato je zelo pomembno preprečevanje okužbe, predvsem z zagotovitvijo neoporečne pitne vode in hrane (13). Uvedba molekularno-bioloških metod za raziskave nekaterih parazitov v začetku devetdesetih let je pomenila pomemben napredek tudi na področju raziskav kriptosporidijev in kriptosporidioze. Molekularno-biološke metode so bistveno pripomogle k razločevanju po obliki in zgradbi izredno podobnih vrst oz.

genotipov kriptosporidijev in s tem dale vpogled v genetično raznolikost teh parazitov. Njihova uporaba pri proučevanju humane kriptosporidioze je pokazala, da okužbe pri človeku ne povzročata le vrsti *C. hominis* in *C. parvum*, ampak da so lahko za človeka potencialno patogene tudi vrste oz. genotipi kriptosporidijev, ki običajno povzročajo okužbo le pri živalih. Molekularno-biološke metode so zaradi svoje visoke občutljivosti omogočile neposredno ugotavljanje prisotnosti kriptosporidijev ne samo v kužnini bolnikov ampak tudi v vodi, hrani in različnih drugih vzorcih iz okolja. Danes so te metode podlaga za poznavanje epidemiologije kriptosporidijev in kriptosporidioze, predvsem virov okužbe in načinov širjenja te bolezni (35).

LITERATURA

1. Tyzzer EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1907; 5: 12–3.
2. Slavin D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J Comp Pathol* 1955; 65: 262–6.
3. Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 1976; 70: 592–8.
4. Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 1976; 70: 1156–60.
5. Tzipori S. Introduction. *Cryptosporidiosis: current trends and challenges*. *Microbes Infect* 2002; 4: 1045.
6. Likar M. Porajajoče se nalezljive bolezni. Ljubljana: Zbornica sanitarnih tehnikov in inženirjev Slovenije; 1999.
7. Logar J. Parazitologija v medicini. 1st ed. Ljubljana: DZS; 1999.
8. Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF. *Cryptosporidiosis*. *N Engl J Med* 2002; 346: 1723–31.
9. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 145–54.
10. Logar J, Poljšak - Prijatelj M, Andlovic A. Incidence of *Cryptosporidium parvum* in patients with diarrhea. *J Eukaryot Microbiol* 1996; 43: 67.
11. Guerrant RL. *Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat*. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 51–7.
12. Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. *Cryptosporidiosis: epidemiology and impact*. *Microbes Infect* 2002; 4: 1059–66.
13. Petry F, ed. *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis*. Basel: Karger; 2000.
14. Xiao L, Ryan UM. *Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology*. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 483–90.
15. Poljak M, Avšič - Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994; 33: 379–400.
16. Xiao L, Bern C, Sulaiman IM, Lal AA. Molecular epidemiology of human *Cryptosporidiosis*. In: Thompson RCA, Armson A, Ryan UM, eds. *Cryptosporidium: From Molecules to Disease*. Amsterdam: Elsevier; 2003. p. 121–46.
17. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 72–97.
18. Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijawi N, Sulaiman I, Fayer R, et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J Eukaryot Microbiol* 2002; 49: 433–40.
19. Morgan UM, Xiao L, Fayer R, Lal AA, Thompson RC. Epidemiology and strain variation of *Cryptosporidium parvum*. *Contrib Microbiol* 2000; 6: 116–39.
20. Yagita K, Izumiyama S, Tachibana H, Masuda G, Iseki M, Furuya K, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol Res* 2001; 87: 950–5.
21. Enemark HL, Ahrens P, Juel CD, Petersen E, Petersen RF, Andersen JS, et al. Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. *Parasitology* 2002; 125: 331–41.
22. Peng MM, Matos O, Gatei W, Das P, Stantič - Pavlinič M, Bern C, et al. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *J Eukaryot Microbiol* 2001; Suppl: 28–31.
23. Gatei W, Suputtamongkol Y, Waywa D, Ashford RW, Bailey JW, Greensill J, et al. Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 797–802.

24. Ong CS, Eisler DL, Alikhani A, Fung VW, Tomblin J, Bowie WR, et al. Novel cryptosporidium genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 263–8.
25. Peng MM, Xiao L, Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante AA, Weltman AC, et al. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 567–73.
26. Sulaiman IM, Xiao L, Yang C, Escalante L, Moore A, Beard CB, et al. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 681–5.
27. Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ, Slemenda SB, da Silva AJ, Moura IN, Arrowood MJ, et al. New cryptosporidium genotypes in HIV-infected persons. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 444–9.
28. Tiangtip R, Jongwutiwes S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop Med Int Health* 2002; 7: 357–64.
29. Gatei W, Greensill J, Ashford RW, Cuevas LE, Parry CM, Cunliffe NA, et al. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1458–62.
30. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, et al. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis* 2001; 183: 492–7.
31. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Rich SM, Widmer G, et al. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 710–5.
32. McLauchlin J, Pedraza-Diaz S, Amar-Hoetzeneder C, Nichols GL. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3153–8.
33. Fretz R, Svoboda P, Ryan UM, Thompson RC, Tanners M, Baumgartner A. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. isolated from human stool samples in Switzerland. *Epidemiol Infect* 2003; 131: 663–7.
34. Guyot K, Follet-Dumoulin A, Lelievre E, Sarfati C, Rabodonirina M, Nevez G, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3472–80.
35. McLauchlin J, Amar C, Pedraza-Diaz S, Nichols GL. 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: 3984–90.
36. Alves M, Matos O, Antunes F. Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95: 627–32.
37. Morgan U, Weber R, Xiao L, Sulaiman I, Thompson RC, Ndiritu W, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1180–3.
38. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2744–7.
39. Pedraza-Diaz S, Amar C, Iversen AM, Stanley PJ, McLauchlin J. Unusual cryptosporidium species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. *J Med Microbiol* 2001; 50: 293–6.
40. Lowery CJ, Millar BC, Moore JE, Xu J, Xiao L, Rooney PJ, et al. Molecular genotyping of human cryptosporidiosis in Northern Ireland: epidemiological aspects and review. *Ir J Med Sci* 2001; 170: 246–50.
41. Learmonth JJ, Ionas G, Pita AB, Cowie RS. Identification and genetic characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato Region of New Zealand. *Water Sci Technol* 2003; 47: 21–6.
42. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, et al. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 1994; 331: 161–7.
43. Morgan U, Xiao L, Sulaiman I, Weber R, Lal AA, Thompson RC, et al. Which genotypes/species of *Cryptosporidium* are humans susceptible to? *J Eukaryot Microbiol* 1999; 46: 42–43.
44. Gatei W, Ashford RW, Beeching NJ, Kamwari SK, Greensill J, Hart CA. *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 204–6.
45. Xiao L, Bern C, Arrowood M, Sulaiman I, Zhou L, Kawai V, et al. Identification of the cryptosporidium pig genotype in a human patient. *J Infect Dis* 2002; 185: 1846–8.
46. Šoba B. Ugotavljanje vrst in genotipov prazivali *Cryptosporidium* spp. pri ljudeh s kriptosporidiozo v Sloveniji [magistrsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2004.