

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
Zemědělská fakulta v Českých Budějovicích

Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat

Studijní program: M4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Výskyt prvoků střev u selat před odstavem a po odstavu

**The occurrence of Coccidiosis in the intestine of sucking pigs
before and after weaning**

Vedoucí diplomové práce:

prof. MVDr. Jiří Vítovec, DrSc.

Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat

Konzultant diplomové práce:

Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Parazitologický ústav AV ČR

Vypracovala:

Jiřina Kotilová

Akademická knihovna JU



3291023474

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat

Akademický rok: 2005/2006

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jiřina KOTILOVÁ**

Studijní program: **M4103 Zootechnika**

Studijní obor: **Zootechnika**

Název tématu: **Výskyt prvoků střev u selat před odstavem a po odstavu.**

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

Úvod a cíl: Výskyt prvoků u selat před odstavem a po odstavu patří mezi aktuální problémy. Kokcidie *Isoospora suis* patří mezi nejčastější původce hromadných průjemových onemocnění u selat a kokcidie rodu *Cryptosporidium* je v současnosti v chovech selat velmi rozšířena. Cílem diplomové práce je zjistit jaká je prevalence, intenzita a sezónní dynamika těchto prvoků ve sledovaných chovech a jaký vliv má způsob odchovu selat na výskyt těchto parazitů.

Literární přehled: Využijte doporučenou domácí i zahraniční odbornou literaturu.

Materiál a metody: Shromáždíte směsné vzorky výkalů selat před odstavem i po odstavu a vyšetříte flotací v Sheatherově cukerném roztoku.

Výsledky: Vyhodnotíte prevalenci, intenzitu a sezónní dynamiku zjištěných parazitů střev u různých věkových kategorií selat.

Diskuse: Srovnáte vlastní výsledky s výsledky uvedenými v domácí i vybrané zahraniční odborné literatuře.

Souhrn: Krátce uvedete nejdůležitější poznatky z vlastní práce.

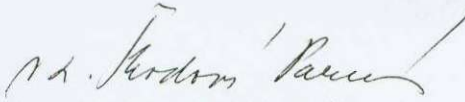
Diplomová práce vychází z řešeného grantu MSM 60076658.

Rozsah práce: **přibližně 40 stran**
Rozsah příloh: **tabulky a grafy**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

- Rommel, M. et al., 2000: Veterinärmedizinische Parasitologie, 5 Auflage, Parey Buchverlag, Berlin**
Fereyt, W.J., 1997: Veterinary parasitology. Reference manual. Fourth Edition, Washington State University
Chroust, K. a kol., 1998: Veterinární protozoologie, skripta, Brno.
Koudela, B. 1999: Kokcidióza sajících selat. Vet.Med-Czech, 44: 183-191.
Lukešová, D. a kol., 1997: Parazitózy prasat - ekonomická závažnost a možnosti využití antiparazitik. Náš chov 48: 48-50.

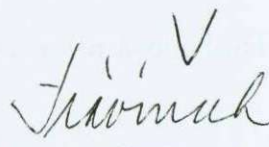
Vedoucí diplomové práce: **prof. MVDr. Jiří Vítovec, DrSc.**
Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat
Konzultant diplomové práce: **Ing. Martin Kváč, Ph.D.**
Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat
Datum zadání diplomové práce: **23. března 2006**
Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2008**



prof. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.

děkanka

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice



doc. Ing. Jan Trávníček, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 23. března 2006

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „**Výskyt prvoků střev u selat před odstavem a po odstavu**“ vypracovala na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích dne 30. dubna 2008

Kotilová

Jiřina Kotilová

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu diplomové práce prof. MVDr. Jiřímu Vítovci, DrSc., konzultantovi Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. a Ing. Ludmile Landové za odborné vedení, připomínky a cenné rady při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Katedry anatomie a fyziologie hospodářských zvířat a laboratoře Lékařské a veterinární parazitologie parazitologického ústavu AV ČR, kteří mi pomáhali při práci v laboratoři. Poděkování patří i zemědělským podnikům a jejich zaměstnancům za poskytnuté informace a materiály. Zvláštní poděkování patří i celé mé rodině.

Diplomová práce na téma: „Výskyt prvků střev u selat před odstavením a po odstavení“

vychází z řešeného grantu:

MSM 60076658

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1. Úvod..... | 1 |
| 2. Literární přehled..... | 2 |
| 2.1. Základní parazitologické pojmy..... | 2 |
| 2.2. Dělení parazitů..... | 2 |
| 2.3. Přehled systému prvků..... | 5 |
| 2.3.1. Taxonomické zařazení druhu <i>Giardia intestinalis</i> | 5 |
| 2.3.2. Taxonomické zařazení rodů <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Eimeria</i> spp. a <i>Isospora</i> ...5 | |
| 2.4. Kokcidie a kokcidióza..... | 6 |
| 2.4.1. Historie a rozšíření isosporózy..... | 6 |
| 2.4.2. Morfologie kokcidie druhu <i>Isospora suis</i> | 7 |
| 2.4.3. Vývojový cyklus kokcií..... | 7 |
| 2.4.3.1. Endogenní vývoj..... | 7 |
| 2.4.3.2. Exogenní vývoj..... | 8 |
| 2.4.4. Zdroje a šíření isospor..... | 9 |
| 2.4.5. Průběh a klinické příznaky isosporózy selat..... | 10 |
| 2.4.6. Patologický nález..... | 10 |
| 2.4.7. Terapie a preventivní opatření..... | 11 |
| 2.5. Rod <i>Eimeria</i> | 12 |
| 2.5.1. Morfologie..... | 12 |
| 2.5.2. Klinické příznaky..... | 15 |
| 2.5.3. Diagnostika..... | 15 |
| 2.5.4. Léčba a prevence..... | 15 |
| 2.6. Giardia a Giardióza..... | 16 |
| 2.6.1. Historie výzkumu giardiózy..... | 16 |
| 2.6.2. Morfologie <i>Giardia intestinalis</i> | 16 |
| 2.6.3. Lokalizace a vývojový cyklus giardií..... | 17 |
| 2.6.4. Patogeneze a klinické příznaky giardiózy..... | 18 |
| 2.6.5. Diagnostika giardií..... | 19 |
| 2.6.6. Terapie a prevence giardiózy..... | 19 |
| 2.7. Kryptosporidie a kryptosporidióza..... | 20 |
| 2.7.1. Systematika kryptosporidií..... | 20 |
| 2.7.2. Historie výzkumu kryptosporidiózy..... | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 2.7.3. Morfologie <i>Cryptosporidium</i> spp. | 21 |
| 2.7.4. Vývojový cyklus kryptosporidií..... | 22 |
| 2.7.5. Lokalizace kryptosporidií..... | 23 |
| 2.7.6. Klinické příznaky kryptosporidiózy..... | 23 |
| 2.7.7. Diagnostika kryptosporidií..... | 24 |
| 2.7.8. Prevalence a léčba kryptosporidiózy..... | 24 |
| 2.7.9. Kryptosporidie a kryptosporidióza prasat..... | 25 |
| 2.7.9.1. <i>Cryptosporidium suis</i> | 26 |
| 2.7.9.2. <i>Cryptosporidium</i> pig genotyp II..... | 26 |
| 2.7.9.3. <i>Cryptosporidium parvum</i> | 26 |
| 3. Materiál a metodiky..... | 28 |
| 3.1. Charakteristika sledovaných chovů..... | 28 |
| 3.1.1. Chov prasnic a odstavených selat ve Vrátně..... | 28 |
| 3.1.2. Chov prasnic a odstavených selat v Libníči..... | 29 |
| 3.1.3. Chov prasnic a odstavených selat ve Vraníně..... | 29 |
| 3.2. Odběr biologického materiálu pro parazitologické vyšetření..... | 30 |
| 3.3. Koprologické vyšetření flotačně - koncentrační metodou..... | 31 |
| 3.4. Barvení oocyst kryptosporidií anilin-karbol-methyl violetí dle Miláčka a Vítovce (1985)..... | 32 |
| 3.5. Hodnocení intenzity infekce nalezených parazitů..... | 33 |
| 3.5.1. Odhad intenzity výskytu oocyst kokcií <i>Isospora suis</i> , <i>Eimeria</i> spp., <i>Giardia</i> intestinalis a <i>Cryptosporidium</i> spp. (při vyšetření flotační metodou) | 33 |
| 3.5.2. Odhad intenzity výskytu <i>Cryptosporidium</i> spp. (OPG)..... | 33 |
| 3.6. Genotypizace kryptosporidií..... | 34 |
| 3.6.1. Izolace DNA..... | 34 |
| 3.6.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 34 |
| 3.6.2.1. PCR - Kryptosporidie..... | 34 |
| 3.6.3. Gelová elektroforéza..... | 35 |
| 3.6.4. Příprava vzorků na sekvenaci..... | 36 |
| 3.6.5. PCR-RFLP analýza kryptosporidií..... | 37 |
| 4. Výsledky..... | 38 |
| 4.1. Frekvence výskytu sledovaných parazitů v jednotlivých chovech..... | 38 |
| 4.1.1. Libníč..... | 38 |
| 4.1.2. Vrátno..... | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.3. Vranín..... | 40 |
| 4.2. Sezónní dynamika výskytu sledovaných parazitů..... | 41 |
| 4.2.1. Selata sající..... | 41 |
| 4.2.2. Selata po odstavu..... | 42 |
| 4.3. Prevalence sledovaných parazitů dle věku selat..... | 43 |
| 4.3.1. <i>Isospora suis</i> | 43 |
| 4.3.2. Eimerie..... | 43 |
| 4.3.3. Giardie..... | 44 |
| 4.3.4. Kryptosporidie..... | 44 |
| 5. Diskuze..... | 47 |
| 5.1. <i>Isospora suis</i> | 47 |
| 5.2. Eimerie..... | 48 |
| 5.3. Giardie..... | 48 |
| 5.4. Kryptosporidie..... | 49 |
| 6. Závěr..... | 52 |
| 7. Summary..... | 54 |
| 8. Přehled použité literatury..... | 55 |
| 9. Přílohy..... | 66 |

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. ZÁKLADNÍ PARAZITOLOGICKÉ POJMY (Ryšavý a kol. 1989; Kořínková 2006)

- **parazitismus** (cizopasnictví) je v přírodě velmi rozšířený biologický jev, který pomáhá udržovat ekologickou rovnováhu v ekosystémech, patří mezi nejsložitější úrovně vzájemných vztahů dvou organismů. Jedná se o koexistenční vztah organismů, z nichž jeden (parazit) získává výhody na úkor druhého (hostitel) nebo ho nějakým způsobem poškozuje, tedy parazit je metabolicky závislý na svém hostiteli.
- **parazit** je organismus žijící po celý život nebo alespoň jeho část na těle či v těle jiného organismu – hostitele. Parazit žije na úkor jiného organismu (živí se jeho tkáněmi) a je s ním těsně svázán svým životním cyklem.
- **prevalence** je procento hostitelů napadených daným druhem cizopasníka; tj. počet parazitovaných hostitelů dělený celkovým počtem vyšetřených hostitelů krát 100
- **intenzita invaze** je počet jedinců daného druhu parazita na hostiteli či v hostiteli
- **definice životního cyklu parazita:**
“Životní cyklus zahrnuje všechny jevy probíhající v komplexu Parazit – Hostitel – Prostředí od vzniku vajíčka v mateřském jedinci do smrti z tohoto vajíčka vzniklého potomstva, včetně všech vývojových stádií dceřiných jedinců morfologicky nestejnorodých s jedincem mateřským.”

2.2. DĚLENÍ PARAZITŮ

➤ Podle lokalizace

- **ektoparaziti** - cizopasí na povrchu těla hostitele
- **endoparaziti** - cizopasí ve vnitřních orgánech hostitele
- **etopická (netypická) lokalizace:** vzniká, pokud parazit při své migraci hostitelem mine cílový orgán a usadí se na atypickém místě (*Fasciola hepatica* – motolice jaterní v mozku)

➤ Podle vazby na hostitele

- **obligátní** - část jejich životního cyklu nezbytně zahrnuje parazitický způsob života
- **fakultativní** (příležitostní) volně žijící živočichové, kteří mohou za určitých podmínek (např. oslabení hostitele) přejít k parazitickému způsobu života
- **náhodný** – parazit, který napadne živočicha, jenž není jeho normálním hostitelem, ale postupně se může na tohoto nového hostitele adaptovat
- **hyperparazit** – parazit sloužící zároveň jako hostitel pro dalšího cizopasníka
- **pseudoparazit** – organismy nebo jejich části, které při diagnostice parazitů mohou být pro svou vnější podobnost zaměňovány s vývojovými stádii či s dospělci parazitů

➤ Podle časového úseku v životním cyklu kdy parazitují

- **trvalí (permanentní)** - celý životní cyklus parazitují, tedy žijí po celé období své dospělosti uvnitř nebo na povrchu těla svého hostitele (*Trypanosoma sp.*)
- **dočasní (temporální)** - parazitují pouze občas, po určitou část svého života se živí na svém hostiteli a pak ho opouští (komár)

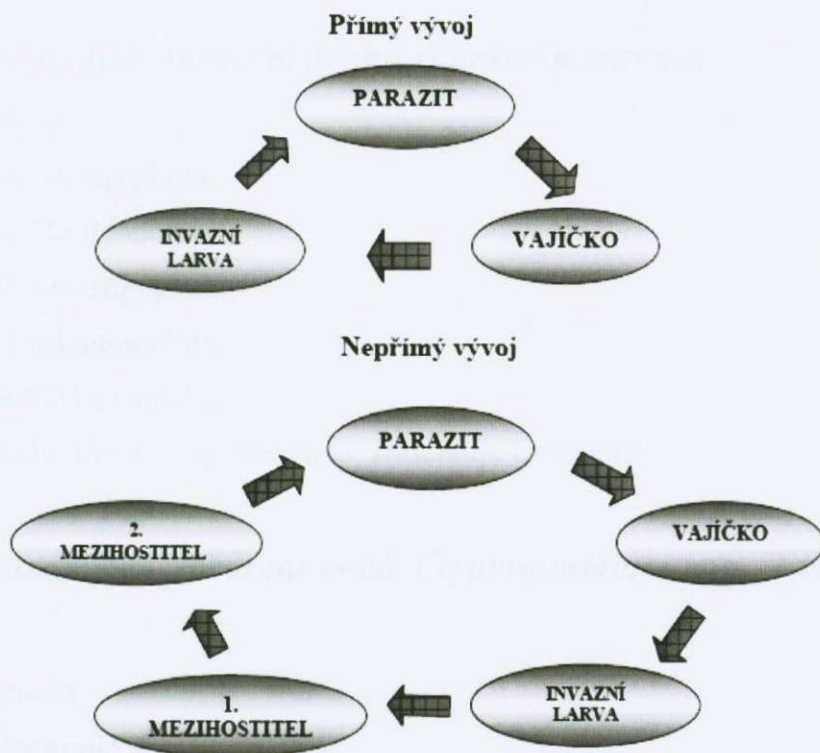
➤ Podle specifity hostitele

- **stenoxenní** - jsou specializováni na určitý druh hostitele (*Isospora suis*)
- **euryxenní** - jsou schopni cizopasit u různých hostitelů (*Toxoplasma gondii*)
- **specifičnost cizopasníka (host specificity)** = schopnost vyskytovat se na či v jednom nebo více druzích hostitelů (spektrum hostitelů), ať již na úrovni definitivního hostitele nebo mezihostitele

➤ Podle typu životního cyklu

- **monoxenní** - ke svému vývoji potřebují jednoho hostitele (*Eimeria tenella*)
- **heterogenní** - ke svému vývoji potřebují více hostitelů (*Toxoplasma gondii*)

Obrázek 1: Typy životních cyklů parazitů (Kořínková 2006)



➤ Podle vazby na hostitele

Stejně jako parazity můžeme i jejich hostitele rozdělit do několika kategorií.

- **definitivní hostitel** - hostitel, v němž parazit dosahuje pohlavní zralosti a produkuje vajíčka či larvy
- **mezihostitel** - hostitel, ve kterém proběhne část vývoje parazita, ale parazit v něm nedosáhne stádia pohlavní dospělosti. V mezihostiteli se vyvíjí většinou tzv. infekční (invazní) stádia, která po vniknutí do definitivního hostitele mohou vyvolat nákazu
- **paratenický** (transportní; rezervoárový) hostitel - živočich, který stojí mimo vlastní životní cyklus parazita (není pravým hostitelem, ani pravým mezihostitelem). V paratenickém hostiteli se mohou kumulovat infekční (invazní) stádia parazita a v něm mohou i delší dobu přežívat, aniž by ztratili schopnost vyvolat novou nákazu.
- **rezervoárový hostitel** - hostitel, který představuje zdroj nákazy parazitem pro ekosystém a umožňuje cizopasníkovi přežívat v podmínkách, kdy není k dispozici vhodný hostitel
- **náhodný hostitel** - hostitel, ve kterém parazit dlouho nepřežívá ani se nevyvíjí, ale atypická migrace jeho larev v těle hostitele může být i patogenní

2.3. PŘEHLED SYSTÉMU PRVOKŮ (Chroust a kol. 1998)

2.3.1. Taxonomické zařazení druhu *Giardia intestinalis*

Podříše: **Protozoa**

Kmen: Sarcomastigophora

Podkmen: Mastigophora

Třída: Zoomastigophora

Řád: **Diplomonadida**

Čeleď: Hexamitidae

Rody: *Giardia*, *Spironucleus*, *Hexamita*, *Octomitus*

2.3.2. Taxonomické zařazení rodů *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp. a *Isospora*

Podříše: **Protozoa**

Kmen: **Apicomplexa**

Třída: Sporozoea

Podtřída: **Coccidia**

Řád: **Eucoccidiida**

Podřád: Eimeriina

Čeleď: Eimeriidae

Rody: *Eimeria*, *Isospora*, *Tyzzeria*, *Wenyonella*, *Caryospora*, *Cyclospora*

Čeleď: Cryptosporidiidae

Rod: *Cryptosporidium*

2.4. KOKCIDIE A KOKCIDIÓZA

Kokcidie jsou obligátně intracelulární jednobuněční protozoární parazité, kteří způsobují klinická onemocnění hospodářských i volně žijících zvířat. Většina kokcidií jsou jednohostitelské druhy, které parazitují v buňkách střevní sliznice a způsobují průjmová onemocnění. Obdobně jako ostatní užitková zvířata je i prase hostitelem mnoha druhů střevních kokcidií (Koudela 1999).

Kokcidióza je jedna z hlavních chorob způsobující průjem u sajících selat, která má významný dopad na produkci prasat. Důvodem není vysoká mortalita, ale poměrně vysoká morbidita a náchylnost postižených selat k sekundárnímu rozvoji bakteriálních a virových infekcí. Selata zaostávají v růstu a značně tím ohrožují parametry produkce prasat a ekonomické výsledky pro producenty (Balounová 2005).

U prasete domácího (*Sus scrofa domestica*) je popsán jeden druh rodu *Isoospora* (Stuart a Lindsay 1986). Kokcidie *Isoospora suis* je taxonomicky řazena společně s ostatními kokcidiemi do kmene Apicomplexa a je původcem klinického onemocnění, která je v literatuře označováno jako kokcidióza sajících selat nebo isosporóza (Koudela 1999).

2.4.1. Historie a rozšíření isosporózy

Přestože kokcidiu *Isoospora suis* a její klinické příznaky po experimentální infekci prasat byly poprvé popsány Biesterem a Murrayem již v roce 1934, první práce věnované klinické kokcidióze jsou až z roku 1976 – O'Neill a Parfitt. Do dnešní doby byla kokcidióza sajících selat prokázána v řadě zemí celého světa. V USA a Kanadě byla *I. suis* diagnostikována u 10 až 15 % selat s průjmovým onemocněním a ekonomické ztráty způsobené kokcidiózou v chovech prasat v USA byly odhadovány na 10 miliónů USD ročně (Lindsay a Blagburn 1994).

O výskytu *I. suis* v ČR poprvé informoval Nápravník v roce 1987. V druhé polovině 80. let v rámci rozsáhlé studie byl v 10 chovech ČR, různých typů technologie zjištěn výskyt kokcidie *I. suis* u 7 % až 62 % selat (Koudela 2000a). V 90. letech byl uváděn výskyt oocyst *I. suis* ve 3,3 % až 40 % vzorků trusu prasat odebraných celkem ve 20 chovech v různých regionech Moravy (Lukešová a kol. 1997).

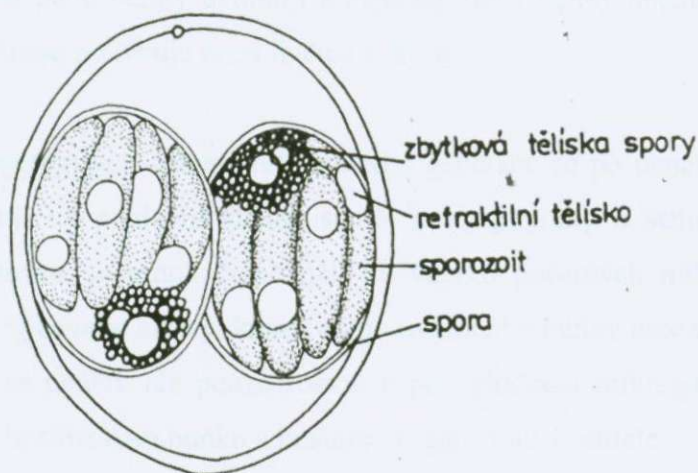
2.4.2. Morfologie kokcidie druhu *Isoospora suis* (obrázek 2)

Kokcidie *I. suis* je jednohostitelský vnitrobuněčný protozoární parazit. Jedním ze základních určujících znaků kokcidií na úrovni druhu je velikost, tvar, barva a charakter obsahu oocyst (Koudela 1999) a to především počet sporocyst a v nich obsažených sporozoitů. Vysporulované oocysty *I. suis* obsahují 2 sporocysty se 4 sporozoity (Chroust a kol. 1998).

Oocysta má sférický až subsférický tvar a její velikost je 17 - 25 x 16 - 22 μm (18,1 x 20,6 μm). Stěna oocysty je hladká, bez mikropyle a má lehce nažloutlou barvu (Chroust a kol. 1998; Koudela 2000a). Síla stěny je 1,5 μm . Vnější obal oocysty je čirý a bezbarvý (Rommel a kol. 2000).

Velikost sporocysty kokcidie rodu *I. suis* je 13,4 x 9,2 μm .

Obrázek 2: Morfologie oocysty *Isoospora suis* (Vojtková 1987)



2.4.3. Vývojový cyklus kokcidií (Chroust a kol. 1998; Koudela 1999), (obrázek 3)

Vývojový cyklus jednohostitelských kokcidií sestává z části, která probíhá v hostiteli (endogenní vývoj) a z části probíhající ve vnějším prostředí (exogenní vývoj).

2.4.3.1. ENDOGENNÍ VÝVOJ

1. **Excystace** je proces uvolňování sporozoitů ze sporocyst a oocyst k němuž dochází po pozření infekční (vysporulované) oocysty v počátečních úsecích trávicího traktu. Mezi faktory podmiňující excystaci patří - tělesná teplota hostitele, koncentrace CO_2 , žaludeční

šťávy, trypsin, žlučové soli, atd. Jejich působením dochází k dezintegraci stěny oocysty, k rozpuštění Stiedova a substiedálního tělíska, k uvolnění švů sporocysty a k uvolnění pohyblivých sporozoitů do lumen střev. Tento proces *in vitro* popsal Lindsay a kol. 1983.

Endogenní vývoj isospor probíhá v cytoplazmě enterocytů tenkého střeva. Nejvíce vývojových stádií se nachází v zadním jejunu a ileu, méně často byla vývojová stádia prokázána v céku a kolonu (Vítovec a Koudela 1990). V průběhu endogenního vývoje je možné rozlišit dva typy merontů (schizontů) a stádia gametogonie.

2. Proces merogonie začíná penetrací sporozoitů do buněk hostitele. Ti pomocí organel apikálního komplexu penetrují buněčnou membránu hostitelské buňky. Uvnitř buňky se sporozoiti zakulacují a mění na jednojaderný meront. Meronty prvního typu mají dvě jádra a dělí se endodygonií, procesem, kdy uvnitř mateřské buňky - merontu vznikají dva merozoity. Druhý typ merontů je vícejaderný a vzniká z něho až 16 merozoitů. Vzniklí merozoiti se po rozpadu buňky uvolňují a napadají další buňky hostitele. Počet generací merogonie se většinou pohybuje mezi dvěma a čtyřmi.

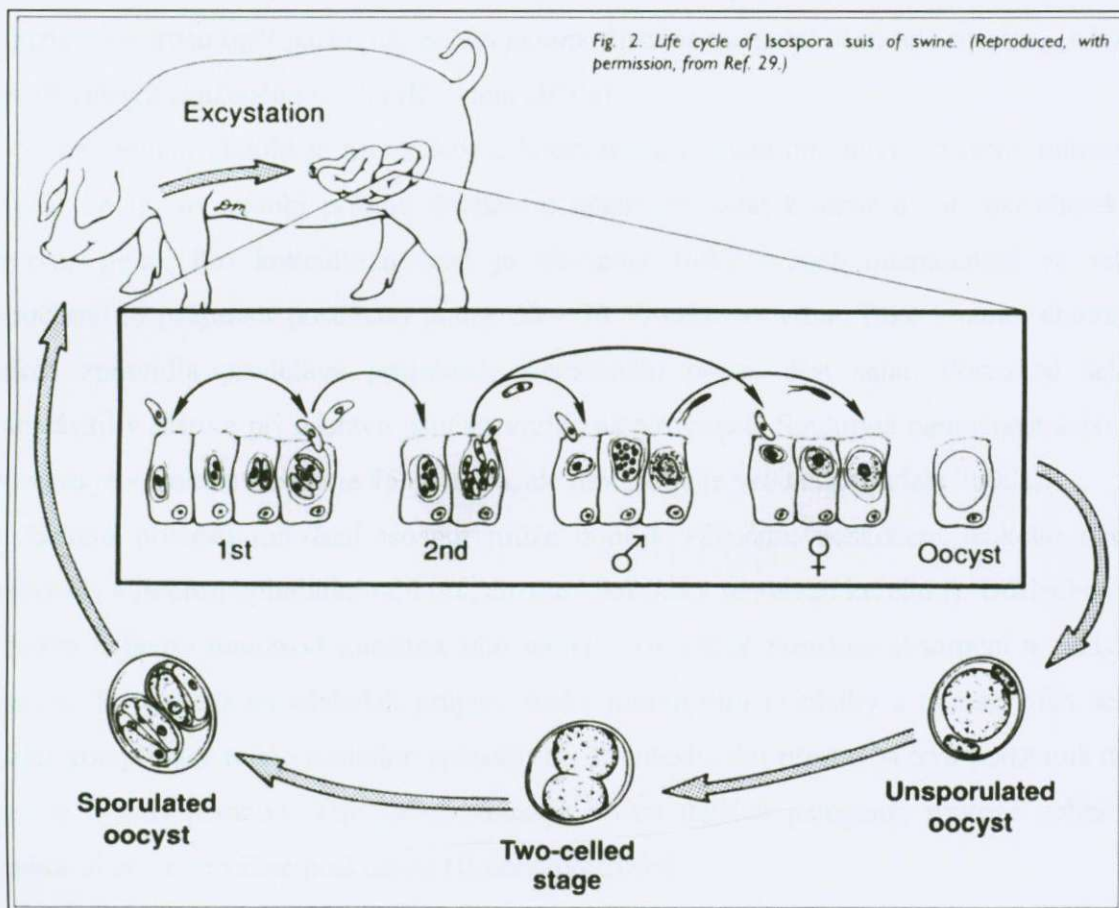
3. Proces gametogonie – merozoiti poslední generace se po penetraci do hostitelské buňky transformují na pohlavní stádia, samčí mikrogamonty a samičí makrogamonty. Jádro **mikrogamontu** se mnohočetně dělí za vzniku početných mikrogamet. Ty jsou protáhlého tvaru, vybavené bičíky, které jim po uvolnění z buňky umožňují aktivní pohyb. **Makrogamonty** se nedělí, ale pouze rostou a po oplodnění mikrogametou se mění na zygotu, opouštějí hostitelskou buňku a posléze i organismus hostitele.

2.4.3.2. EXOGENNÍ VÝVOJ

4. Sporulace je proces, při kterém se finální část vývojového cyklu - **sporogonie**, ve vnějším prostředí mění na infekční oocystu. Z hostitelské buňky se uvolňují nezralé oocysty dělící se ze stadia jedné buňky tzv. sporontu přes sporoblasty na finální, infekce schopné sporozoity. Průběh zrání oocyst je ovlivněn vlhkostí, teplotou a přítomností kyslíku. Doba sporulace oocyst *I. suis* je ve srovnání s jinými druhy kokcií savců velmi krátká. Při teplotě 20 °C jsou oocysty infekční za 56 hodin a při teplotě 25 °C již za 40 hodin. Nejrychlejší sporulace je při teplotě 37 °C. Při této teplotě jsou oocysty plně infekční již za 12 hodin (Lindsay a kol. 1984; Ernst a kol. 1986). Tato vlastnost oocyst *I. suis* má významný vliv pro rychlé šíření isosporózy v chovech prasat.

První oocysty v trusu selat se objevují za čtyři až pět dní po infekci. Tato doba se označuje jako prepatentní perioda. Patentní periodou se rozumí doba, po kterou jsou oocysty vylučovány trusem. U *I. suis* trvá 8 až 16 dní a má cyklický charakter s dvěma až třemi vrcholy vylučování v intervalu pěti dní (Vítovec a Koudela 1990). Christensen a Henriksen (1994) uvedli trvání prepatentní periody 5 až 7 dní, délku trvání patentní periody 8 až 16 dní. Ta je rozdělena na dvě až tři fáze. Cyklický charakter vylučování oocyst naznačuje možnost existence extraintestinálních stádií *I. suis*.

Obrázek 3: Vývojový cyklus kokcidie *Isospora suis* (Lindsay a Blagburn 1994)



2.4.4. Zdroje a šíření isospor

Problém zdroje a šíření infekčního agens, tj. oocyst *I. suis*, byl v odborné literatuře dlouho diskutován. Původně se předpokládalo, že zdrojem infekce selat jsou prasnice. Tuto domněnku však další detailní sledování prasnic v chovech s isosporózou selat nepotvrdilo (Lindsay a kol. 1984; Koudela a kol. 1986a). Tím nejdůležitějším zdrojem infekce je vnější prostředí kontaminované oocystami *I. suis*. Tento předpoklad je nepřímým potvrzen

pozitivním vlivem asanace vnějšího prostředí a terapie zaměřená na selata a tím na snížení výskytu isosporózy v chovech (Lindsay a Blagburn 1994).

2.4.5. Průběh a klinické příznaky isosporózy selat

Isosporóza se projevuje jako akutní průjmové onemocnění, které postihuje selata 5 až 15 dní stará. Ojedinele se klinické onemocnění, spojené s infekcí *I.suis*, vyskytuje u selat v období odstavu. Trus postižených selat je nejprve pastovitý, v průběhu jednoho až dvou dnů přechází ve žlutý, vodnatý, nekrvavý průjem, který přetrvává 3 až 5 dnů, kdy je konzistence trusu opět pastovitá. Selata jsou potřísněna na zadní části těla trusem a v kotci se šíří zápach zkaženého mléka (Koudela 2000a).

V následném období je trus kašovitě konzistence a může obsahovat zvýšené množství hlenu. Po tomto období průjmu dochází u některých selat k zácpě a trus má charakter žlutých pelet. Pro kokcidiózu selat je charakteristický průběh onemocnění ve vrhu. Současně je průjmem postiženo pouze 30 - 75 % selat ve vrhu. Také v rámci chovu či sekce zpravidla prodělává průjmové onemocnění pouze část selat. Postižená selata zaostávají v růstu a při odstavu jsou ve vrzích nevyrovnaná. Souhrnná nemocnost selat do odstavu je vysoká a dosahuje 75 - 100 %, ale morbidita je vzácná (Koudela 2000a).

Během procesu množení isospor může dojít k vážnému poškození tenkého střeva (jejunum a ileum), epiteliální odumrtí, atrofie klků (klky se stávají kratšími). Důsledkem je zničení velkého množství intestinálního epitelu což vážně porušuje absorpční a zažívací funkci. To vše má za následek průjem, nízké hmotnostní přírůstky a pomalý růst selat. Další komplikace může následně způsobit to, že intestinální přestavba trvá podstatně déle než je cyklus parazita. Tím se povzbuzuje invazi dalších patogenů, protože ochranná funkce sliznice je vážně poškozena (Balounová 2005).

2.4.6. Patologický nález (Koudela a Vítovec 1987)

Patologické změny vyvolané *I.suis* jsou nejvíce patrné 7. až 14. den života selete. Nejčastěji a nejhůře bývá postižena kaudální oblast středního jejunum a kranální oblast zadního jejunum. Většina endogenních fází *I.suis* napadá epitel vrcholků klků.

Makroskopický nález ve střevech nakažených zvířat je variabilní a mění se od katarálního zánětu až po nekrotickou enteritidu. Nahodile byly zaregistrovány fibrino - nekrotické pseudomembrány na vnitřním povrchu tenkého střeva.

V histologickém obrazu je dominantní atrofie klků různé intenzity, srůsty klků, metaplazie epitelových buněk, ve vážných případech s nekrózou vrcholových částí klků a hyperplazií střevních krypt. Vážné postižení mívá občas za následek kompletní ztrátu klků.

2.4.7. Terapie a preventivní opatření

Střevní výstelka se regeneruje velmi rychle po ukončení průjmu, ale střevní klky zůstávají atrofované dlouhodobě. Tím dochází ke zmenšení resorpční plochy střeva (Macek 2006).

V minulosti byla využívána celá řada léčebných preparátů, ale výsledky nebyly jednoznačné. Dnes se využívá antikocidika toltrazuril (BAYCOX®), které bylo vyvinuto proti kokcidióze drůbeže. Vzhledem k negativnímu vlivu isospor na resorpční schopnosti střeva není efektivní terapeutický zásah, ale metafylaktické použití, které zlikviduje počáteční infekci a nastartuje vznik doživotní imunity (Macek 2006).

Proto je důležité podání přípravku v době, kdy ještě nedošlo k poškození střevní sliznice, tj. 3 až 5 dní po narození. Přípravek se podává orálně v jednorázové dávce všem selatům ve vrhu. Doba podání preparátu je velmi výhodná, protože může být jednotná s obvyklou aplikací železa selatům. Rychlá léčba může zpomalit nebo utlumit rozvoj reinfekce a může zkrátit období klinických příznaků, zmenšit počet vylučovaných oocyst do prostředí, zmírnit průjem a zmenšit pravděpodobnost sekundární infekce a úhynu. Následně se také snižuje množství používaných antibiotik a stoupá uniformita selat ve vrhu (Balounová 2005).

Z hlediska prevence je nutné dodržovat všechna zoohygienická opatření a provádět důkladnou asanaci. Oocysty kokcidií jsou však ve vnějším prostředí extrémně odolné a zůstávají infekceschopné po dlouhou dobu. Odolávají také běžným asanačním postupům a dezinfekčním prostředkům. Pouze desinfekční látky na bázi čpavku jsou schopny devitalizovat oocysty kokcidií. Z fyzikálních faktorů se na devitalizaci oocyst kokcidií doporučuje horká pára (> 70 °C) (Tubbs 1987, Larsen 1996).

2.5. ROD *EIMERIA*

Podobně jako u mláďat jiných druhů hospodářských zvířat (telat, jehňat a kůzlat) je i eimeriíza prasat vyvolána početnou skupinou kokcií z rodu *Eimeria* (Daughies a kol. 2004). U prasat bylo do roku 2002 popsáno 13 druhů kokcií rodu *Eimeria* (Daughies a kol. 2002). Eimerie mají velký význam u různých druhů zvířat, ale u prasat jsou považovány za méně důležité, protože přirozené infekce bývají pouze sporadicky spojovány s klinickou nemocí (Daughies a kol. 2004).

2.5.1. Morfologie

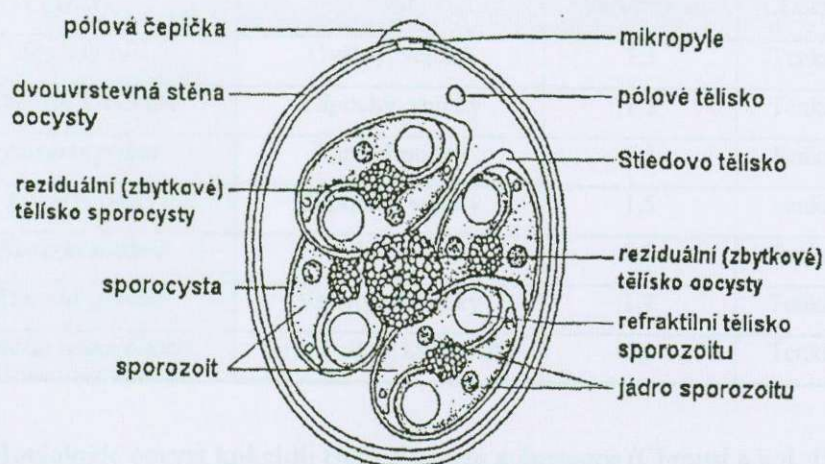
Kokcie rodu *Eimeria* jsou stejně jako *Isospora suis* monoxenní (jednohostitelský) vnitrobuněční protozoární parazit, jejichž celý vnitrobuněčný cyklus až po vytvoření oocysty proběhne v buňkách jednoho hostitele. Oocysty zrají na vzduchu mimo tělo hostitele a během sporulace se v nich vytváří 4 sporocysty. V každé sporocystě vznikají 2 infekční stádia – sporozoiti. Morfologie vysporulovaných oocysty a doba sporulace jsou důležité pro druhové určování eimerií (Ryšavý a kol. 1989). Morfologii některých druhů eimerií uvádí tabulky 1 a 2.

Sporozoit eimerií je rohlíčkovitého tvaru s centrálně uloženým jádrem a s apikálním komplexem na „předním“ konci. Sporozoiti leží uvnitř sporocyst. Sporocysta má relativně tenkou, jednovrstevnou stěnu. Procesu excystace napomáhají Stiedova tělíška na jednom z pólů sporocysty. Stěna oocysty je dvojitá, na jednom z pólů s výrazným ztenčením, tzv. mikropyle. Pro některé druhy je typická tzv. pólová čepička, překrývající mikropyle zevně. Tyto struktury rovněž slouží v procesu uvolňování sporocyst, resp. sporozoitů z oocyst (Chroust a kol. 1998). Morfologii oocyst uvádí obrázky 4 a 5.

Oocysty *Eimerií spp.* se ve vnějším prostředí stávají infekceschopné po 5 až 12 dnech, v závislosti na druhu *Eimeria* (Karamon a kol. 2007).

Rychlost sporulace je také ovlivněna teplotou vnějšího prostředí. Zatímco isospory sporulují nejrychleji při teplotě 37 °C, sporulace eimerií se při teplotách nad 30 °C výrazně zpomaluje (Koudela 1999).

Obrázek 4: Oocysta kokcidie rodu *Eimeria* (Chroust a kol. 1998).



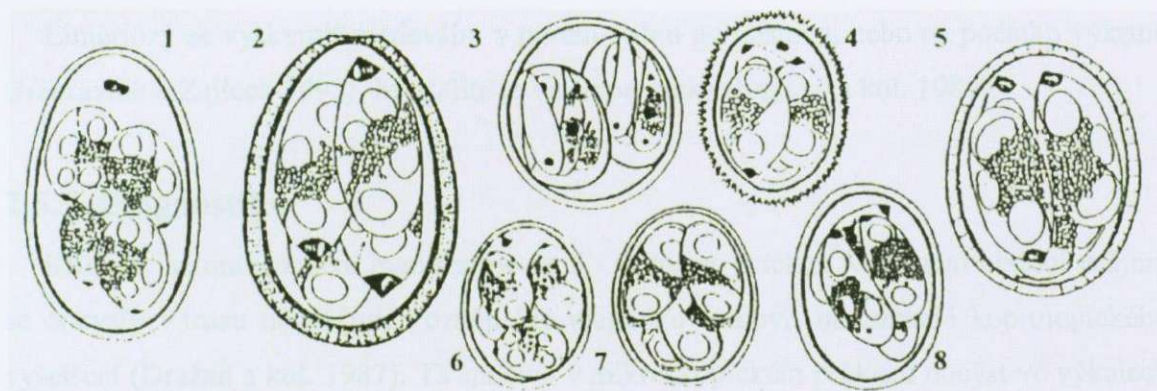
Tabulka 1: Morfologie nejčastějších druhů rodu *Eimeria* u prasat (Rommel a kol. 2000)

| Druh | Velikost (μm) | | Mikro- pyle | Vnější obal oocysty | Sporulace (dny) | Prepat. perioda (dny) |
|--|---------------------------------|------------|----------------|---|--------------------|-----------------------------|
| | Oocysta | Sporocysta | | | | |
| <i>Eimeria debliceki</i> Douwes, 1921 | 15-23 × 11-18 (18,8 × 14,3) | 11,5 × 5,3 | - | Čirý, bezbarvý až lehce žlutohnědý | 5 - 7 | 6,5 |
| <i>Eimeria suis</i> Nöller, 1921 | 15-23 × 12-18 (18,2 × 14,0) | 8,4 × 5,8 | - | Čirý, bezbarvý | 5 - 6 | 10 |
| <i>Eimeria scabra</i> Henry, 1931 | 28-35 × 20-24 (31,2 × 11,18) | 17,1 × 7,8 | + | Silně drsný, hnědý (může chybět) | 8 - 9 | 8 - 9,5 |
| <i>Eimeria perminuta</i> Henry, 1931 | 12-15 × 10-13 (13,3 × 11,7) | 6,9 × 5,0 | - | drsný, žlutý | 10 - 12 | |
| <i>Eimeria spinosa</i> Henry, 1931 | 17-24 × 12-19 (20,6 × 16,2) | 11,1 × 5,6 | - | Drsný, nahnědlý s ostny | 9 - 10 | 8 - 9 |
| <i>Eimeria polita</i> Henry, 1931 | 20-33 × 14-22 (25,9 × 18,1) | 16,3 × 6,6 | - | Lehce drsný, lehce nahnědlý (může chybět) | 5 - 8 | 8 - 9 |
| <i>Eimeria porci</i> Henry, 1931 | 18-30 × 13-19 (23,2 × 15,7) | 9,7 × 6,5 | + | Čirý, bezbarvý až lehce žlutohnědý | 6 - 8 | 7 |
| <i>Eimeria spinosa</i> Henry, 1931 | 17-26 × 13-20 (21,2 × 15,8) | 12,9 × 6,3 | - | Čirý, bezbarvý | 13 | 10 |

Tabulka 2: Morfologie oocyst rodu *Eimeria* u prasat (Rommel a kol. 2000)

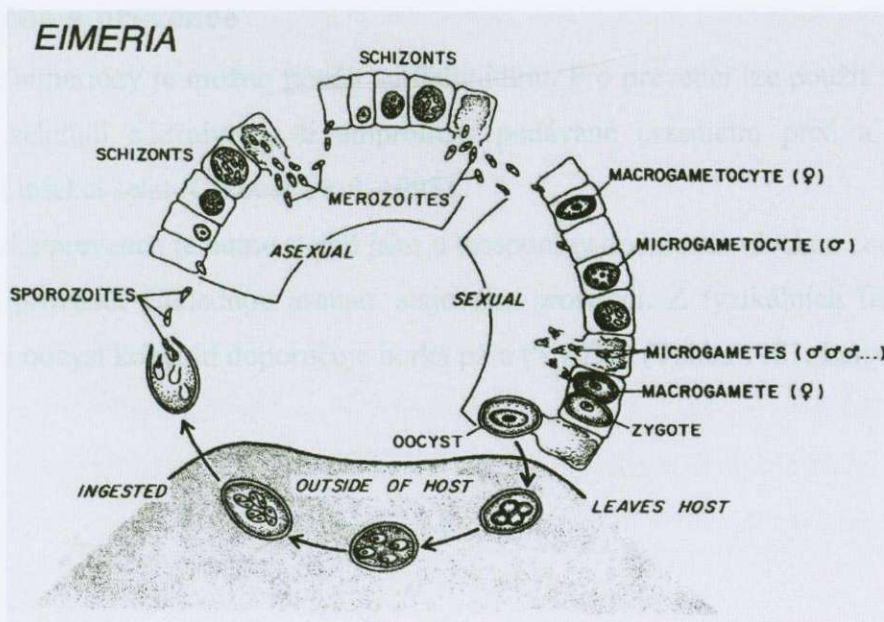
| Druh | Tvar | Síla stěny μm | Lokalizace |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------|
| <i>Eimeria suis</i> | Oválný, vejčitý | 1,3 | Tenké střevo |
| <i>Eimeria deblickei</i> | Eliptický, vejčitý | 1,3 | Tenké střevo |
| <i>Eimeria polita</i> | Tupě eliptický | 1,5 | Tenké střevo |
| <i>Eimeria porci</i> | Eliptický, vejčitý | 1,5 | Tenké střevo |
| <i>Eimeria scabra</i> | Eliptický | 2,0 | Tenké střevo |
| <i>Eimeria spinosa</i> | Vejčitý, eliptický | 1,2 | Tenké střevo |
| <i>Eimeria neodeblickei</i> | Široce eliptický, vejčitý | 1,2 | Tenké střevo |

Obrázek 5: Morfologie oocyst kokcií rodu *Eimeria* a *Isospora* (Chroust a kol. 1998)



1 – *E. porci*, 2 – *E. scabra*, 3 – *Isospora suis*, 4 – *E. spinosa*, 5 – *E. polita*, 6 – *E. suis*, 7 – *E. neodeblickei*, 8 – *E. deblickei*

Obrázek 6: Životní cyklus *Eimeria* spp. (Foreyt 2001)



2.5.2. Klinické příznaky

Eimerióza je obecně závažné celkové onemocnění, u starších selat probíhající mírněji či latentně (Dražan a kol. 1987). Akutní nákaza se projevuje různě podle toho, jakými druhy eimerií je způsobena a v jakém probíhá hostiteli (Ryšavý a kol. 1989). Za nejpatogeničtější druhy se považují *E. deblickei*, *E. scabra*, *E. polita*, *E. spinosa* (Chroust a kol. 1998). Společným jmenovatelem je průjmové onemocnění provázené žízní, dehydratací, nechutenstvím, úbytkem na hmotnosti a zaostáváním v růstu (Rommel a kol. 2000). Onemocnění bývá zhoršováno souběžně probíhajícími infekcemi bakterií a virů, které mohou mít letální vliv (Nápravník a Zajíček 1993, Vítovec a kol. 1990).

Starší prasata mívají průběh asymptomatický, nebo vykazují jen všeobecné klinické příznaky a mohou být tak zdrojem infekce pro mladší selata (Weng a kol. 2005).

Eimeriózy se vyskytují především v prvním týdnu po odstavu, nebo na počátku výkrmu (Nápravník a Zajíček 1993). Mortalita je většinou nízká (Ryšavý a kol. 1989).

2.5.3. Diagnostika

Klinicky se onemocnění manifestuje za 5 - 8 dní po infekci. V časném období průjmů se oocysty v trusu nezjišťují. Později lze diagnózu stanovit na základě koprologického vyšetření (Dražan a kol. 1987). Ta spočívá v mikroskopickém průkazu oocyst ve výkalech prasat. Nejvhodnější je použití flotačně-koncentračních metod používaných i pro stanovení přítomnosti oocyst isospor. Klasifikace druhů je založena na rozdílné velikosti oocyst a určení přesné doby sporulace (Rommel a kol. 2000).

2.5.4. Léčba a prevence

K léčbě eimeriózy je možno použít sulfadimidinu. Pro prevenci lze použít salinomycin podávaný selatům s krmivem, či amprolium podávané prasnicím před a po porodu zabraňující infekci selat (Chroust a kol. 1998).

Z hlediska prevence je nutné stejně jako u isosporózy dodržovat všechna zoohygienická opatření a provádět důkladnou asanaci stájového prostředí. Z fyzikálních faktorů se na devitalizaci oocyst kokcidií doporučuje horká pára (> 70°C) (Tubbs 1987, Larsen 1996).

2.6. GIARDIE A GIARDIÓZA

Toto onemocnění je způsobeno protozoálním parazitem *Giardia intestinalis* (syn. *Lambliia intestinalis*, *Giardia lamblia*). Giardie se vyznačují malou hostitelskou specifikou. Parazitují v trávicím traktu řady druhů zvířat a člověka. Taxonomicky patří tyto prvoci mezi bičíkovce (třída Zoomastigophora, řád Diplomonadina, čeleď Hexamitidae). V roce 1979 WHO zařadila giardiózu mezi zoonózy. Díky jejich zoonotickému potenciálu je jim v dnešní době věnována pozornost především v humání medicíně (Koudela 1995).

2.6.1. Historie výzkumu giardiózy

Prvním člověkem který spatřil giardie již v roce 1681 byl holandský vynálezce mikroskopu Anthony van Leeuwenhoek. V roce 1859 byl parazit popsán již jako bičíkovec *Cercomonas intestinalis* českým lékařem Vilémem Lamblem. Na jeho počest byl později parazit přejmenován protozoologem Blanchardem na *Lambliia intestinalis*. Rodový název *Giardia* použil poprvé německý protozoolog Kunstler při popisu bičíkovců ve střevech žab. Následně se pojmenování giardií ještě několikrát změnilo. Někteří vědci třídili giardie podle hostitele, jiní zase podle morfologické struktury. V roce 1952 vydal Filice podrobný morfologický popis giardií a navrhl rozdělení pouze na tři druhy: *G. duodenalis*, vyskytující se u lidí a zvířat, *G. agilis* parazitující u obojživelníků a *G. muris* u hlodavců. Dnes jsou uznávány ještě další dva druhy u ptáků (*G. ardeae* a *G. psittaci*). V současnosti je popis druhů založen na morfologických rozdílech objevených světelným mikroskopem (Adam 2001).

Cysty giardií v trusu prasat byly poprvé pozorovány Freyem a Meleneyem v roce 1932 a popsány v Korei Yangem (1975) a v Íránu Mirzayansem (1976) (cit. Koudela 1995).

2.6.2. Morfologie *Giardia intestinalis* (obrázek 7)

Giardie mají hruškovité tělo bilaterálně symetrické, se zdvojenými organelami. Pohybliví trofozoiti jsou dorzoventrálně ploštělé, přední část těla mají zaoblenou, zadní zašpičatělou. Mají 2 nápadná jádra lokalizovaná v přední třetině těla a 2 mediální tělíška dosud neznámé funkce. Chybí jim Golgiho komplex a mitochondrie. Cytoskeleton giardií sestává z adhezivního konkávního disku, který je vyztužen fibrilami a je umístěn na ventrální straně těla, kde zabírá asi dvě třetiny povrchu. Je obklopen lemem, který

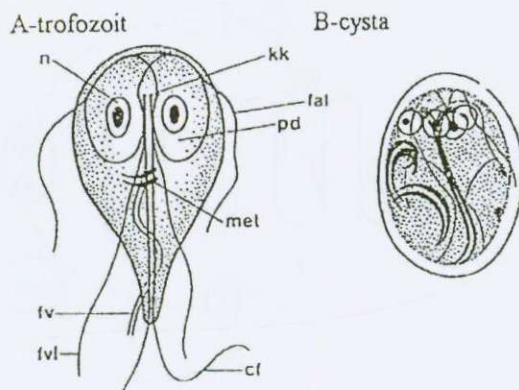
napomáhá spojení s povrchem střevní sliznice. Mediánní tělíska a adhezivní disk jsou pro giardie charakteristické (Adam 2001).

Čtyři páry bičků vycházejí z komplexu kinetozomů umístěných v přední části těla v blízkosti jader. Lze rozeznat 6 předních a 2 vlečné bičky, které procházejí tělem a vyúsťují po stranách zádi. Bičky slouží jako organela pohybu, ale jejich další funkce nebyla ještě přesně prozkoumána (Adam 2001).

Potrava je přijímána povrchem těla pinocytózou. Giardie se reprodukují binárním dělením. Tvoří oválné čtyř jaderné cysty, které jsou vylučovány trusem (Chroust a kol. 1998).

Trofozoit je vegetativní forma giardií. Je 9 – 21 μm dlouhý, 6 – 12 μm široký a 2 – 4 μm tlustý. Cysty se formují z trofozoitů vytvořením stěny a duplikací intracelulárních struktur. Jsou ovoidního tvaru a měří 8 – 12 \times 7 – 10 μm , se silou stěny 0,3 μm . Obsahují 4 jádra umístěná v blízkosti jednoho pólu.

Obrázek 7: *Giardia intestinalis* (Rebanová 1998) fal – anterolaterální bičky, cf – kaudální bičky, fv – ventrální bičky, fvl – ventrolaterální bičky, kk – komplex kinetosomů, met – mediánní tělíska, n – jádra, pd – přísavný disk



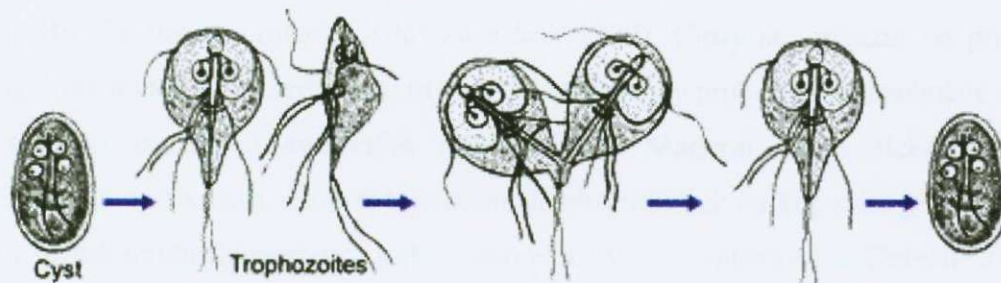
2.6.3. Lokalizace a vývojový cyklus giardií (Koudela 1995), (obrázek 9)

Vývojový cyklus giardií je přímý bez mezihostitele. Infekci hostitele může způsobit i velmi malé množství cyst (méně než 10). Cysty jsou přijaty perorálně s potravou, vodou, nebo přímo z fekálií. Excystace je započata v kyselém prostředí žaludku. Trofozoiti se následně uvolňují v tenkém střevě a podélně se dělí. Z jedné oocysty se uvolní dva trofozoiti. Giardie nepronikají do buněk, ale pomocí bičků a adhezivního disku se uchycují na povrchu sliznice duodena a jejunu. V lumen střeva se intenzivně množí

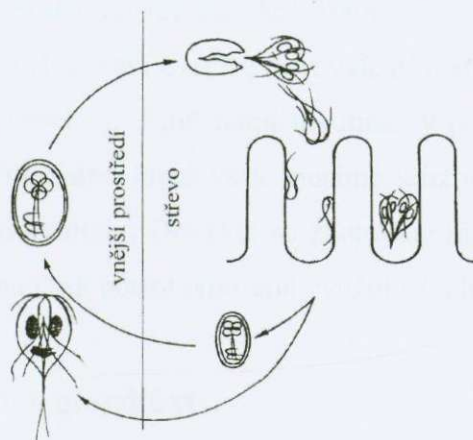
podélným (binárním) dělením – viz. obrázek 8. Po namnožení bičíkatá stádia pokrývají souvisle prakticky celý povrch střevní sliznice.

Po vystavení působení žlučovým kyselinám někteří trofozoiti vytváří cysty a společně s výkaly odcházejí z těla hostitele. Vylučování cyst je *intermitentní*, typické jsou až několikadenní přestávky. Vzniklé cysty jsou velmi odolné proti vnějšímu prostředí ve kterém často přežívají v infikovaných vodních zdrojích až do infekce dalšího hostitele, kde dokončují svůj cyklus.

Obrázek 8: **Binární dělení giardií** Zdroj <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>



Obrázek 9: **Vývojový cyklus *Giardia intestinalis*** (Chroust a kol. 1998)



2.6.4. Patogeneze a klinické příznaky giardiózy

Klinické projevy giardiózy jsou různé. Od infekce bez příznaků až po dlouhodobý vodnatý průjem. Trofozoiti pokrývající sliznici tenkého střeva omezují její resorpční schopnost a narušují trávení. Především se projevují poruchy vstřebávání tuků a vitamínů rozpustných v tucích. Postupně se vyvíjejí zánětlivé změny, dochází ke zkrácení klků a vymizení kartáčového lemu. Nejtypičtějším klinickým příznakem je hlenovitý, silně zapáchající průjem s velkým obsahem tuků – steatorea. Průjem je bez příměsí krve.

Postupně dochází ke ztrátě hmotnosti. Následkem hypersenzitivní reakce hostitele se objevuje rovněž kopřivka nebo erytém. Klinické příznaky jsou výraznější u mladých zvířat, zatímco u dospělých probíhá infekce často latentně. Průběh onemocnění závisí na vnímavosti hostitele, na stavu jeho imunitního systému, na patogenitě infikujícího kmene a na případných dalších střevních infekcích (Koudela 2001, Chroust a kol. 1998).

2.6.5. Diagnostika giardií

Diagnostika giardiózy je založena především na detekci **cyst** vylučovaných trusem. Lze použít některou z flotačních metod (Sheatherův flotační roztok, nasycený roztok sacharózy, Brezův flotační roztok) (Chroust a kol. 1998). Cysty se zvýrazní po přidání kapky Lugolova roztoku k vyšetřovanému vzorku, který cysty probarví červenohnědě a lze je pak snadněji pozorovat světelným mikroskopem. Moderní diagnostické metody umožňují detekci cyst v trusu vazbou monoklonálních protilátek na koproantigeny giardií s využitím přímé imunofluorescence nebo metody ELISA (Svobodová a Doležil 2001). Vzhledem k nepravidelnému vylučování cyst, je nutné opakované vyšetření (3 × – vzorky odebrané obden). Tímto způsobem diagnostikujeme giardiózu u jednotlivě chovaných zvířat. Při vyšetřování většího počtu zvířat na farmách stačí k záchytu jednorázového vyšetření poměrného počtu ze stáda (Chroust a kol. 1998).

Problém intermitentního vylučování cyst lze řešit využitím endoskopie. Při té se odebírá a následně mikroskopicky vyšetřuje duodenální tekutina. V pozitivním případě můžeme pozorovat pohybující se **trofozoity**, které však musíme udržovat při teplotě 38 °C, aby neztratily pohyblivost a neodumíraly. Obvykle se zhotovuje roztěr duodenální tekutiny a barví se dle Giemsky. Toto má však pouze omezené využití (Svobodová a Doležil 2001).

2.6.6. Terapie a prevence giardiózy

Při terapii giardiózy hospodářských zvířat byla testována léčiva, která se osvědčila při léčbě humánní giardiózy (metronidazol, furazolidon, quinacrin atd.). Při zavlečení giardiózy do chovu je třeba přeléčit všechna zvířata. Vzhledem k vysokým nákladům je však terapie celých chovů prozatím nereálná. Na ochraně mláďat se výrazně podílí příjem mateřského mléka. Pro eliminaci giardií za střeva hostitele je možné využít také běžně používané anthelmintikum albendazol (Koudela 1995, Chroust a kol. 1998).

(Pavlásek 1997). Těžké vodnaté průjmy byli zjišťováni především u pacientů s AIDS a s různými formami poruch imunitního systému (Xiao a kol. 2002).

V roce 1993 se zájem dramaticky zvýšil s masivní infekcí více než 400 000 lidí nakažených z pitné vody v Milwaukee ve státě Wisconsin v USA (MacKenzie a kol. 1994).

V ČR byl první výskyt *Cryptosporidium* spp. zaznamenán u novorozených telat v roce 1979 (Pavlásek 1997).

Rod *Cryptosporidium* v roce 2008 zahrnoval 18 druhů a přes 40 genotypů (Xiao a Ryan 2008). Jelikož neustále přibývají údaje o morfologii, biologii a genetické struktuře kryptosporidií je možné předpokládat že některé další genotypy budou pojmenovány jako samostatné druhy (Xiao a Fayer, 2008).

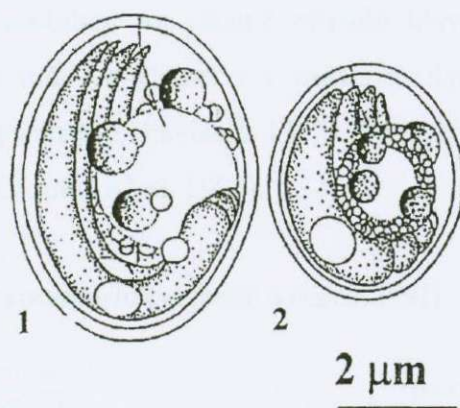
2.7.3. Morfologie *Cryptosporidium* spp. (obrázek 10)

Oocysty kryptosporidií obsahují 4 volně uložené sporozoity a poměrně velké reziduální tělísko. Nemají mikropyle a jejich stěna je téměř bezbarvá. Jsou téměř kulaté, silně světlolomné. Oocysty mají charakteristickou suturu na jednom pólu, kterou sporozoity opouštějí oocystu během excystace (Chroust a kol 1998).

Rod *Cryptosporidium* lze obecně rozlišit podle velikosti oocysty, respektive podle lokalizace vývojového cyklu na dvě výrazné skupiny, a to na druhy s většími oválnými oocystami parazitujícími v žaludeční sliznici a na druhy s menšími kulatými oocystami parazitujícími ve střevní sliznici (Kváč a Květoňová 2005).

Oocysty *cryptosporidium suis* (pig genotyp I) jsou vylučovány již vysporulované a měří 4,9 – 4,4 μm (průměr = 4,6 μm) \times 4,0 – 4,3 μm (průměr = 4,2 μm); poměr délky ku šířce je 1,1 (n = 50) (Ryan a kol. 2004).

Obrázek 10: Oocysty rodu *Cryptosporidium*.: 1 – *C. muris*, 2 – *C. parvum* (Chroust a kol. 1998)



2.7.4. Vývojový cyklus kryptosporidií (obrázek 11)

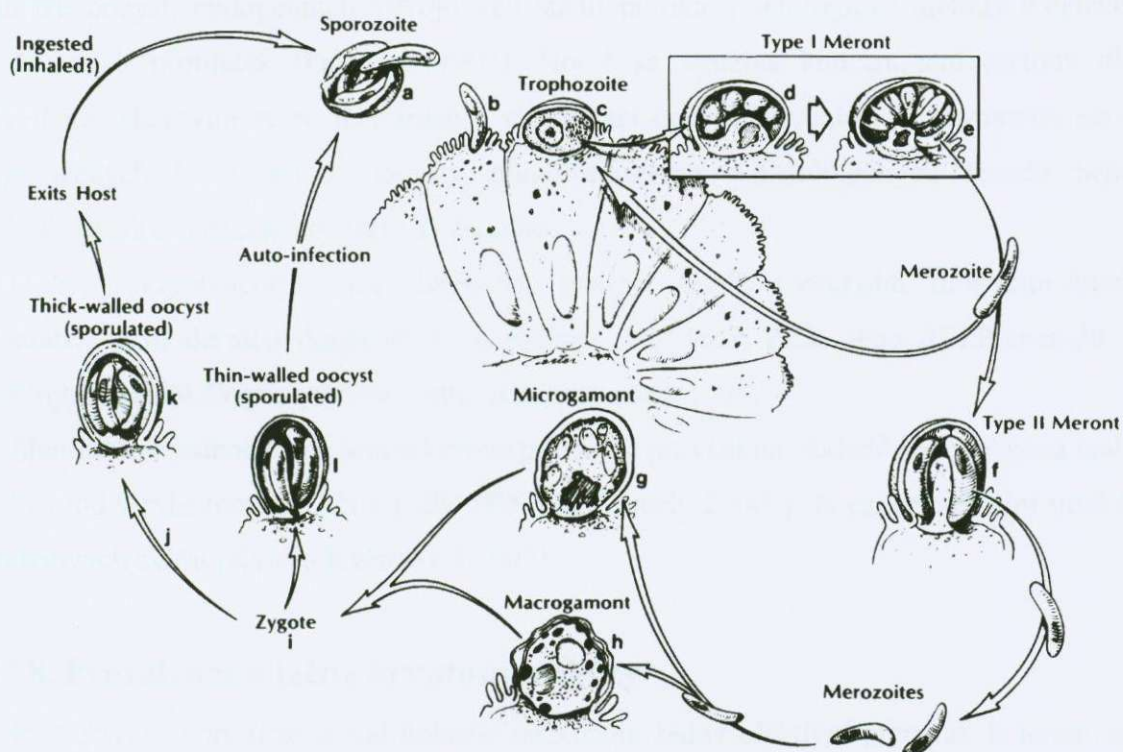
Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní (Fayer a kol. 1997) a zahrnuje 4 fáze: excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie. K infekcím dochází u vnímavých hostitelů prostřednictvím oocyst fekálně-orální cestou. Pozřené oocysty excystují vlivem proteolytických enzymů (serinové a cysteinové endopeptidázy, aminopeptidázy) degradujícími suturu. Uvolnění infekční sporozoiti napadají epiteliální buňky gastrointestinálního traktu. Vývojová stádia se vyvíjejí intracelulárně, ale extracytoplazmaticky, uvnitř parazitoformní vakuoly. Při asexuálním množení - merogonii dochází k tvorbě dvou morfologických typů merontů: I. typ obsahuje 6 - 8 jader, po dozrání z každého jádra vzniká merozoit a penetruje do další epiteliální buňky. V následující generaci vznikají opět meronty I. typu nebo morfologicky odlišné meronty II. typu, produkující pouze 4 merozoity. V následné gametogonii se většina vzniklých zygot (asi 80 %) vyvíjí v tzv. silnostěnné oocysty, které sporulují v parazitoformní vakuole hostitelské buňky. Tyto oocysty odcházejí ze zažívacího traktu trusem (Chroust a kol. 1998).

Fenoménem těchto prvoků je tzv. autoinfekce. To je umožněno tenkostěnnými oocystami, které neopouští infikovaného hostitele, ale excystují uvnitř jeho organismu. Infekční stádia (sporozoiti) po uvolnění velmi rychle pronikají do zatím ještě parazitem nezasazených a neporušených mikroklků. Na rozdíl od oocysty jiných druhů kokcií jsou kryptosporidie schopné infekce okamžitě po vyloučení (Pavlásek 1997).

2.7.5. Lokalizace kryptosporidií

Kryptosporidiové infekce probíhají ve většině případů hlavně v gastrointestinálním traktu. K vývoji prvoka však může docházet i v orgánech dýchacího a vylučovacího ústrojí, ve žlučníku, játrech a pankreatu (Pavlásek 1997). To je umožněno díky schopnosti spontánního uvolnění oocyst (Chroust a kol. 1998).

Obrázek 11: Vývojový cyklus kryptosporidií (Current a Garcia 1991)



2.7.6. Klinické příznaky kryptosporidiózy

V mikrovilech tenkého střeva intenzivní množení parazita způsobuje enterické léze, které jsou charakterizované změnami a ztrátou epiteliálních buněk, atrofíí klků, hyperplazií krypt a buněčnými infiltráty ve vlastní vrstvě sliznice (lamina propria mucosae) (Pavlásek 1997).

Nakažení jedinci vykazují široké spektrum příznaků. Hlavním klinickým projevem jsou různé formy krátkodobých či chronických a perzistujících, život ohrožujících a choleře podobných průjemových onemocnění (Pavlásek 1997). Obecným klinickým příznakem je také ztráta hmotnosti, břišní křeče, nevolnost a zvracení, zvýšená teplota, pocení. Může se projevit i slabost, malátnost, bolest hlavy. Intenzita a doba trvání příznaků závisí především na věku a odolnosti hostitele (Fayer 2004).

pravidelná desinfekce pracovních pomůcek a ploch, zamezení kontaminace krmiva a steliva,...) a dobrá zoohygiena chovu (Kváč a Květoňová 2005).

2.7.9. Kryptosporidie a kryptosporidióza prasat

První zpráva o kryptosporidiové infekci prasat byla z roku 1977 z USA (Bergeland 1977, Kennedy a kol. 1977). Následně byl přirozený výskyt u prasat popisován celosvětově (De Graff a kol. 1999). V roce 1998 byl pomocí molekulárních analýz popsán nový genotyp prasečích kryptosporidií - *Cryptosporidium* pig genotype I (Morgan a kol. 1998). Na základě molekulární analýzy různých izolátů kryptosporidií z prasat pak Ryan a kol. (2003) popsali 2 genotypy: pig genotype I a pig genotype II. O rok později Ryan a kol. popsali pig genotype I jako samostatný druh, který byl nazván *Cryptosporidium suis*. V našich podmínkách se výskytem kryptosporidiózy u prasat zabývali Vítovec a Koudela (1987), Zajíček (1988 a 1989), Vítovec a kol. (1990), Vítovec a Koudela (1992), Pavlásek (1997), Vítovec a kol. (2006), Kváč a kol. (2008a,b).

Do roku 2008 bylo u prasat identifikováno pět druhů / genotypů kryptosporidií; *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium suis* pig genotype II a mouse genotype I (Johnson a kol. 2008).

Klinické projevy kryptosporidiózy u prasat se liší dle lokalizace v hostiteli a dle druhu kryptosporidie a zahrnují široké spektrum klinických příznaků. Experimentálně nakažená selata oocystami izolovanými od telat vykazovala klinické příznaky včetně zvracení, průjmů, otupělosti (Moon a Bemrick 1981, Tzipori a kol 1982, Vítovec a Koudela 1992). Ačkoli některé studie popisují vztah mezi infekcí a průjmem (Hamnes a kol 2006), další tento vztah nepotvrdili (Sanford 1983, Quílez a kol. 1996, Vítovec a kol. 2006). Výsledky studií které určili druh nebo genotyp kryptosporidií naznačují, že infekce s *C. hominis*, *C. suis* a *Cryptosporidium* pig genotyp II vykazovaly méně výrazné klinické příznaky než infekce s *C. parvum* (Pereira a kol. 2002, Enemark a kol. 2003, Guselle a kol. 2003, Hamnes a kol. 2006).

Intenzitu infekce a klinických příznaků také ovlivňuje působení dalších patogenů jako kokcií, giardií, strongyloidů, salmonel, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, adenoviry, rotaviry nebo cirkoviry či virů – rotavirus (Sanford 1987; Enemark a kol. 2003, Nuñez a kol. 2003).

1992). U selete infikovaných dávkou 5×10^6 oocyst byl 4 dny po infekci pozorován průjem s následným samovyléčením (Vítovec a Koudela 1992). Selata infikovaná dávkou $2,5 \times 10^5$ oocyst naopak nevykazovala žádné výraznější klinické příznaky.

Histopatologické změny v tenkém střevě zahrnují zploštění kartáčového lemu, atrofii střevních klků s následnou malabsorpcí, dochází k postupné dilataci střevních krypt a ke snížení enzymatické aktivity střevní mukózy. Sliznice postižených orgánů je infiltrována lymfocyty, monocyty, neutrofilny a makrofágy (Heine a kol. 1984, Rommel a kol. 2000).

3. MATERIÁL A METODIKY

3.1. CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH CHOVŮ

Parazitologické sledování bylo provedeno v zemědělských podnicích Hůry a Vranín na Českobudějovicku.

Farma Hůry s.r.o. se zabývala chovem prasat ve Vráťě a Libníči. Oba chovy se zaměřovaly na chov prasnic (cca 250 ks) a produkci selat v období předvýkrmu. Na podzim roku 2007 byla však odchovna prasnic v Libníči zrušena a zůstala zde jen stáj pro předvýkrm selat.

V roce 2007 byly odběry prováděny i na farmě RAB Vranín s.r.o.. Zde bylo chováno asi 800 ks prasnic, selata na výkrm do 2,5 měsíců věku a prasničky určené pro chov.

3.1.1. Chov prasnic a odstavených selat ve Vráťě

Ve Vráťě bylo chováno asi 150 ks prasnic. Stáj byla rozdělena na oddělení pro jalové a březí prasnice a na porodnu. V přilehlé budově se pak nacházelo oddělení předvýkrmu s kapacitou 360 ks.

Jalové a březí prasnice byly chovány bezstelivovým způsobem s individuálním ustájením na betonové podlaze. Společně s prasnicemi zde byli ustájeni i tři kanci v individuálních kotcích.

Asi 5 až 10 dní před porodem byly prasnice převáděny na porodnu do individuálních kotců. Kapacita porodny byla 42 ustájovacích míst plus 4 kotce pro odstavená selata s kapacitou 30 až 35 kusů. Porodní kotce s betonovou podlahu byly zastýlány slámou především v postraním prostoru pro selata. Zde se také nacházel zdroj tepla – infrazářič, nádoba na příkrm a napáječka. Příkrm se prováděl od 7 dne věku granulovanou krmnou směsí. V těchto kotcích zůstávala selata s prasnicí až do odstavu, který se prováděl 1x týdně kolem 28 dne věku. Odstavená selata se umisťovala do společných kotců v prostorách porodny a po 14 dnech se převážela do oddělení předvýkrmu. Zde byla selata umisťována do kotců po 10 kusech. Kotce pro odstavená selata na porodně i v předvýkrmu byly zastýlány slámou a vybaveny automatickou napáječkou a společným automatickým krmítkem. Selata byla krmena *ad libitum*. Odklid hnoje a krmení byl prováděn 2× denně.

3.1.2. Chov prasnic a odstavených selat v Libníči

V Libníči bylo chováno asi 92 ks prasnic. Stáj byla rovněž rozdělena na oddělení pro jalové a březí prasnice, porodnu a v přilehlé budově se pak nacházelo oddělení předvýkrmu s kapacitou 300 ks. Jalové a březí prasnice byly ustájeny ve skupinových kotcích s krmením do společných žlabů.

Způsob ustájení na porodně, vybavení porodních kotců i kotců pro odstavená selata a způsob odstavu se shodoval s chovem ve Vráťě. Kapacita porodny byla 22 ustájovacích míst plus další 2 kotce pro odstavená selata s kapacitou 30 ks. Po převozu selat do předvýkrmny byla selata ustájena do skupinových kotců po 25 ks. Do předvýkrmny v Libníči byla někdy převážena také selata z Vráta. Odkliz hnoje a krmení byl prováděn 2× denně.

Podle intenzity růstu byla po 6 až 8 týdnech prasata převezena do velkovýkrmny prasat. Průměrný počet selat na prasnici a rok byl v Libníči i Vráťě 20,2 kusů, průměrný počet selat na prasnici a vrh 10,1 ks a průměrný úhyn selat do odstavu byl 14,6 %. Brakace prasnic se pohybovala kolem 25 až 28 %. Stavy byli doplňovány prasničkami z Vranína.

Veterinární zákroky byli prováděny především u selat. Po porodu se selatům štípaly zoubky, zkracovaly ocásky a podávala vitamínová pasta. Později se intramuskulárně aplikovalo železo. Ostatní zákroky byly prováděny podle individuálního zdravotního stavu. Plošná aplikace antiparazitik se u selat neprováděla. Prasnicím byl 1× za 2 roky aplikován Ivomec®.

3.1.3. Chov prasnic a odstavených selat ve Vraníně

Na farmě Vranín bylo chováno 800 ks prasnic a 12 kanců. Jalové prasnice byly ustájeny v individuálních kotcích a březí prasnice skupinově po 5 až 6 kusech. Krmení bylo automatické. Na porodnu byly převáděny 7 až 10 dní před porodem do individuálních porodních kotců umožňujících volný pohyb prasnice. Kapacita porodny byla 240 ustájovacích míst. Kotce měly betonovou podlahu s vyhříváním v podlaze v prostorách pro selata. Selatům se přistýlali hobliny a po narození se ještě přitápělo pomocí infrazářičů. Příkrm selat se prováděl od 3. dne věku, nejprve sypkou směsí pro selata na podlahu kotce a asi od 7. dne věku se předkládala granulovaná krmná směs do misek. Výkaly byly odklizeny několikrát za den do oběžného shrnovače.

Odstav selat se prováděl 2x týdně kolem 28 dne věku. Selata byla přemisťována do oddělení předvýkrmu o kapacitě 1200 ks. Zde byly kotce s polorošty po 6 až 8 kusech.

První týden po odstavu se selatům ještě někdy přitápělo infrazářiči. Krmení bylo automatické, *ad libitum*. Přibližně ve věku 2,5 měsíce byla prasata převážena do velkovýkrmny prasat.

Brakace prasnic se pohybovala kolem 25 %. Stavy byly doplněny prasničkami z vlastního chovu a z chovu ve Frahelži. Všem prasnicím byl před přemístěním na porodnu aplikován Ekomektin®. Selatům se po porodu štípaly zoubky, zkracovaly ocásky a podávala pasta. Třetí den se intramuskulárně aplikovalo železo. Ostatní zákroky byly prováděny podle individuálního zdravotního stavu.

3.2. ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU PRO PARAZITOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Odběry vzorků výkalů probíhali v časovém úseku od 30.3.2006 do 23.11.2007. Celkem bylo odebráno 459 vzorků. Z toho bylo 285 vzorků od sajících selat ve stáří do 4 týdnů (v tomto věku se prováděl odstav) a 174 vzorků od selat odstavených, ve stáří 5 – 8 týdnů.

Vzorky výkalů byly odebírány individuálně za pomoci lékařské špachtle z podlahy kotce a ukládány do očíslovaných plastových kelímků. Vzorky byly uchovávány při teplotě do 4 °C a mikroskopicky vyšetřeny do 24 hodin po odběru. Vzorky nebyli fixováni žádným fixačním roztokem.

Ke každému odebranému vzorku byly zaznamenávány tyto údaje:

- Datum odběru
- Pořadové číslo odebraného vzorku
- Číslo prasnice
- Datum narození selat (u odstavených selat datum odstavu)
- Konzistence trusu
- Datum vyšetření flotační metodou

ZPŮSOBY HODNOCENÍ KONZISTENCE TRUSU:

- | | |
|-------------|-------------------------------------|
| • Formovaný | trus formovaný, pevné konzistence |
| • Pastovitý | trus formovaný, řidší konzistence |
| • Krémovitý | trus neformovaný, řidší konzistence |
| • Vodnatý | trus neformovaný, řídký, tekoucí |

3.3. KOPROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ FLOTAČNĚ - KONCENTRAČNÍ METODOU

Flotační metoda je založena na principu roztoků s vyšší specifickou hmotností než mají běžné parazitární útvary. Při zpracování vzorku trusu se různá stádia parazitů protozoárního původu vyplaví na povrch roztoku ve zkumavce a koncentrují se na povrchové blance. Pro flotaci byl použit Sheatherův cukerný roztok, který byl připraven v zásobních lahvích.

SHEATHERŮV CUKERNÝ ROZTOK:

- 640 ml vody
- 1 kg řepného cukru
- 13 g fenolu

(specifická objemová hmotnost roztoku je $1,158 \text{ g.cm}^{-3}$)

PRACOVNÍ POSTUP:

- 1) Za přidavku vody rozetřít trus (cca 5g) tloučkem v třecí misce.
- 2) Vzniklou směs přecedit přes čajové sítko do zkumavky asi 1 cm pod okraj.
- 3) Zkumavky vložit do centrifugy a stáčet 5 minut při 2500 otáčkách za minutu.
- 4) Po centrifugaci slít ze zkumavek vodu nad sedimentem.
- 5) Stříčkou se Sheatherovým roztokem naplnit zkumavky nejprve do jedné poloviny a řádně protřepat až do rozpuštění sedimentu na dně a poté doplnit asi 1 cm pod okraj.
- 6) Zkumavky vložit do centrifugy a stáčet 5 minut při 2500 otáčkách za minutu.
- 7) Po centrifugaci přenést na podložní sklíčko pomocí bakteriologické kličky povrchovou blanku ze zkumavky, rozetřít ji po ploše sklíčka a překrýt krycím sklíčkem.

Takto připravené sklíčko bylo prohlíženo meandrovitým pohybem pod mikroskopem při zvětšení 10×20 . Pro přesnější identifikaci bylo pak používáno zvětšení 10×40 . Při pořízení fotodokumentace bylo používáno také zvětšení 10×100 s imerzním olejem.

3.5. HODNOCENÍ INTENZITY INFEKCE NALEZENÝCH PARAZITŮ

3.5.1. Odhad intenzity výskytu oocyst kokcidií *Isospora suis*, *Eimeria spp.*, *Giardia intestinalis* a *Cryptosporidium spp.* (při vyšetření flotační metodou):

| | |
|--|---|
| velmi slabá infekce (ojedinělý výskyt) | oocysty pouze ojediněle |
| slabá infekce | 1 - 2 oocysty v jednom zorném poli |
| středně silná infekce | do 10 oocyst v jednom zorném poli |
| silná infekce | více jak 10 oocyst v jednom zorném poli |

3.5.2. Odhad intenzity výskytu *Cryptosporidium spp.* (dle počtu oocyst na gram trusu - OPG)

POSTUP ODHADU:

- 1) Zvážit podložní sklíčko před provedením nátěru s přesností na 0,001 g.
- 2) Natřít vzorek trusu.
- 3) Ihned zvážit hmotnost natřeného vzorku.
- 4) Barvit metodou dle Miláčka a Vítovce.
- 5) Spočítat všechny oocysty v nátěru.
- 6) Na základě hmotnosti vzorku a počtu oocyst odhadnout počet oocyst v gramu trusu.

HODNOCENÍ INTENZITY INFEKCE NA ZÁKLADĚ OPG:

| | |
|--|---------------------|
| velmi slabá infekce (ojedinělý výskyt) | OPG < 10^3 |
| slabá infekce | OPG = $10^3 - 10^4$ |
| středně silná infekce | OPG = $10^4 - 10^5$ |
| silná infekce | OPG > 10^5 |

3.6. GENOTYPIZACE KRYPTOSPORIDIÍ

3.6.1. Izolace DNA

Celková DNA se extrahovala přímo z trusu pomocí komerčního kitu QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

K 180-200 mg trusu se do mikrozkuřavky (1,5 ml) přidalo 200 µl ASL pufru a 150 mg skleněných kuliček (Ø 0,5 mm). Poté se rozbily oocysty/spory pomocí homogenizátoru (MINI-BEADBEATER™, Biospec, USA) po dobu 2 minut při rychlosti 5000 kmitů/min. Dále se postupovalo podle návodu, který byl součástí kitu. Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

3.6.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

POUŽITÉ CHEMIKÁLIE:

- Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP's, 1,25 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný kompletní pufr pro *Taq* purple DNA polymerázu (15 mM MgCl₂)
- *Taq* purple DNA polymeráza (1 U/ µl, Top-Bio, ČR)
- PCR H₂O (Top-Bio, ČR)
- MgCl₂ (25 mM, Top-Bio, ČR)
- Bovinní sérový albumin (BSA) (10 mg/ml, Sigma)

3.6.2.1. PCR - Kryptosporidie

Byl použit nested PCR protokol pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA; Jiang a kol. 2005). Celkový objem reakční směsi pro jednotlivé polymerázové řetězové reakce byl 30 a 50 µl (tabulka 3).

Při primární i sekundární PCR byl použit stejný amplifikační program (tabulka 4).

Primery (10µM)

Primární primery

F 5'-TCTAGAGCTAATACATGCG-3'

R 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'

Sekundární primery

F 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

R 5'-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3'

Tabulka 3: Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku

| | Primární reakce | | Sekundární reakce | |
|-------------------|-----------------|--------------|-------------------|--------------|
| | koncentrace | objem (μl) | koncentrace | objem (μl) |
| H ₂ O | - | 13,05 | - | 26,75 |
| MgCl ₂ | (25 mM) | 1,80 | (25 mM) | 3,00 |
| 10×buffer | - | 3,00 | - | 5,00 |
| dNTP | 1,0 mM | 6,00 | 1,0 mM | 10,00 |
| Primer forward | 10 μM | 0,60 | 10 μM | 1,00 |
| Primer reverse | 10 μM | 0,60 | 10 μM | 1,00 |
| BSA | (10 mg/ml) | 1,20 | - | - |
| Taq | (1U/1μl) | 0,75 | (1U/1μl) | 1,25 |
| DNA | - | 3,00 | - | 2,00 |
| celkem | - | 30,00 | - | 50,00 |

Tabulka 4: Amplifikační program pro termocykler (Bioer, Krd) pro dvojici primerů

| | Počáteční denaturace | 94 °C | 3 min. |
|----------|--------------------------------|--------------|---------------|
| 35 cyklů | Denaturace | 94 °C | 45 s |
| | Nasedání primerů | 55 °C | 45 s |
| | Dosyntetizování nového řetězce | 72 °C | 60 s |
| | Finální extenze | 72 °C | 7 min. |

3.6.3. Gelová elektroforéza

Velikost PCR fragmentů byla ověřována gelovou elektroforézou. Výsledný PCR produkt byl detekován na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (302 nm).

POUŽITÉ CHEMIKÁLIE:

- 50× TAE pufr (242 g tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA)
- agaróza (Serva)
- ethidium-bromid (Sigma)
- 100 bp DNA Ladder (O'Gene Ruler™)

PRACOVNÍ POSTUP:

- 1) Smíchat agarózu s 1× TAE pufr (výsledná koncentrace je 1 %), nechat rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou na teplotu přibližně 50 °C.
- 2) Přidat ethidium-bromid (výsledná koncentrace v gelu 0,5 µg na ml).
- 3) Gel nalít do předem připravené formy, vložit hřeben a nechat ztuhnout.
- 4) Gel vložit do elektroforetického tanku naplněného 1× TAE pufr. Do vzniklých jamek nanést 10 µl PCR sekundárního produktu a 2× 10 µl ladderu.
- 5) Nastavit napětí na 70 V a spustit na dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA.
- 6) Pro vizualizaci DNA fragmentů použít UV transiluminátor.

3.6.4. Příprava vzorků na sekvenaci

K přípravě byl použit kit BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. Pro každý primer byla namíchána reakční směs (viz níže).

V tabulce 5 je uveden amplifikační program. Vzorky byly sekvenovány z obou stran za použití primerů pro sekundární PCR.

SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI:

- | | |
|--------------------------------|------|
| • PET | 2 µl |
| • pufr (5×) | 4 µl |
| • primer | 1 µl |
| • PCR produkt (sekundární PCR) | 5 µl |
| • PCR H ₂ O | 8 µl |

Tabulka 5: Amplifikační program pro termocykler (Bioer, krd)

| | | | |
|----------|------------------|-------|--------|
| 30 cyklů | Denaturace | 94 °C | 10 s |
| | Nasedání primerů | 50 °C | 5 s |
| | Dosyntetizování | 60 °C | 4 min. |

PRACOVNÍ POSTUP:

- 1) K produktu sekvenační PCR přidat 1 µl glykogenu pro zviditelnění peletu.
- 2) Napipetovat 5 µl M EDTA a 60 µl 96 % etanolu.
- 3) Vzorek protřepat a inkubovat 15 min. při laboratorní teplotě.
- 4) Centrifugovat po dobu 30 min. při 4 °C (21910 g).
- 5) Odsát supernatant a vysráženou DNA a vysušit při laboratorní teplotě po dobu přibližně 30 min.
- 6) Odeslat k sekvenování (komerční laboratoř, Macrogen, Soul, Jižní Korea)

Získané sekvence byly upraveny v programu Chromas Pro, Bioedit a Clusal X a srovnány se sekvencemi SSU rRNA uloženými v GenBank.

3.6.5. PCR-RFLP analýza kryptosporidií

Pro rozlišení jednotlivých druhů kryptosporidií byla použita metoda PCR-RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů). Pro restrikční analýzu bylo použito 10 µl sekundárního PCR produktu do 30 µl reakce obsahující 10 U *SspI* nebo 10 U *VspI* (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) a 3 µl restrikčního pufru. Inkubace 8 hodin při 37 °C.

Vyšetření vzorků na přítomnost kryptosporidií s následnou genotypizací bylo v roce 2007 prováděno ve spolupráci s oddělením veterinární a humánní parazitologie Parazitologického ústavu AV ČR.

4. VÝSLEDKY

4.1. FREKVENCE VÝSKYTU SLEDOVANÝCH PARAZITŮ V JEDNOTLIVÝCH CHOVECH

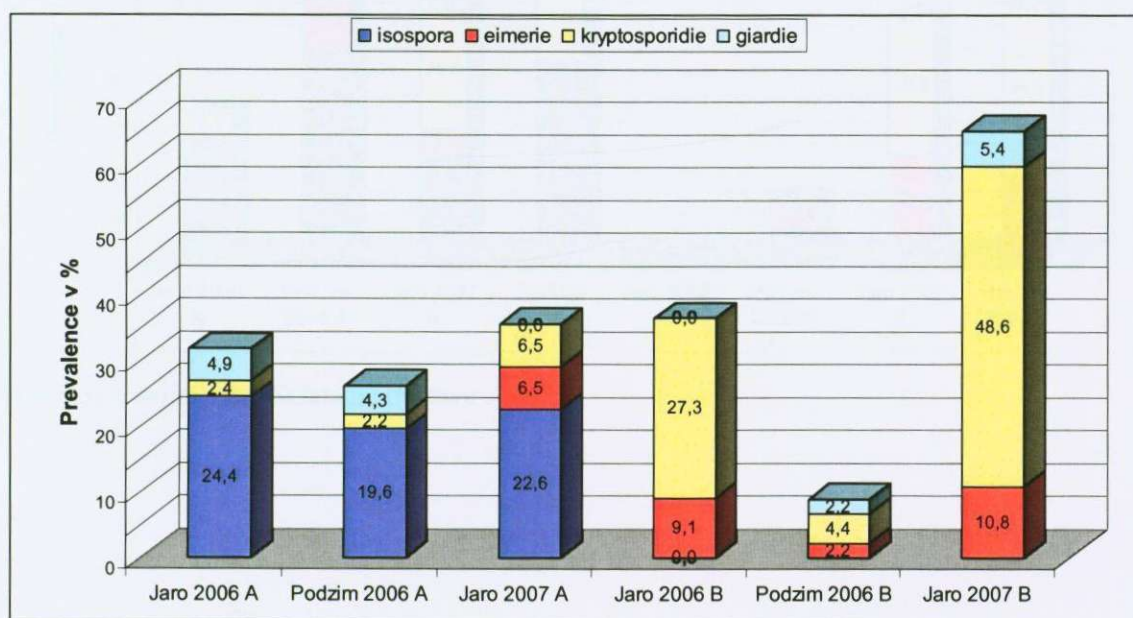
4.1.1. Libnič

V průběhu třech sledovaných období bylo v Libniči odebráno 118 vzorků od selat sajících (před odstavením) a 93 vzorků od selat po odstavení. Z celkového počtu 63 pozitivních vzorků se v 58 případech jednalo o monoinfekci viz. přílohy, tabulka 20.

Prevalenci parazitů a jejich výskyt v jednotlivých obdobích u selat sajících a po odstavení uvádí graf 1 a tabulky 6 a 7 viz. přílohy.

I. suis se vyskytovala pouze u selat sajících (22 %) s mírně vyšší četností v jarním období (o 4 %). Kokcidie rodu *Eimeria* byly naproti tomu nejčastěji zjištěny u selat odstavených. Vyšší výskyt byl taktéž zaznamenán v jarním období (o 4,7 %). Infekce *giardiemi* byla nalezena jen v nízké frekvenci bez výraznějších rozdílů v jednotlivých obdobích s prevalencí 3,3 %. Výskyt **kryptosporidií** byl zřetelně vyšší u starší kategorie selat. Dle prevalence zjištěné v roce 2006 flotačně-koncentrační metodou byl vyšší výskyt v jarních měsících (o 4,4 %).

Graf 1: Prevalence a sezónní dynamika parazitů v Libniči



A = Selata sající, B = Selata po odstavení

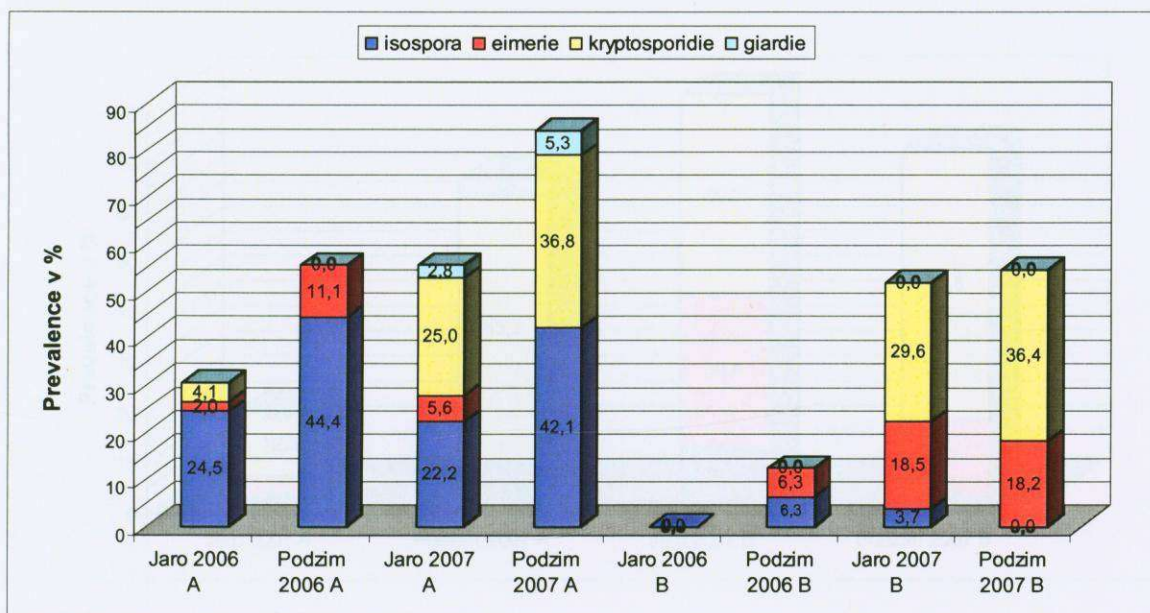
4.1.2. Vráto

Během čtyř sledovacích období bylo ve Vrátě odebráno 113 vzorků od selat sajících a 58 vzorků od selat po odstavu. Z celkového počtu 70 pozitivních vzorků se v 62 případech jednalo o monoinfekci viz přílohy, tabulka 20.

Prevalenci parazitů a jejich výskyt v jednotlivých obdobích u selat sajících a po odstavu uvádí graf 2 a tabulky 8 a 9 viz. přílohy.

I. suis se vyskytovala převážně u selat sajících, ale na rozdíl od hodnot zjištěných v Libníči byl vyšší výskyt v podzimním období (o 19 %). *Eimerie* se stejně jako v Libníči nejčastěji vyskytovaly u selat odstavených (13,8 %). *Giardie* byly nalezeny pouze ve 2 vzorcích v roce 2007. *Kryptosporidie* byly v prvním roce (při vyšetření flotačně-koncentrační metodou) nalezeny pouze na jaře ve 2 vzorcích. V roce 2007 (vyšetření obarvených roztěrů trusu) se pak prevalence pohybovala okolo 30 % s vyšším výskytem v podzimním období (o 10 %).

Graf 2: Prevalence a sezónní dynamika parazitů ve Vrátě



A = Selata sající, B = Selata po odstavu

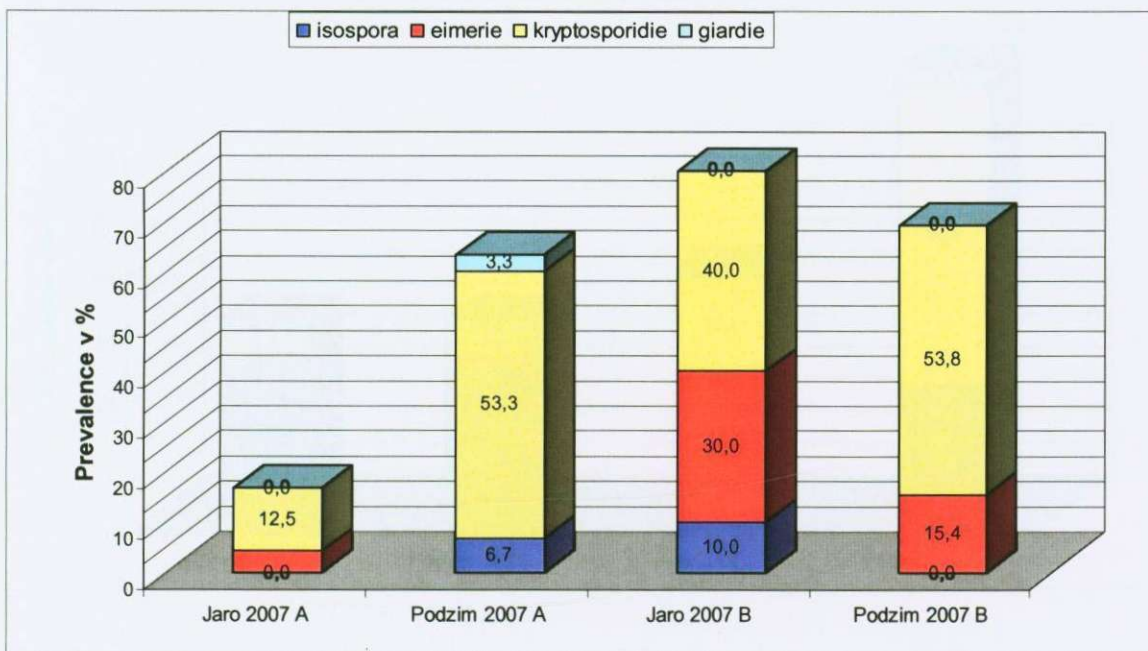
4.1.3. Vranín

Ve Vraníně byly odběry provedeny pouze ve dvou sledovacích obdobích v roce 2007, 54 vzorků pocházelo od selat sajících a 23 vzorků od selat odstavených. Z celkového počtu 34 pozitivních vzorků se v 28 případech jednalo o monoinfekci viz. přílohy, tabulka 20.

Prevalenci parazitů a jejich výskyt v jednotlivých obdobích u selat sajících a po odstavu uvádí graf 3 a tabulky 10 a 11 viz. přílohy.

Výskyt **isospor** byl v porovnání s předešlými chovy poměrně nízký. Vyšší procento pozitivních vzorků bylo tentokrát nalezeno u selat odstavených. **Eimerie** se opět vyskytovaly nejčastěji u selat odstavených (21,7 %). **Giardie** byla nalezena pouze v 1 vzorku. Celková prevalence **kryptosporidií** byla v průměru 39 %. Vyšší výskyt byl zaznamenán u selat odstavených (47,8 %) se znatelně vyšším výskytem na podzim (o 33 %).

Graf 3: Prevalence a sezónní dynamika parazitů ve Vraníně



A = Selata sající, B = Selata po odstavu

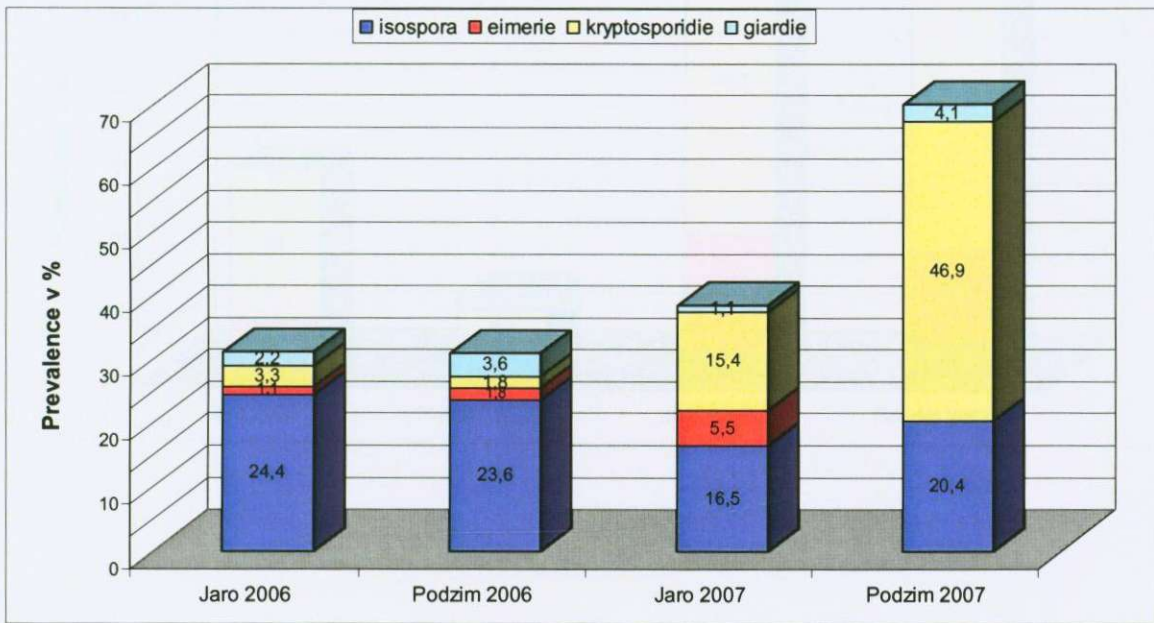
4.2. SEZÓNÍ DYNAMIKA VÝSKYTU SLEDOVANÝCH PARAZITŮ

4.2.1. Selata sající

V roce 2006 byl výskyt parazitů poměrně vyrovnaný. Rozdíly mezi jarním a podzimním obdobím činily pouze 1 až 2 %. V roce 2007 byly pak rozdíly výraznější. Zřetelný nárůst v podzimním období zaznamenal především výskyt kryptosporidií (nárůst o 31,5 %) a vyšší byl i výskyt isospor (o 3,9 %) a giardií (o 3 %). Naopak eimerie byli nalezeny pouze na jaře (5,5 %). Viz. graf 4.

Při porovnání výskytu parazitů v letech 2006 a 2007 byla patrná vyšší frekvence výskytu kokcidiálních infekcí v prvním roce sledování. Výskyt kryptosporidií nelze vzhledem k použití rozdílných metod při diagnostice porovnat.

Graf 4: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat sajících

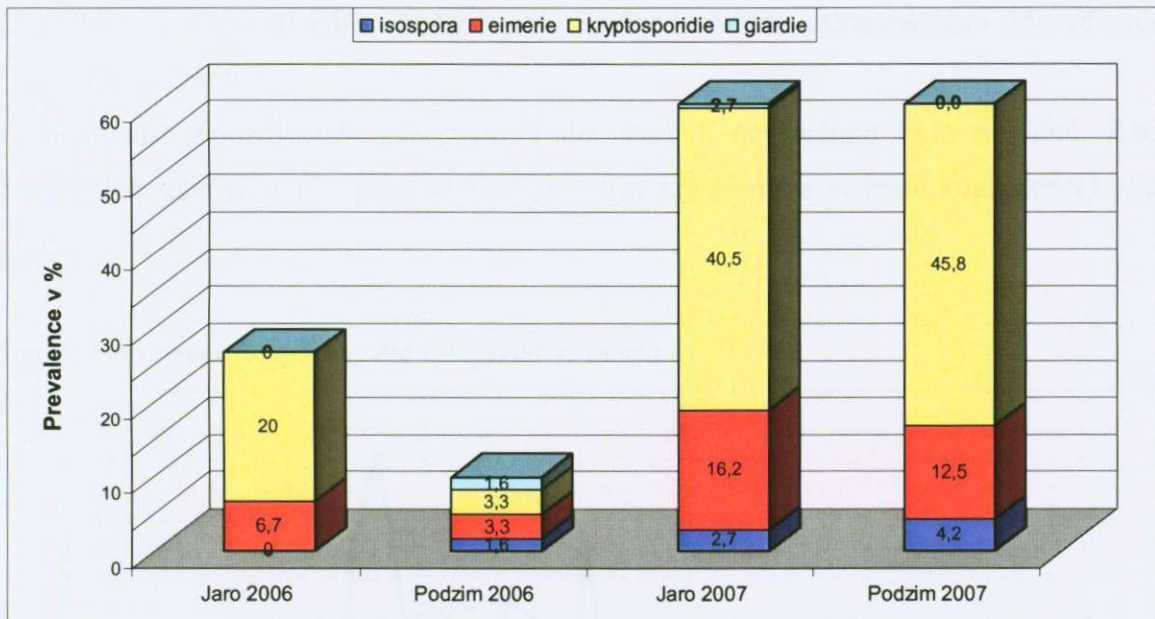


4.2.2. Selata po odstavu

V roce 2006 byl zaznamenán výrazný rozdíl především ve výskytu kryptosporidií. Ten byl v jarním období téměř o 17 % vyšší než na podzim. Vyšší četnost výskytu vykazovaly na jaře také eimerie (o 3,4 %). V roce 2007 byl počet pozitivních vzorků poměrně vyrovnaný. Na jaře byl mírně vyšší výskyt zaznamenán u eimerií a na podzim u kryptosporidií a isospor. Viz. graf 5.

Při porovnání výskytu parazitů v letech 2006 a 2007 byl patrný zřetelný nárůst kokcidiálních infekcí v druhém roce sledování. Výskyt kryptosporidií nelze vzhledem k použití rozdílných metod při diagnostice porovnat.

Graf 5: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat po odstavu



4.3. PREVALENCE SLEDOVANÝCH PARAZITŮ DLE VĚKU SELAT

4.3.1. Isospora suis

V prvním týdnu věku nebyl zaznamenán žádný pozitivní vzorek. V druhém týdnu prevalence parazita výrazně stoupla až na 40 %. Nejvyšší výskyt oocyst byl zaznamenán u 10denních selat (66,7 % pozitivních vzorků). V třetím týdnu věku výskyt postupně klesal (26,8 %) a nakonec dosáhl 7,1 % ve 4. týdnu věku. V dalších týdnech byly oocysty nalezeny už jen sporadicky, viz. graf 6.

U pozitivních vzorků byla na základě počtu nalezených oocyst vyhodnocena intenzita infekce. Nejčastěji se jednalo o infekci ojedinělou (68,8 %), v 8 případech o infekci slabou (12,5 %), v 7 o středně silnou (10,9 %) a v 5 případech byla zaznamenána i infekce silná (7,8 %), viz. graf 9.

Nejmladší z pozitivních selat bylo 9 dní staré a nejstaršímu bylo 6 týdnů. Z 63 pozitivních selat se u 12 vyskytoval průjem (trus krémovité a vodnaté konzistence), viz. graf 10.

Graf 6: Prevalence isosporózy dle věku selat ve dnech



4.3.2. Eimerie

První pozitivní vzorek byl nalezen v 2. týdnu věku u 12denního selete. V dalších týdnech prevalence postupně stoukala. Na nejvyšší úrovni se pohybovala 6. a 7. týden věku (17,5 % a 23,5 %). V 8. týdnu pak výskyt opět zaznamenal pokles, viz. graf 7.

Intenzita infekce eimerií byla převážně ojedinělá (88 %), ve 2 případech se vyskytla slabá infekce (8 %) a u 1 vzorku byla infekce vyhodnocena jako středně silná (4 %). Silná infekce zaznamenána nebyla, viz. graf 9.

Z celkového počtu 26 pozitivních vzorků se v 6 případech jednalo o trus průjmový (krémovité a vodnaté konzistence), viz. graf 10.

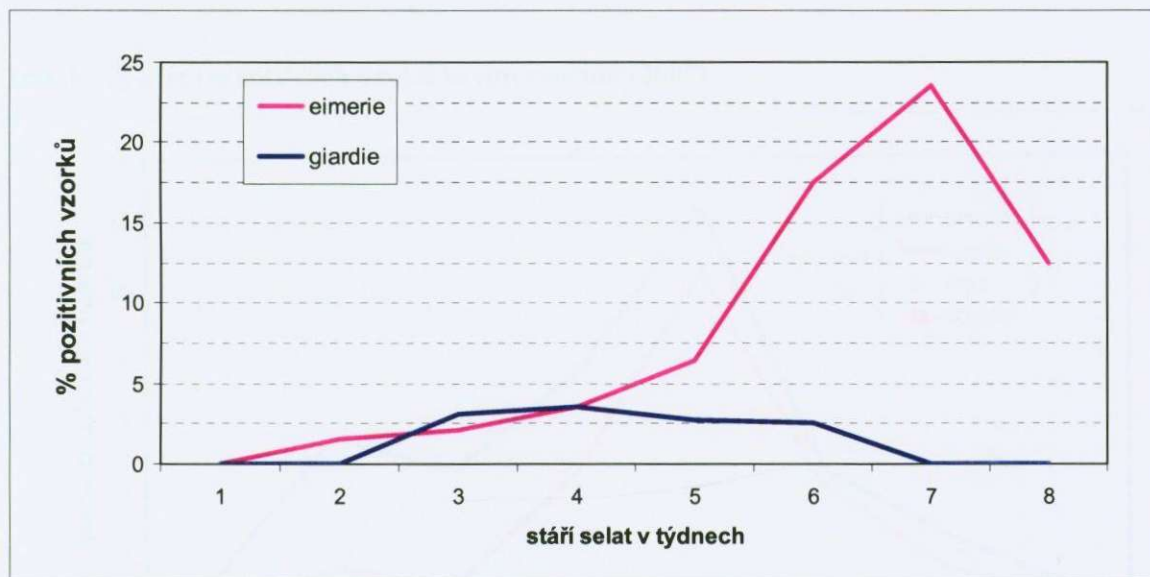
4.3.3. Giardie

Výskyt giardií byl zaznamenán ve velmi nízké prevalenci u selat v 3. až 5. týdnu věku. Viz. graf 7.

Intenzita infekce byla vyhodnocena v 8 případech jako ojedinělá a ve 2 případech jako velmi slabá. Silnější intenzita infekce již pozorována nebyla, viz. graf 9.

Z celkového počtu 10 pozitivních vzorků se ve 2 případech jednalo o trus průjmový (krémovité a vodnaté konzistence), viz. graf 10.

Graf 7: Prevalence Eimerií a giardií dle věku selat v týdnech



4.3.4. Kryptosporidie

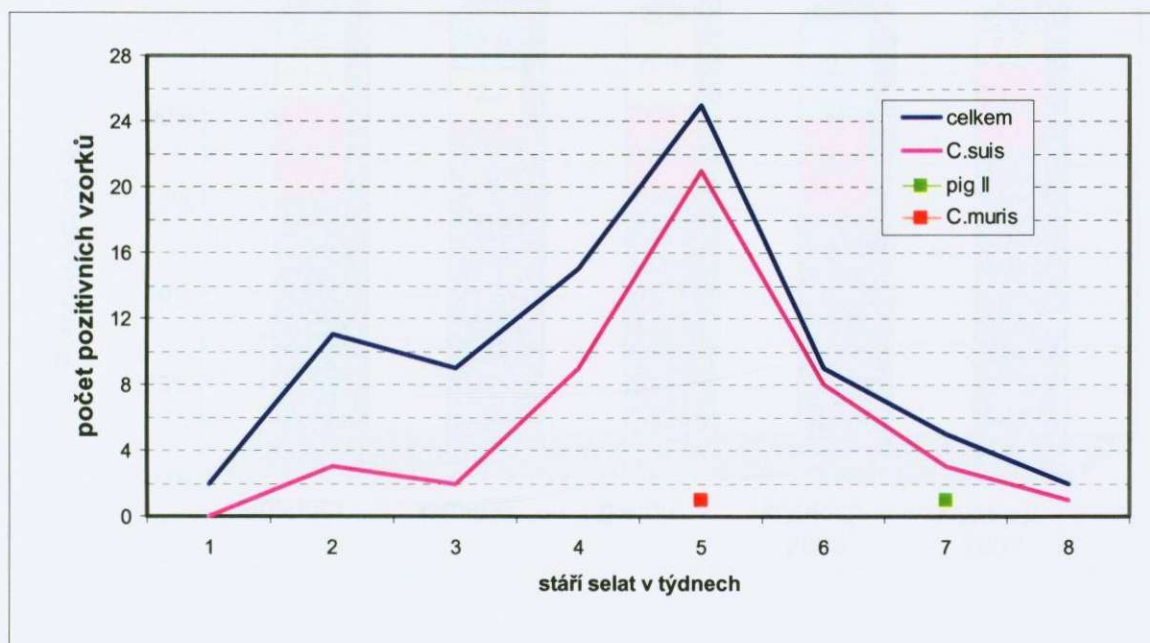
V prvním roce sledování byly kryptosporidie nalezeny u selat v 3. až 6. týdnu věku s nejvyšší prevalencí v 5. týdnu (8 %). V roce druhém byly pozitivní vzorky zaznamenány ve všech týdnech věku. Nejmladší selata pozitivní na kryptosporidie byla 6 dní stará. Nejvyšší prevalence byla zaznamenána v 1. týdnu věku (odebrány 2 vzorky a oba pozitivní) a v 5. až 8. týdnu (nad 40 %).

Intenzita infekce byla v prvním roce vyhodnocena v 8 případech jako ojedinělá a ve 2 případech jako velmi slabá. V roce druhém se pak ojedinělá infekce vyskytovala v 33 vzorcích (50 %) a poměrně častá byla i slabá infekce – v 22 vzorcích (33,3 %), středě silná a silná infekce pak byla určena v 7 a 4 vzorcích, viz. graf 9.

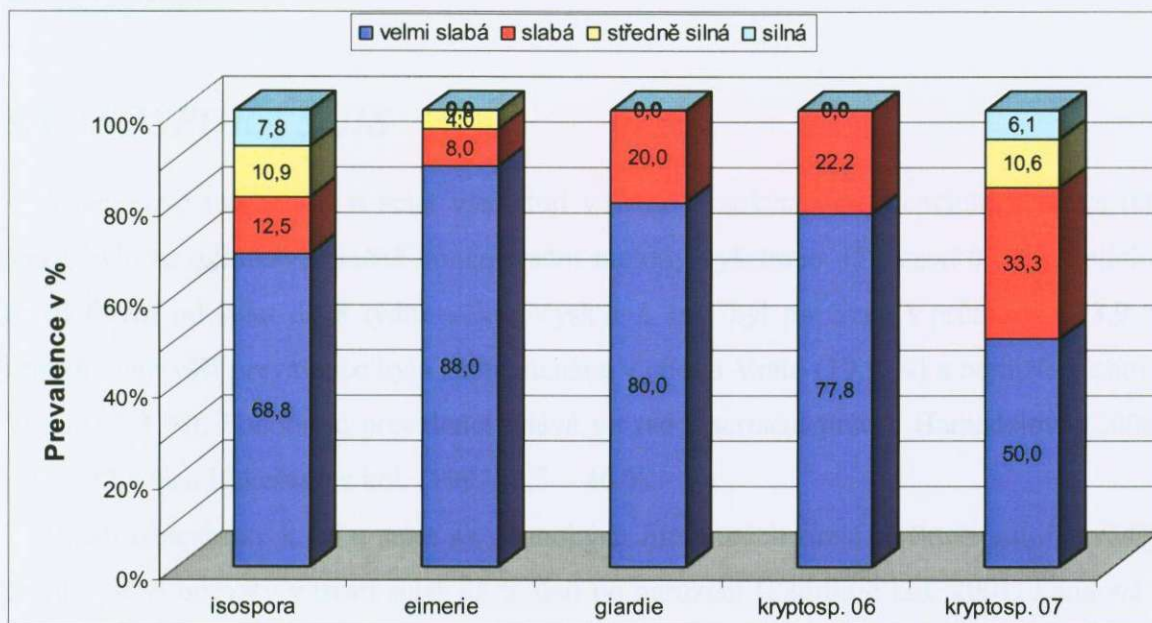
V roce 2006 byl z celkového počtu 9 pozitivních vzorků průjem zaznamenán ve 2 případech (22 %) a v roce 2007 se z celkového počtu 78 pozitivních vzorků průjem vyskytoval v 8 případech (10,3 %), viz. graf 10.

V roce 2007 byli pozitivní vzorky zpracovány a následně vyhodnoceny pomocí molekulárních analýz. Z celkového počtu 78 vzorků byl v 47 případech identifikován druh *Cryptosporidium suis* (19,7 %). Jeho první výskyt byl zaznamenán u 12denního selete s nejvyšší prevalencí ve 5. a 6. týdnu věku (\bar{O} 34,9 %). Dalšími identifikovanými druhy byly *Cryptosporidium muris*, nalezené v 1 vzorku trusu u pětitédenního selete a *Cryptosporidium pig* genotyp II nalezené u selete v 7. týdnu věku. Viz. graf 8. U zbývajících pozitivních vzorků se nepodařilo druh kryptosporidie určit.

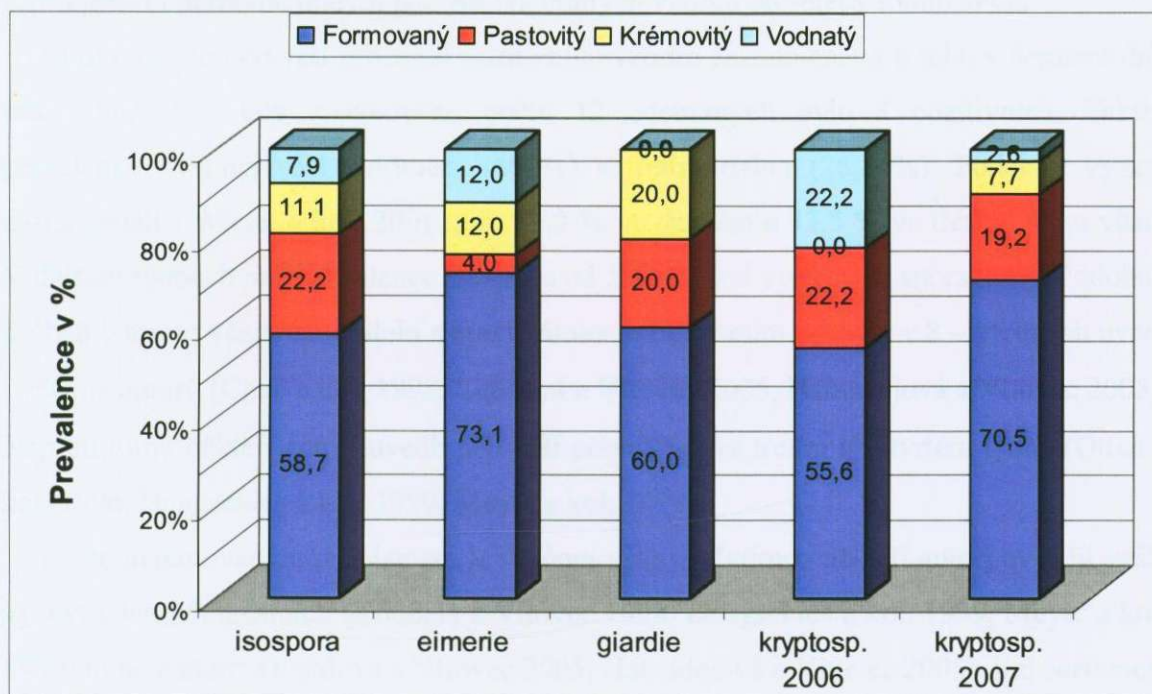
Graf 8: Výskyt jednotlivých druhů kryptosporidií (2007)



Graf 9: Intenzita infekce jednotlivých parazitů



Graf 10: Vztah konzistence trusu k výskytu parazitů



5. Diskuze

5.1. *ISOSPORA SUIS*

Kokcidiové infekce se u selat vyskytují v různě vysokých prevalencích. V rámci této práce bylo na základě flotačně koncentrační metody vyšetřeno 459 vzorků pocházejících ze tří farem od selat do 8 týdne věku. Výskyt *I. suis* byl potvrzen v průměru v 13,9 % vzorků. Nejvyšší prevalence byla zaznamenána v chovu Vráto (19,9 %) a nejnižší v chovu Vranín (5,2 %). Podobnou prevalenci udává ve své disertační práci i Hamadejová (2006) 7,3 až 32,4 % a Lukešová a kol. (1997) 3,3 – 40 %.

Vztah isosporózy k věku selat se v mnohých literaturách různí. Někteří autoři uvádějí první výskyt oocysty v trusu selat již 5. den po narození (Padilla a kol. 2001, Landová a Vítovec 2005), jiní zaznamenali oocysty až u sedmi-denních selat (Chae a kol. 1998). V této studii byl první výskyt zaznamenán až u devíti-denního selete. To mohlo být zapříčiněno i poměrně malým počtem odebraných vzorků od selat v tomto věku.

Celkově bylo nejvyšší procento pozitivních vzorků zaznamenáno u selat v desátém dnu věku (66,7 %), kdy z celkového počtu 12 odebraných bylo 8 pozitivních. Taktéž prevalence byla nejvyšší v druhém (40 %) a třetím týdnu (26,8 %). Podobný výskyt zaznamenali i Wieler a kol. 2001, a to 39,2 % ve druhém a 32,5 % ve třetím týdnu věku. V dalších týdnech pak prevalence klesala a od 5 týdne byl výskyt jen sporadický. Podobný průběh v tomto věkovém období s maximálním vylučováním oocysty v 8 – 15 dnech uvádí i většina autorů (Chae a kol. 1998, Landová a Vítovec 2005, Hamadejová a Vítovec 2005). Naproti tomu někteří autoři uvedli nejvyšší prevalenci ve třetím až čtvrtém týdnu (Otten a kol. 1996, Dauschies a kol. 1999, Meyer a kol. 1999).

Často diskutovaným problémem je sezónní výskyt. Zatímco někteří autoři uvádějí vyšší výskyt v letních měsících (Koudela a Vítovec 1998, Dauschies a kol. 1999, Meyer a kol. 1999) či na podzim (Landová a Vítovec 2005, Hamadejová a Vítovec 2005), jiní sezónnost výskytu nepotvrdili (Larsen 1996, Otten a kol. 1996). V této práci jsme při porovnání jarního a podzimního období sezónnost taktéž nepotvrdili, ale při porovnání jednotlivých měsíců se vyšší procento pozitivních vzorků vyskytovalo v teplejších měsících (květen a říjen). V letních a zimních měsících již naše sledování neprobíhalo.

Mnoho studií se také zabývá vlivem parazitů na konzistenci trusu. Většina autorů udává vyšší výskyt isospor u selat s průjmem (Otten a kol. 1996, Chae a kol. 1998, Meyer a kol. 1999, Padilla a kol. 2001, Landová a Vítovec 2005). V této studii se průjem (trus

krémovité a vodnaté konzistence) vyskytoval u 19 % pozitivních vzorků a u 22,2 % pozitivních vzorků se vyskytoval trus pastovité konzistence, který někteří autoři taktéž řadí mezi trus průjmový. Vztah průjmu k výskytu isospor jsme zaznamenali především u selat do 12 dne věku (40 % pozitivních selat trpělo průjmem). U starších selat se již tento vztah nepotvrdil (13,3 % pozitivních selat trpělo průjmem). To odpovídá i výsledkům Koudely a Kučerové (1999), kteří při experimentální infekci selat zaznamenali u starších selat mírnější příznaky.

5.2. EIMERIE

Výskyt kokcidie *Eimeria* spp. byl potvrzen v průměru v 5,7 % vzorků. Z toho se 2,5 % vyskytlo u selat sajících a 10,9 % u selat odstavených. K podobným výsledkům došli také Lukešová a kol. (1997) - (1,4 % až 20 %), Žižlavý a kol. (1998) - (3,9 % - 20 %) a Karamon a kol. (2007) - (2,6 %).

Nejvyšší prevalence byla zaznamenána v 6. až 7. týdnu věku. Nárůst infekce u odstavených selat zaznamenala i Hamadejová (2006), která uvádí výskyt od 7. týdne s nejvyšší prevalencí v 13. až 16. týdnu. Tuto věkovou kategorii však už naše studie nezahrnuje.

První výskyt *Eimeria* spp. jsme zjistili u 12denního selete. Velmi časný výskyt uvádějí i Nápravník a Zajíček (1993), kteří zaznamenali eimerie již u selat týden starých.

5.3. GIARDIE

Výskyt *Giardia intestinalis* byl potvrzen v průměru u 2,2 % vzorků. Z toho bylo 2,5 % od selat sajících a 1,7 % od selat odstavených. Podobné hodnoty uvádí i Hamnes a kol. (2006), a to 1,5 % pozitivních vzorků (z 684 vyšetřených). Koudela a kol. (1991) naopak prokázali v pokusu výskyt cyst u 14 běhounů z 32 vyšetřených (43,8 %).

Giardiové infekce prasat nejsou spojovány s průjmy (Koudela a kol. 1991, Xiao a kol. 1994). Ani my jsme vztah giardií a průjmu nepotvrdili. Průjem se vyskytl pouze u dvou vzorků z celkového počtu 10 pozitivních. Z toho se v jednom případě jednalo o směsnou infekci s kryptosporidií.

Cysty giardií jsme zaznamenali pouze u selat v 17. až 38. dnu věku s ojedinělou nebo jen velmi slabou intenzitou infekce. Hamnes a kol. (2006) naproti tomu uvádějí výskyt giardií již v 11. až 18. dnu věku s nízkou až středně silnou intenzitou infekce.

5.4. KRYPTOSPORIDIE

Kryptosporidiové infekce jsou u prasat popisovány v různě vysokých prevalencích. V rámci této práce byla na základě flotačně-koncentrační metody v prvním roce sledování zjištěna prevalence 4,1 % (9/221). V roce druhém byla ve spolupráci s oddělením veterinární a humání parazitologie Parazitologického ústavu AV ČR na základě vyšetření obarvených roztěrů trusu s následnou molekulární analýzou zjištěna prevalence 32,8 % (81/238). To znamená téměř osmi-násobný nárůst při porovnání obou metod. Rozdílnou prevalenci dle použité metody popisuje také Ryan a kol. (2005), který při analýze pomocí PCR zaznamenal deseti-násobný nárůst pozitivních vzorků oproti klasické mikroskopii.

Prevalence zjištěná v druhém roce sledování je v porovnání s jinými autory poměrně vysoká. Kváč a kol. (2008a) uvádějí 21,1% pozitivních vzorků (87/413), Johnson a kol. (2008) 22,1% pozitivních vzorků (64/285) a další autoři uvádějí prevalenci ještě nižší Chen a Huang (2007) 12 %, Vítovec a kol. (2006) 11 %. Tyto studie však oproti nám zahrnují širší věkové spektrum selat včetně prasnic.

Často diskutovaný je vztah věku prasat k výskytu parazitů. Kryptosporidie byly popsány u všech věkových kategorií. Nejmladší sele u kterého byli zaznamenány oocysty bylo 3 dny staré (Chen a Huang 2007). S nejvyšší prevalencí se setkáváme v období odstavu a předvýkrmu. Langkjaer a kol. (2007) uvádí nejvyšší výskyt u sajících selat, další autoři pak většinou ve věku 6 - 12 týdnů (Ryan a kol. 2003, Maddox-Hyttel a kol. 2006, Vítovec a kol. 2006, Johnson a kol. 2008). U prasnic se pak již kryptosporidie nevyskytují nebo jsou hlášeny jen ojediněle (Vítovec a kol. 2006, Johnson a kol. 2008, Kváč a kol. 2008a). My jsme kryptosporidie poprvé identifikovali u dvou 6-denních selat a nejvyšší výskyt jsme stejně jako Ryan a kol. (2003) zaznamenali v 5. - 8. týdnu věku. Vyšší výskyt v období odstavu může být způsoben stresem při odstavení od matky a umístění selat do větších skupin cizích selata. Svůj vliv může mít také změněné mikroklima při přemístění do oddělení předvýkrmu.

Průběh kryptosporidiózy je u prasat na rozdíl od jiných hospodářských zvířat (telat, jehňat) (Rommel a kol. 2000) většinou popisován jako asymptomatický (Ryan a kol. 2003,

Vítovec a kol. 2006, Chen a Huang 2007, Suaréz a kol. 2007, Kváč a kol. 2008a). Přesto některé studie popisují vztah mezi infekcí a výskytem průjmových onemocnění (Pavlásek 1997, Hamnes a kol. 2006). My jsme kryptosporidie prokázali v 70 (34 %) vzorcích normálního trusu a v 8 (22,9 %) vzorcích průjmové konzistence. Z toho se ve třech případech jednalo o infekci smíšenou s isosporou, eimerí a giardií. Na základě našich zjištění nelze prokázat vztah mezi průjmem a kryptosporidii jako primárním infekčním agens.

Stejně jako u isospor, je i u kryptosporidií často diskutována jejich sezónnost. Yu a Seo (2004), Maddox-Hyttel a kol. (2006) a Chen a Huang (2007) uvádí vyšší výskyt v zimních měsících oproti létu. V rámci této práce byl zaznamenán vyšší výskyt v jarním období. Při porovnání jednotlivých měsíců bylo vyšší procento pozitivních vzorků nalezeno taktéž v chladnějších měsících (březen, duben a listopad). K opačnému závěru došli Chai a kol. (2001), kteří popsali nejvyšší výskyt v letním období.

V rámci této práce jsme provedli i genotypizaci nalezených kryptosporidií. U prasat bylo do dnešní doby prokázáno šest druhů/genotypů kryptosporidií (Kváč a kol. 2008a). Nejčastěji je u prasat popisována infekce s *C. suis* vyskytující se převážně u selat před odstavem a *Cryptosporidium* pig genotyp II. vyskytující se u starších kategorií (Langkjaer a kol. 2007, Johnson a kol. 2008). Dalšími identifikovanými druhy/genotypy jsou *C. parvum*, *C. muris*, *Cryptosporidium* mouse genotyp I a *Cryptosporidium* sp. (Kváč a kol. 2008a). V námi zjištěných pozitivních případech se jednalo především o genotyp *C. suis* s nejvyšší prevalencí v 5. až 7. týdnu věku (Ø 34,4 %) a nejmladší pozitivní sele s tímto genotypem bylo 12 dní staré. *Cryptosporidium* pig genotyp II jsme identifikovali pouze u 1 selete v 7. týdnu věku. Toto odpovídá i výsledkům které uvádí Kváč a kol. (2008a). Ten zaznamenal výskyt *Cryptosporidium* pig genotyp II u selat od 6. týdne věku. To vysvětluje nízkou intenzitu infekce tímto genotypem, protože naše studie již starší kategorie selat nezahrnovala.

Dalším identifikovaným druhem byla *Cryptosporidium muris*, nalezená v 1 vzorku rusu u pětítýdenního selete. Tato žaludeční kryptosporidie je hostitelsky specifická pro lloдавce a některé přežvýkavce (Xiao a kol. 2004). U prasat tento druh našli také Xiao a kol. (2006), Zintl a kol. (2007) a Kváč a kol. (2008b). Vždy se však stejně jako v našem případě jednalo pouze o ojedinělý výskyt proto je možné předpokládat že se jednalo pouze o pasáž oocysty zaživacím traktem selat.

V laboratoři veterinární a humání parazitologie Parazitologického ústavu AV ČR bylo také provedeno vyšetření 123 vzorků trusu jatečných prasat a 21 vzorků trusu prasnic

pocházejících ze 14 farem včetně 3 námi sledovaných. Oocysty kryptosporidií byly identifikovány u 36 jatečných prasat (29 %) a u 2 prasnic (10 %). V 21 případech se jednalo o monoinfekci *Cryptosporidium* pig genotyp II a v 15 případech byla zjištěna směsnou infekci *Cryptosporidium* pig genotyp II a *Cryptosporidium suis*. U obou prasnic byl pak infikován *Cryptosporidium parvum* subgenotyp IIaA16G1R1, který byl u prasat popsán poprvé (Kváč a kol. 2008).

6. ZÁVĚR

- Celková prevalence **isospor** činila 14,2 %.
- Nejvyšší výskyt byl zaznamenán u sajících selat (21 %) s maximálním výskytem v 2. týdnu věku (40 %).
- Nejmladší infikované sele bylo 9 dní staré.
- Průjem se vyskytl u 19 % pozitivních vzorků – nebyl prokázán vztah mezi isosporovou infekcí a průjmovým onemocněním.
- Intenzita infekce byla převážně velmi slabá (69 %), v 8 % však byla zaznamenána i infekce silná.
- Nejnižší frekvence výskytu byla zaznamenána v chovu s bezstelivovou technologií (4 % - Vranín).
- Nebyla prokázána sezónnost výskytu.

- Celková prevalence **eimerií** činila 5,7 %.
- Nejvyšší výskyt byl zaznamenán u selat odstavených (11 %).
- Maximální výskyt byl v 6. až 7. týdnu věku.
- Průjem se vyskytl u 19 % pozitivních vzorků - nebyl prokázán vztah mezi eimeriovou infekcí a průjmovým onemocněním.
- Při porovnání bezstelivové a stelivové technologie chovu nebyl zjištěn rozdíl frekvence výskytu parazita.
- Intenzita infekce byla převážně velmi slabá (88 %).
- Vyšší procento pozitivních vzorků bylo zjištěno v jarním období.

- Celková prevalence **giardií** činila 2,4 %.
- Výskyt byl zaznamenán u selat ve 3. až 5. týdnu věku.
- Intenzita infekce byla jen velmi slabá (80 %) a slabá.
- Giardiae byly nalezené ve všech sledovaných chovech.

- Celková prevalence **kryptosporidií** činila 19 %.
- Nejvyšší výskyt byl zaznamenán u selat odstavených (26 %).
- Nejmladší infikované sele bylo 3 dny staré.

- Průjem se vyskytl u 12 % pozitivních vzorků – nebyl prokázán vztah mezi kryptosporidiovou infekcí a průjmovým onemocněním.
- Byli zjištěny všechny stupně intenzity infekce. V 50 % pozitivních vzorků se jednalo o infekci velmi slabou (69 %) a v 6 % byla zaznamenána i infekce silná.
- Frekvence výskytu byla nejvyšší v jarním období.
- Při vyšetření obarvených roztěrů bylo zaznamenáno vyšší procento pozitivních vzorků oproti vyšetření flotačně-koncentrační metodou (o 28 %).
- Na základě molekulárních analýz byl nejčastěji popsán druh *Cryptosporidium suis* a v jednotlivých případech i *Cryptosporidium* pig genotyp II a *Cryptosporidium muris*.
- Kryptosporidie se v 18 vzorcích vyskytli společně s dalšími sledovanými parazity.

7. SUMMARY

In two years of observation, (spring 2006, autumn 2006, spring 2007 and autumn 2007) were being screened for parasites in total 495 faecal samples coming out of three farms from Ceske Budejovice (285 samples of suckling pigs not older then 28 days and 174 samples of piglets not older then 8 weeks). The method used to examine those samples was a flotation-concentrating method (Sheather's sugar solution) and in the year of 2007 was also used a specific aniline-carbol-methyl violet staining method to detect the *Cryptosporidium* spp. followed by genotyping which used and applied molecular indicators.

In screened samples were mainly detected parasites named *Cryptosporidium* spp., found in 4,1 % of faecal samples in 2006 and in 2007 in 32,8 % faecal samples, out of which 14,4 % was found in pre-weaned piglets samples and 26,4 % in post-weaned piglets. Based on genotyping provided on positive samples out of the year 2007, using method of sequencing analysis SSU rRNA, was the occurrence of *C. suis*, *Cryptosporidium* pig genotype II a *C. Muris* described.

High prevalence of *Isospora suis* 13,9 % (64/459) was also detected with its appearance, in particular, in pre-weaned piglets 21,4 % (61/285). Further on, some of other identified group was *Eimerie* spp. 5,7 % (26/459) infecting, in the main, post-weaned piglets 10,9% (19/174) and *Giardia intestinalis* 2,4 % (10/459).

Most of the samples mentioned occurred in conditioned faeces and there is no seasonal relationship to the parasital occurrence.

8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

ADAM R. D. 2001: Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. p. 447–475.

ATWILL E. R., SWEITZER R. A., PEREIRA M. G., GARDNER I. A., VAN VUREN D., BOYCE W. M. 1997: Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3946-3949.

BALOUNOVÁ K. 2005: Kokcidióza selat a její vliv na ekonomiku chovu. Překlad z International Pig Topics 6/2004. Náš chov 54(7): P29-30.

BERGELAND M. E. 1977: Necrotic enteritis in nursing piglets. Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. 20: 151-158.

CURRENT W. L. AND GARCIA L. S. 1991: Cryptosporidiosis. Clin. Microbiol. Rev. p. 325-358.

DAUGSCHIES A., MEYER C., JOACHIM A. 1999: Vorkommen von *Isospora suis* in Ferkelerzeuger- und Ferkelaufzuchtbetrieben. Praktischer Tierarzt 80(6): 530-537.

DAUGSCHIES A., BÖSE R., MARX J., TEICH K., FRIEDHOFF K. T. 2002: Development and application of a standardized assay for chemical disinfection of coccidia oocyst. Vet. Parasitol. 103: 299–308.

DAUGSCHIES A., IMAROM S., GANTER M., AND BOLLWAHN W. 2004: Prevalence of *Eimeria* spp. in Sows at Piglet-producing farms in Germany. J. Vet. Med. B 51, 135-139.

DE GRAAF D. C., VANOPDENBOSCH E., ORTEGA-MORA L. M., ABBASSI H., PEETERS J. E. 1999: A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. Int. J. Parasitol. 29: 1269-1287.

DRAŽAN J. A KOL. 1987: Nemoci prasat. SZN Praha, 233s.

ENEMARK H. L., AHRENS P., BILLE-HANSEN V., HEEGARD P. M. H., VIGRE H., THAMSBORG S. M., LIND P. 2003: *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the „porcine genotype“. Parasitol. 126: 407-416.

ERNST J. V., LINDSAY D. S., JARVINEN J. A., TODD K. S., BANE D. P. 1986: The sporulation time of *Isospora suis* oocysts from different sources. Vet. Parasitol. 22: 1-8.

FAYER R., SPEER C. A., DUBEY J. P. 1997: The general biology of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R. (Ed.). CRC Press. pp. 2-33.

FAYER R., MORGAN U., UPTON S. J. 2000: Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. J. Parasitol. 30: 1305-1322.

FAYER R. 2004: *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 126: 37-56

FLETA J., SÁNCHEZ-ACEDO C., CLAVEL A., QUÍLEZ J. 1995: Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs. Vet. Parasitol. 59: 201-205.

FOREYT W. J. 2001: Veterinary Parasitology – reference manual. Blackwell Publishing Professional. 74 – 75, 137-148.

GUSELLE N. J., APPELBEE A. J., OLSON M. E. 2003: Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. Vet. Parasitol. 113: 7-18.

HAMADEJOVÁ K., VÍTOVEC J. 2005: Occurrence of the coccidium *Isospora suis* in piglets. Vet. Med. – Czech 50(4): 159-163.

HAMADEJOVÁ K. 2005: Výskyt parazitů zaživacího ústrojí prasat v různých technologiích odchovu. Disertační práce ZF JČU.

HAMNES I. S., GJERDE B., ROBERTSON L. 2006: Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. Vet. Parasitol. 140: 204-216.

JOHNSON J., BUDDLE R., REID S., ARMSON A., RYAN U. M. 2008: Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. *Experimental Parasitol.* 119: 418–421.

KARAMON J., ZIOMKO I., CENCEK T. 2007: Prevalence of *Isospora suis* and *Eimeria* spp. in suckling piglets and sows in Poland. *Vet. Parasitol.* 147: 171-175.

KENNEDY G. A., KREITNER G. L., STRAFUSS A. C. 1977: Cryptosporidiosis in three pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170: 348-350.

KOŘÍNKOVÁ K. 2006: Obecná parazitologie. PřF UJEP Ústí nad Labem. 88s.

KOUDELA B., VÍTOVEC J., ŠONKOVÁ J., VOBROVÁ D. 1986: Coccidiosis in suckling piglets raised on large farms (in Czech). *Vet. Med. (Praha)* 31: 725-732.

KOUDELA B., VÍTOVEC J. 1987: Patology of natural isosporosis in nursing piglets. *Folia Parasitol.* 34: 199- 204.

KOUDELA B., NOHÝNKOVÁ E., VÍTOVEC J., PAKANDL M., KULDA J. 1991: *Giardia* infection in pigs: Detection and *in vitro* isolation of trophozoites of the *Giardia intestinalis* group. *Parasitology* 102: 163-166.

KOUDELA B. 1995: Giardie u hospodářských zvířat. *Veterinářství.* 8: 365- 369.

KOUDELA B., VÍTOVEC J. 1998: Diagnostika kokcidiózy sajících selat. *Veterinářství* 36(1): 23-24.

KOUDELA B. 1999: Kokcidióza sajících selat. *Vet. Med. (Praha)* 44: 183- 191.

KOUDELA B., KUČEROVÁ Š. 1999: Role of acquired immunity and natural age resistance on course of *Isospora suis* Coccidiosis in nursing piglets. *Vet. Parasitol.* 82: 93-99.

KOUDELA B. 2000a: Kokcidie *Isospora suis* - významný původce průjmového onemocnění selat. *Farmář* 7-8: 78-79.

KOUDELA B. 2000b: Kryptosporidie jako původci zoonotického onemocnění. Veterinářství 10: 408-409.

KOUDELA B. 2001: Parazité zvířat jako původci onemocnění člověka. Farmář 2: 69-70.

KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D. 2005: Druhy a genotypy kryptosporidií parazitující u skotu. Veterinářství 6: 356-358.

KVÁČ M., HANZLÍKOVÁ D., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D. 2008a: Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic. Vet. Parasitol.- 4636.

KVÁČ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., DITRICH O., HOFMANNOVÁ L., MODRÝ D., VÍTOVEC J., XIAO L. 2008b: Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. Vet. Parasitol. 153: 363-367.

KVÁČ M., SAK B., HANZLÍKOVÁ D., KOTILOVÁ J., KVĚTOŇOVÁ D. 2009: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. Parasitol. Res. 104: 425-428.

LANDOVÁ L., VÍTOVEC J. 2005: Výskyt a sezónní dynamika kokcidie *Isospora suis*. Series for Snímal Sciences 22(2): 101-106.

LANGKJAER R. B., VIGRE H., ENEMARK H. L., MADDOX-HYTTEL C. 2007: Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. Parasitology 134: 339-350.

LARSEN K. 1996: *Isospora suis* Porcine neonatal coccidiosis. Dan. Vet. J. 79: 387-392.

LINDSAY D. S., CURRENT W. L., ERNST J. V. 1983: Excystation of *Isospora suis* Bister, 1934 of swine. Z. Parasiten-kde. 69: 27-34.

LINDSAY D. S., ERNST J. V., CURRENT W. L., START B. P., STEWARD T. B. 1984: Prevalence of oocysts of *Isospora suis* and *Eimeria* spp. from sows on farms with and without a history of neonatal coccidiosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 185: 419-421.

LINDSAY D. S., BLAGBURN B. L. 1994: Biology of mammalian *Isospora*. Parasitol. Today 10: 214-220.

LUKEŠOVÁ D., ŽIŽLAVSKÝ M., DRÁBEK J. 1997: Parazitózy parasat - ekonomická závažnost a možnosti využití antiparazitik. Náš chov 6: 48-50.

MACEK R. 2006: Isosporóza selat. Náš chov 1: P23-24.

MACKENZIE W. R., HOXIE N. J., PROCTOR M. E., GRADUS M. S., BLAIR K. A., PETERSON D. E., KAZMIERCZAK J. J., ADDISS D. G., FOX K. R., ROSE J. B., DAVIS J. P. 1994: A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infections transmitted through the public water supply. n. Eng. J. Med. 331: 161-167.

MADDOX-HYTTEL C. H., LANGSKJAER R. B., ENEMARK H. L., VIGRE H. 2006: *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs. Occurrence and management associated risk factors. Vet. Parasitol. 141: 48-59.

MEYER, C., JOACHIM A., DAUGSCHIES A. 1999: Occurrence of *Isospora suis* in larger piglet production units and on specialized piglet rearing farms. Vet. Parasitol. 82: 277-284.

MILÁČEK P., VÍTOVEC J. 1985: Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. Folia Parasitol. 32-50.

MOON H. W., BEMRICK W. J. 1981: Fecal transmission of calf cryptosporidia between calves and pigs. Vet. Pathol. 18: 248-255.

MORGAN U. M., SARGENT K. D., DEPLAZES P., FORBES D. A., SPANO F., HERTZBERG H., ELLIOT A., THOMPSON R. C. 1998: Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. Parasitology 117: 31-37.

MORGAN U. M., BUDDLE J. R., ARMSON A., ELLIOT A., THOMPSON R. C. A. 1999: Molecular and biological characterization of *Cryptosporidium* in pigs. Aust. Vet. J. 77: 44-47.

NÁPRAVNÍK J., ZAJÍČEK D. 1993: Tlumení parazitóz v chovech prasat. Metodika ÚZPI. Praha: 28s.

NÚÑEZ A., MCNEILLY F., PEREA A., SÁNCHEZ-CORDÓN P. J., HUERTA B., ALLAN G., CARRASCO L. 2003: Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2. J. Vet. Med. B. 50: 255-258.

O'DONOGHUE P. J. 1995: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. J. Parasitol. 25: 139-195.

OLSON M. E., THORLAKSON C. L., DESELLIERS L., MORCK D. W., MCALLISTER T. A. 1997: *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. Vet. Parasitol. 68: 375-381.

O'NEIL P. A., PARFITT I. W. 1976: Observation on *Isoospora suis* infection in a minimal disease pig herd. Vet. Rec. 9: 321-323.

OTTEN A., TAKLA M., DAUGSCHIES A., ROMMEL M. 1996: Untersuchungen zur Epizootiologie und pathogenen Bedeutung von Infektionen mit *Isoospora suis* in zehn Ferkelerzeugerbetrieben in Nordrhein - Westfalen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 109: 220-223.

PADILLA M. A., VILLAPANDO R., LUCAS S. F., CRUEL J. N., DIVINA B. P., EDUARDO S. L. 2001: Prevalence of swine coccidiosis in the Philippines. The 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Vet. Par. Itali 54.

PANCIERA R. J., THOMASSEN R. W., GARNER F. M. 1971: Cryptosporidial infection in a calf. Vet. Pathol. 8: 479-484.

PAVLÁSEK I. 1995: Kryptosporidie u savců. Veterinářství 6: 265-271.

PAVLÁSEK I. 1997: Výskyt *Cryptosporidium parvum* u odstavených selat. *Náš chov* 46: 23-24.

PEREIRA S. J., RAMIREZ N. E., XIAO L., WARD L. A., 2002: Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *J. Infect. Dis.* 186: 715-718.

QUÍLEZ J., SÁNCHEZ-ACEDO C., CLAVE A., DEL CACHO E., LÓPEZ-BERNAD F. 1996: Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 56: 345-348.

REBANOVÁ V. 1998: Protozoologie. JČU Č. Budějovice. 64s.

ROMMEL M., ECKERT J., KUTZER E., KÖRTING W., SCHNIEDER T. (EDS.) 2000: Veterinärmedizinische Parasitologie. 5. Auflage. Parey Buchverlag, Berlin, 914 pp.

RYAN U. M., SAMARASINGHE B., READ C., BUDDLE J. R., ROBERTSON I. D., THOMPSON R. C. A. 2003: Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3970-3974.

RYAN U. M., MONIS P., ENEMARK H. L., SULAIMAN L., SAMARASINGHE B., READ C., BUDDLE R., ROBERTSON I., ZHOU L., THOMPSON R. C., XIAO L. 2004: *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* 90: 769-773.

RYAN U. M., READ C., HAWHINS P., WARNECKE M., SWANSON P., GRIFFITH M., DEERE D., CUNNINGHAM M., COX, P. 2005: Genotypes of *Cryptosporidium* from Sydney water catchment areas. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1221-1229.

RYŠAVÝ B., ČERNÁ Ž., CHALUPSKÝ J., ORSZÁGH I., VOJTEK J. 1989: Základy parazitologie. SPN Praha. 216 s.

SANFORD S. E. 1983: Porcine neonatal coccidiosis: clinical, pathological, epidemiological and diagnostic features. *Calif. Vet.* 37: 26-30.

SANFORD S. E. 1987: Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1981-1985). J. Am. Vet. Med. Assoc. 190: 695-698.

STUART B. P., LINDSAY D. S. 1986: Coccidiosis in swine. In: Herd R., Gibbs H. C., Murrell K. D. (eds.): The veterinary Clinics of the North America Food Animal Practice. Philadelphia, PA, W. B. Saunders. Vol. 2: 455-468.

SUÁREZ-LUENGAS L., CLAVEL A., QUÍLEZ J., GOÑI-CEPERO M. P., TORRES E., SÁNCHEZ- ACEDO C., DEL CACHO E. 2007: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain), Vet. Parasitol. 148: 231-235.

SVOBODOVÁ V., DOLEŽIL Z. 2001: Diagnostické metody giardiózy. Veterinářství 1: 29-30.

TUBBS R. C. 1987: Controlling coccidiosis in neonatal Pig. Vet. Society, Hamburg 729.

TZIPORI S., SMITH M., T. MAKIN, HALPIN C. 1982: Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from calf faeces. Vet. Parasitol. 11: 121-126.

VÍTOVEC J., KOUDELA B. 1987: Natural cyrptosporidiosis in a piglet suffering from pseudomembranous typhlitis. Folia Parasitol. 34: 378.

VÍTOVEC J., KOUDELA B. 1990: Double alteration of the small intestine in conventional and gnotobiotic piglets experimentally infected with the coccidium *Isoospora suis* (Apicomplexa: Eimeriidae). Folia Parasitol. 37: 21-33.

VÍTOVEC J., KOUDELA B., KUDWEIS M. 1990: Endoparaziti významných hospodářských zvířat a jejich patogenita. Parazité ve velkochovech a možnosti prevence. Závěrečná zpráva, České Budějovice.

VÍTOVEC J., KOUDELA B. 1992: Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. Vet. Parasitol. 43: 25-36.

VÍTOVEC J., HAMADEJOVÁ K., LANDOVÁ L., KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B. 2006: Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. J. Vet. Med.B. 53: 239-243.

VOJTKOVÁ L. 1987: Zoologie bezobratlých I. UJEP Brno.

WENG Y. B., HU Y.J., LI Y., LI B. S., LIN R. Q., XIE D. H., GASSER R. B., ZHU X. Q. 2005: Survey of intestinal parasites in pigs from intensive farms in Guangdong Province, People's Republic of China. Vet. Parasitol. 127: 333- 336.

WIELER L. H., ILIEFF A., HERBST W., BAUER C., WIELER E., BAUERFEIND R., FAILING K., KLOS H., WENGERT D., BALJER G., ZAHNER H. 2001: Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. J. Vet. Med. B. 48: 151-159.

XIAO L., HERD R. P., BOWMAN G. L. 1994: Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. Vet. Parasitol. 52: 331-336.

XIAO L., BERN C., ARROWOOD M., SULAIMAN I., ZHOU L., KAWAI V., VIVAR A., LAL A. A., GILMAN R. H. 2002: Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. J. Infect. Dis. 185: 1846-1848.

XIAO L., FAYER R., RYAN U., UPTON S. J. 2004: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev. 17: 72-97.

XIAO L., MOORE J. E., UKOH U., GATEI W., LOWERY C. J., MURPHY T. M., DOOLEY J. S. G., MILLAR B. C., ROONEY P. J., RAO J. R. 2006: Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4461-4463.

XIAO L., FAYER R. 2008: Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission International J. Parasitol. 38: 1239–1255.

XIAO L., RYAN U. M. 2008: Molecular epidemiology. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, second ed. CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, FL, pp. 119–163.

YU J. R., SEO M. 2004: Infection status of pigs with *Cryptosporidium parvum*. The Korean J. Parasitol. 42: 45-47.

ZAJÍČEK D. 1988: Ochranou zdraví zvířat ke zdravé potravíně. Veterinářství 38: 388-390.

ZAJÍČEK D. 1989: Průzkum výskytu kokcidiózy selat. Veterinářství 39: 120-121.

ZINTL A., NEVILLE D., MAGUIRE D., FANNING S., MULCAHY G., SMITH H. V., DE WAAL T. 2007: Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. Parasitology 134: 1575-1582.

ŽIŽLAVÝ M., LUKEŠOVÁ D., LIMANOVSKÝ M. 1998: Prevalence endoparazitóz v chovech prasat a vyhodnocení účinnosti odčervení flubendazolem. Veterinářství 48(11): 467-469.

INTERNET - <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

9. PŘÍLOHY

1. Tabulkové vyjádření výsledků:

Tabulka 6: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat sajících - Libníč

Tabulka 7: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat po odstavu - Libníč

Tabulka 8: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat sajících - Vráto

Tabulka 9: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat po odstavu - Vráto

Tabulka 10: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat sajících - Vranín

Tabulka 11: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat po odstavu - Vranín

Tabulka 12: Prevalence isosporózy dle věku selat ve dnech a týdnech

Tabulka 13: Prevalence kryptosporidií dle věku selat v týdnech

Tabulka 14: Prevalence eimerií a giardií dle věku selat v týdnech

Tabulka 15: Sezónní dynamika *isospory suis* v jednotlivých měsících

Tabulka 16: Sezónní dynamika kryptosporydií v jednotlivých měsících

Tabulka 17: Vztah konzistence trusu k výskytu kryptosporidií

Tabulka 18: Vztah konzistence trusu k výskytu isospor, eimerií a giardií

Tabulka 19: Intenzita infekce jednotlivých parazitů

Tabulka 20: Výskyt monoinfekce a smíšené infekce v jednotlivých chovech

2. Článek:

Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic

Martin Kváč, Bohumil Sak, Dagmar Hanzlíková, **Jiřina Kotilová**, Dana Květoňová

Tabulka 6: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat sajících - Libnič

| Libnič – selata sající | Celkem odebráno | | isospora | | eimerie | | kryptosporidie | | giardie | |
|------------------------|-----------------|------|----------|------|---------|-----|----------------|-----|---------|-----|
| | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % |
| Jaro 2006 | 41 | 31,7 | 10 | 24,4 | 0 | 0,0 | 1 | 2,4 | 2 | 4,9 |
| Podzim 2006 | 46 | 26,1 | 9 | 19,6 | 0 | 0,0 | 1 | 2,2 | 2 | 4,3 |
| Jaro 2007 | 31 | 35,5 | 7 | 22,6 | 2 | 6,5 | 2 | 6,5 | 0 | 0,0 |
| celkem | 118 | 30,5 | 26 | 22,0 | 2 | 1,7 | 4 | 3,4 | 4 | 3,4 |

Tabulka 7: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat po odstavu - Libnič

| Libnič - odstav | Celkem odebráno | | isospora | | eimerie | | kryptosporidie | | giardie | |
|-----------------|-----------------|------|----------|-----|---------|------|----------------|------|---------|-----|
| | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % |
| Jaro 2006 | 11 | 36,4 | 0 | 0,0 | 1 | 9,1 | 3 | 27,3 | 0 | 0,0 |
| Podzim 2006 | 45 | 8,9 | 0 | 0,0 | 1 | 2,2 | 2 | 4,4 | 1 | 2,2 |
| Jaro 2007 | 37 | 64,9 | 0 | 0,0 | 4 | 10,8 | 18 | 48,6 | 2 | 5,4 |
| celkem | 93 | 34,4 | 0 | 0,0 | 6 | 6,5 | 23 | 24,7 | 3 | 3,2 |

Tabulka 8: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat sajících - Vráto

| Vráto - selata sající | Celkem odebráno | | isospora | | eimerie | | kryptosporidie | | giardie | |
|-----------------------|-----------------|------|----------|------|---------|------|----------------|------|---------|-----|
| | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % |
| Jaro 2006 | 49 | 30,6 | 12 | 24,5 | 1 | 2,0 | 2 | 4,1 | 0 | 0,0 |
| Podzim 2006 | 9 | 55,6 | 4 | 44,4 | 1 | 11,1 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Jaro 2007 | 36 | 55,6 | 8 | 22,2 | 2 | 5,6 | 9 | 25,0 | 1 | 2,8 |
| Podzim 2007 | 19 | 84,2 | 8 | 42,1 | 0 | 0,0 | 7 | 36,8 | 1 | 5,3 |
| celkem | 113 | 49,6 | 32 | 28,3 | 4 | 3,5 | 18 | 15,9 | 2 | 1,8 |

Tabulka 9: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat po odstavu - Vráto

| Vráto - odstav | Celkem odebráno | | isospora | | eimerie | | kryptosporidie | | giardie | |
|----------------|-----------------|------|----------|-----|---------|------|----------------|------|---------|-----|
| | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % |
| Jaro 2006 | 4 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Podzim 2006 | 16 | 12,5 | 1 | 6,3 | 1 | 6,3 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Jaro 2007 | 27 | 51,9 | 1 | 3,7 | 5 | 18,5 | 8 | 29,6 | 0 | 0,0 |
| Podzim 2007 | 11 | 54,5 | 0 | 0,0 | 2 | 18,2 | 4 | 36,4 | 0 | 0,0 |
| celkem | 58 | 37,9 | 2 | 3,4 | 8 | 13,8 | 12 | 20,7 | 0 | 0,0 |

Tabulka 10: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat sajících - Vranín

| Vranín - selata sající | Celkem odebráno | | isospora | | eimerie | | kryptosporidie | | giardie | |
|------------------------|-----------------|------|----------|-----|---------|-----|----------------|------|---------|-----|
| | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % |
| Jaro 2007 | 24 | 16,7 | 0 | 0,0 | 1 | 4,2 | 3 | 12,5 | 0 | 0,0 |
| Podzim 2007 | 30 | 63,3 | 2 | 6,7 | 0 | 0,0 | 16 | 53,3 | 1 | 3,3 |
| celkem | 54 | 42,6 | 2 | 3,7 | 1 | 1,9 | 19 | 35,2 | 1 | 1,9 |

Tabulka 11: Prevalence a sezónní dynamika parazitů u selat po odstavu - Vranín

| Vranín - odstav | Celkem odebráno | | isospora | | eimerie | | kryptosporidie | | giardie | |
|-----------------|-----------------|------|----------|------|---------|------|----------------|------|---------|-----|
| | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % | počet | % |
| Jaro 2007 | 10 | 80,0 | 1 | 10,0 | 3 | 30,0 | 4 | 40,0 | 0 | 0,0 |
| Podzim 2007 | 13 | 69,2 | 0 | 0 | 2 | 15,4 | 7 | 53,8 | 0 | 0,0 |
| celkem | 23 | 73,9 | 1 | 4,3 | 5 | 21,7 | 11 | 47,8 | 0 | 0,0 |

Tabulka 12: Prevalence isosporózy dle věku selat ve dnech a týdnech

| Věk (dny, týdny) | Počet vyšetřených vzorků | Počet pozitivních vzorků | % pozitivních vzorků | Věk (dny, týdny) | Počet vyšetřených vzorků | Počet pozitivních vzorků | % pozitivních vzorků |
|------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 22 | 13 | 3 | 23,08 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 23 | 15 | 1 | 6,67 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 24 | 16 | 1 | 6,25 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 25 | 11 | 1 | 9,09 |
| 5 | 1 | 0 | 0 | 26 | 24 | 1 | 4,17 |
| 6 | 3 | 0 | 0 | 27 | 15 | 1 | 6,67 |
| 7 | 4 | 0 | 0 | 28 | 19 | 0 | 0,00 |
| 1 | 8 | 0 | 0 | 4 | 113 | 8 | 7,08 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 29 | 16 | 0 | 0,00 |
| 9 | 2 | 1 | 50,00 | 30 | 14 | 1 | 7,14 |
| 10 | 12 | 8 | 66,67 | 31 | 26 | 0 | 0,00 |
| 11 | 8 | 3 | 37,50 | 32 | 19 | 1 | 5,26 |
| 12 | 15 | 6 | 40,00 | 33 | 8 | 0 | 0,00 |
| 13 | 16 | 6 | 37,50 | 34 | 15 | 0 | 0,00 |
| 14 | 14 | 3 | 21,43 | 35 | 11 | 0 | 0,00 |
| 2 | 67 | 27 | 40,30 | 5 | 109 | 2 | 1,83 |
| 15 | 12 | 5 | 41,67 | 6 | 40 | 1 | 2,50 |
| 16 | 13 | 5 | 38,46 | 7 | 17 | 0 | 0,00 |
| 17 | 13 | 2 | 15,38 | 8 | 8 | 0 | 0 |
| 18 | 8 | 4 | 50,00 | 1-4 týden věku | 285 | 61 | 21,40 |
| 19 | 20 | 4 | 20,00 | | | | |
| 20 | 18 | 6 | 33,33 | | | | |
| 21 | 13 | 0 | 0,00 | odstav | 174 | 3 | 1,72 |
| 3 | 97 | 26 | 26,80 | celkem | 459 | 64 | 13,94 |

Tabulka 13: Prevalence kryptosporidií dle věku selat v týdnech

| věk / týdny | 2006 | | | 2007 | | |
|-------------|-----------|----------------|---------------|-----------|----------------|---------------|
| | vyšetřeno | kryptosporidie | % pozitivních | vyšetřeno | kryptosporidie | % pozitivních |
| 1 | 6 | 0 | 0,0 | 2 | 2 | 100 |
| 2 | 32 | 0 | 0,0 | 35 | 11 | 31,4 |
| 3 | 53 | 1 | 1,9 | 44 | 9 | 20,5 |
| 4 | 54 | 3 | 5,6 | 59 | 15 | 25,4 |
| 5 | 50 | 4 | 8,0 | 61 | 25 | 41,0 |
| 6 | 23 | 1 | 4,3 | 22 | 9 | 40,9 |
| 7 | 3 | 0 | 0,0 | 10 | 5 | 50,0 |
| 8 | 0 | 0 | 0,0 | 5 | 2 | 40,0 |
| celkem | 221 | 9 | 4,1 | 238 | 78 | 32,8 |

Tabulka 14: Prevalence eimerií a giardií dle věku selat v týdnech

| věk / týdny | vyšetřeno | eimerie | % pozitivních | giardie | % pozitivních |
|-------------|-----------|---------|---------------|---------|---------------|
| 1 | 8 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| 2 | 67 | 1 | 1,49 | 0 | 0,00 |
| 3 | 97 | 2 | 2,06 | 3 | 3,09 |
| 4 | 113 | 4 | 3,54 | 4 | 3,54 |
| 5 | 109 | 7 | 6,42 | 2 | 1,83 |
| 6 | 40 | 7 | 17,50 | 1 | 2,50 |
| 7 | 17 | 4 | 23,53 | 0 | 0,00 |
| 8 | 8 | 1 | 12,5 | 0 | 0,00 |
| celkem | 459 | 26 | 5,66 | 10 | 2,39 |

Tabulka 15: Sezónní dynamika *isospory suis* v jednotlivých měsících

| Isospora | Březen | Duben | Květen | Říjen | Listopad |
|----------|--------|-------|--------|-------|----------|
| 2006 | 33,3 | 22,9 | 18,0 | 14,3 | 8,7 |
| 2007 | 11,3 | 7,6 | 20,0 | 26,7 | 4,7 |
| Celkem | 14,5 | 11,8 | 18,5 | 18,0 | 6,7 |

Tabulka 16: Sezónní dynamika kryptosporidií v jednotlivých měsících

| Kryptosporidie | Březen | Duben | Květen | Říjen | Listopad |
|----------------|--------|-------|--------|-------|----------|
| 2006 | 1 | 5 | 0 | 1 | 2 |
| 2007 | 12 | 25 | 6 | 11 | 12 |
| Celkem | 21,0 | 23,6 | 7,4 | 12,0 | 15,7 |

Tabulka 17: Vztah konzistence trusu k výskytu kryptosporidií

| Konzistence trusu | 2006 | | | 2007 | | |
|-------------------|--------|----------------|---------------|--------|----------------|---------------|
| | celkem | kryptosporidie | % pozitivních | celkem | kryptosporidie | % pozitivních |
| Formovaný | 145 | 5 | 3,45 | 171 | 55 | 32,16 |
| Pastovitý | 42 | 2 | 4,76 | 32 | 15 | 46,88 |
| Krémovitý | 26 | 0 | 0,00 | 20 | 6 | 30,00 |
| Vodnatý | 8 | 2 | 25,00 | 15 | 2 | 13,33 |

Tabulka 18: Vztah konzistence trusu k výskytu isospor, eimerií a giardií

| 2006 a 2007 | celkem | isospora | % pozitivních | eimerie | % pozitivních | giardie | % pozitivních |
|-------------|--------|----------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|
| Formovaný | 316 | 37 | 11,71 | 19 | 6,01 | 6 | 1,90 |
| Pastovitý | 74 | 14 | 18,92 | 1 | 1,35 | 2 | 2,70 |
| Krémovitý | 46 | 7 | 15,22 | 3 | 6,52 | 2 | 4,35 |
| Vodnatý | 23 | 5 | 21,74 | 3 | 13,04 | 0 | 0,00 |

Tabulka 19: Intenzita infekce jednotlivých parazitů

| | isospora | eimerie | giardie | kryptosporidie 06 | kryptosporidie 07 |
|---------------|----------|---------|---------|-------------------|-------------------|
| Velmi slabá | 44 | 22 | 8 | 7 | 33 |
| Slabá | 8 | 2 | 2 | 2 | 22 |
| Středně silná | 7 | 1 | 0 | 0 | 7 |
| Silná | 5 | 0 | 0 | 0 | 4 |

Tabulka 20: Výskyt monoinfekce a smíšené infekce v jednotlivých chovech

| | Počet pozitivních vzorků | | |
|-----------------------------------|--------------------------|-------|--------|
| | Libníč | Vráto | Vranín |
| Monoinfekce | 58 | 62 | 28 |
| Kryptosporidie + giardie | 1 | 1 | 1 |
| Kryptosporidie + isospora | 1 | 3 | 3 |
| Kryptosporidie + eimerie | 2 | 4 | 2 |
| Isospora + giardie | 1 | 0 | 0 |
| Celkový počet nalezených parazitů | 68 | 78 | 40 |

Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic

Martin Kváč · Bohumil Sak · Dagmar Hanzlíková · Jiřina Kotilová · Dana Květoňová

Received: 4 September 2008 / Accepted: 23 September 2008 / Published online: 11 October 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract A total of 123 fecal samples of slaughtered finisher pigs and 21 sows from 14 farms were screened for *Cryptosporidium* spp. infection using the aniline-carbol-methyl violet staining method. Positive samples were molecularly characterized by direct sequencing of partial small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) and GP60 partial genes and polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism of SSU rRNA. *Cryptosporidium* oocysts were microscopically identified in 36 finishers (29%) and two sows (10%). Twenty-one mono-infections of *Cryptosporidium* pig genotype II and 15 mixed-infection of *Cryptosporidium* pig genotype II and *Cryptosporidium suis* in finishers were found. Both sows were infected with the *Cryptosporidium parvum* subgenotype IIaA16G1R1, which is reported from pigs for the first time.

Introduction

Cryptosporidium infection of pigs was described for the first time in USA by Bergeland (1977) and Kennedy et al.

(1977). Natural cryptosporidiosis in pigs has then been reported worldwide (Xiao et al. 1994; Quílez et al. 1996; Izumiyama et al. 2001; Wieler et al. 2001; Maddox-Hyttel et al. 2006; Vítovec et al. 2006; Xiao et al. 2006; Langkjær et al. 2007; Suárez-Luengas et al. 2007; Zintl et al. 2007). Pig cryptosporidiosis can be caused by three distinct species/genotypes of *Cryptosporidium*: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium suis*, or *Cryptosporidium* pig genotype II. Although natural infections with *C. parvum* on the pigs farms have been described only rarely (Morgan et al. 1999; Zintl et al. 2007), the infectivity and pathogenicity of *C. parvum* have been experimentally confirmed on conventional and gnotobiotic piglets (Moon and Bemrick 1981; Tzipori et al. 1982; Vítovec and Koudela 1992). The other two species/genotypes, *C. suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II, are frequently found in pigs. However, natural infections with both mentioned genotypes have been found sporadically in fattening pigs and sows (Maddox-Hyttel et al. 2006; Xiao et al. 2006; Langkjær et al. 2007; Suárez-Luengas et al. 2007; Zintl et al. 2007).

The objective of the present study was to report the occurrence of cryptosporidial infection in adult pigs grown on different farms in the Czech Republic.

Materials and methods

Sample collection and examination

A total 123 fecal samples of slaughtered finisher pigs (5.5–6 months old) and 21 sows (up to 2 years of age) were collected from the rectum immediately after slaughter at two slaughterhouses in the Czech Republic. Each sample

M. Kváč · B. Sak (✉) · D. Květoňová
Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy
of Sciences of the Czech Republic,
Branišovská 31,
370 05 České Budějovice, Czech Republic
e-mail: casio@paru.cas.cz

M. Kváč · D. Hanzlíková · J. Kotilová
Faculty of Agriculture,
University of South Bohemia in České Budějovice,
Studentská 13,
370 05 České Budějovice, Czech Republic

was individually placed into a plastic dish without fixation. Samples were stored in the dark at 4°C and analyzed within 24 h using the aniline-carbol-methyl violet staining method (Miláček and Vítovec 1985).

Molecular analyses of *Cryptosporidium* isolates

DNA isolation Genomic DNA was isolated from all *Cryptosporidium* positive samples as described previously (Sak et al. 2008).

PCR and DNA sequencing A fragment of the *Cryptosporidium* small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene, approximately 830 bp in length, was amplified by nested polymerase chain reaction (PCR) according to Jiang et al. (2005). Genotyping of *C. parvum* was performed by sequence analysis of the GP60 gene. A fragment of this gene (800 to 850 bp long) was amplified by nested PCR according to Alves et al. (2003). The secondary PCR products were sequenced using ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequences were aligned with reference sequences using ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>). In addition, SSU rRNA PCR products were analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP).

PCR-RFLP analysis *Cryptosporidium* species and genotypes were determined by nested PCR of a SSU rRNA gene fragment and RFLP analysis with the endonucleases *SspI* and *VspI* (Fermentas) as described previously (Xiao et al. 2001).

The nucleotide sequences of the GP60 gene of *C. parvum* have been deposited in the GenBank database under accession numbers EU647727-EU647728.

Results

Cryptosporidium oocysts were microscopically identified in the feces of 36 finisher pigs (29%) and two sows (10%)

Table 1 Molecular characterization of *Cryptosporidium* species/genotypes in pigs using sequencing of the SSU rRNA gene and its digestion by *SspI* and *VspI* endonucleases

| Age category | Farm | positive/ examined | species/genotypes | | |
|--------------|-------|-----------------------|-------------------|--------|------------------------|
| | | | <i>C. parvum</i> | Pig II | <i>C. suis</i> +Pig II |
| Finishers | 1 | 1/17 | 0 | 1 | 0 |
| | 2 | 21/28 | 0 | 11 | 10 |
| | 3 | 0/6 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 1/2 | 0 | 1 | 0 |
| | 5 | 0/10 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 0/5 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 8/10 | 0 | 6 | 2 |
| | 8 | 0/6 | 0 | 0 | 0 |
| | 9 | 1/9 | 0 | 1 | 0 |
| | 10 | 4/11 | 0 | 1 | 3 |
| | 11 | 0/9 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 | 0/10 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 36/123 | 0 | 21 | 15 |
| Sows | 13 | 2/13 | 2 | 0 | 0 |
| | 14 | 0/8 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 2/21 | 2 | 0 | 0 |

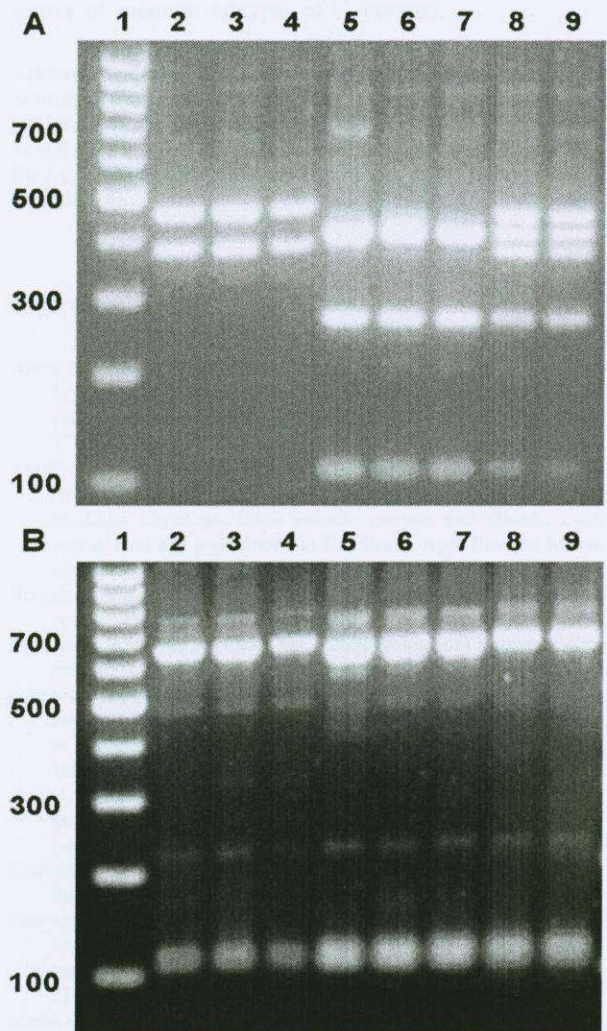


Fig. 1 *SspI* (a) and *VspI* (b) digestion of SSU rRNA gene fragment. Lane 1 Molecular weight marker (100 bp ladder, Fermentas), lanes 2–4 *Cryptosporidium suis*, lanes 5–7 *Cryptosporidium* pig genotype II, lanes 8–9 mix infection *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II

from seven farms (50%) (Table 1). No diarrhea was observed. Infection intensities were considered to be low on the basis of sporadic identification of *Cryptosporidium* oocysts in smears. Direct sequencing of 38 PCR products and their digestion with endonucleases revealed 21 mono-infections with the *Cryptosporidium* pig genotype II (100% homology to DQ182600 from GenBank) and 15 mixed-infection with *C. suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in finishers (Fig. 1). *C. suis* infections never occurred alone. Both *C. parvum* isolates in sows were identified as the Ila A16G1R1b subgenotype.

Discussion

The results of this study revealed high prevalence (30%) of *Cryptosporidium* infection in slaughtered finishers (5.5–6 months old), whereas a much lower prevalence (5–12%) has been detected in pigs of the same age category by Tacal et al. (1987), Suárez-Luengas et al. (2007), and Zintl et al. (2007). Similar results were published by Quílez et al. (1996), who found *Cryptosporidium* in 34% of 2–6 month old fattening pigs. However, their prevalence in 2–6 months old pigs could be misrepresented, since the highest *Cryptosporidium* prevalence is most often reported in pigs between 1.5 and 3 months of age (Sanford 1987; Guselle et al. 2003; Maddox-Hyttel et al. 2006; Vítovec et al. 2006). Moreover, other studies have shown low prevalence in pigs older than 9 months (Xiao et al. 1994; Atwill et al. 1997; Maddox-Hyttel et al. 2006). In contrast, the results of prevalence in sows are not affected by various age category interpretations. Our data of prevalence in sows corresponded with those of other authors (Maddox-Hyttel et al. 2006; Suárez-Luengas et al. 2007; Zintl et al. 2007).

Sequence analysis of a fragment of the SSU rRNA gene revealed the presence of two genetically distinct, host-specific *Cryptosporidium* species/genotypes in finishers known to occur in pigs, *C. suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. In agreement with other studies (Langkjær et al. 2007; Suárez-Luengas et al. 2007), we found the higher prevalence of the pig genotype II than *C. suis* in older pigs. Moreover, PCR-RFLP analysis revealed the presence of *C. suis* in mixed infections with pig genotype II in more than 50% cases. Although the PCR-RFLP tool or other PCR techniques can differentiate a wide range of *Cryptosporidium* spp., the result depends on PCR amplification of the dominate species/genotype. Our results showed almost identical infection rate of both the above-mentioned *Cryptosporidium*, although *C. suis* is more frequently found in piglets or weaners (Langkjær et al. 2007; Suárez-Luengas et al. 2007; Zintl et al. 2007).

Although infectivity of *C. parvum* for pigs has been confirmed experimentally (Moon and Bemrick 1981;

Tzipori et al. 1982; Vítovec and Koudela 1992), natural infections with this species have been rarely reported (Morgan et al. 1999; Zintl et al. 2007). Similarly as Zintl et al. (2007), we found *C. parvum* infections in mature sows, although this species is generally known to be infective for juvenile animals only.

The GP60 gene sequences analyses of *C. parvum* from our isolates revealed the allele Ila subtype A16G1R1, which has been previously described from cattle and humans only (Trotz-Williams et al. 2006; Misić and Abe 2007; Plutzer and Karanis 2007; GenBank accession no. AM937009). This is the first report of the above-mentioned subtype of *C. parvum* in pigs. Although natural infections of *C. parvum* in pigs are rare, the results of genotyping showed epidemiological importance of pigs as a potential source of zoonotic subtypes of *C. parvum*.

Acknowledgments This work was supported by the grant of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 6007665806), the Grant Agency of the Czech Republic (project no. 523/07/P117), and research project of the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic (Z60220518).

References

- Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F (2003) Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol* 41:2744–2747
- Atwill ER, Sweitzer RA, Pereira MG, Gardner IA, Van Vuren D, Boyce WM (1997) Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *Appl Environ Microbiol* 63:3946–3949
- Bergeland ME (1977) Necrotic enteritis in nursing piglets. *Proc Am Assoc Vet Lab Diagn* 20:151–158
- Guselle NJ, Appelbee AJ, Olson ME (2003) Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet Parasitol* 113:7–18
- Izumiyama S, Furukawa I, Kuroki T, Yamai S, Sugiyama H, Yagita K, Endo T (2001) Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture. *Jpn Rev Soc Bras Med Trop* 54:23–26
- Jiang J, Alderisio KA, Xiao L (2005) Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl Environ Microbiol* 71:4446–4454
- Kennedy GA, Kreitner GL, Strafuss AC (1977) Cryptosporidiosis in three pigs. *J Am Vet Med Assoc* 170:348–350
- Langkjær RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hyttel C (2007) Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology* 134:339–350
- Maddox-Hyttel C, Langkjær RB, Enemark HL, Vigre H (2006) *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs—occurrence and management associated risk factors. *Vet Parasitol* 141:48–59
- Miláček P, Vítovec J (1985) Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol* 32:50



- Misic Z, Abe N (2007) Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitology* 134:351–358
- Moon HW, Bemrick WJ (1981) Fecal transmission of calf cryptosporidia between calves and pigs. *Vet Pathol* 18:248–255
- Morgan UM, Buddle R, Amson A, Elliot A, Thompson RCA (1999) Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs. *Aust Vet J* 77:44–47
- Plutzer J, Karanis P (2007) Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Vet Parasitol* 46:357–362
- Quilez J, Sánchez-Acedo C, Clave A, del Cacho E, López-Bernad F (1996) Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Vet Parasitol* 56:345–348
- Sak B, Kváč M, Hanzlíková D, Cama V (2008) First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 153:220–224
- Sanford SE (1987) Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1981–1985). *J Am Vet Med Assoc* 190:695–698
- Suárez-Luengas L, Clavel A, Quilez J, Goñi-Cepero MP, Torres E, Sánchez-Acedo C, del Cacho E (2007) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet Parasitol* 148:231–235
- Tacal J, Sobieh JV, El-Ahraf A (1987) *Cryptosporidium* in market pigs in southern California, USA. *Vet Rec* 120:615–617
- Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, Martin SW, Nydam DV, Jamieson F, Xiao L (2006) Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitol Res* 99:346–352
- Tzipori S, Smith M, Makin T, Halpin C (1982) Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from calf faeces. *Vet Parasitol* 11:121–126
- Vítovec J, Koudela B (1992) Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. *Vet Parasitol* 43:25–36
- Vítovec J, Hamadejová K, Landová L, Kváč M, Květoňová D, Sak B (2006) Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *J Vet Med B* 53:239–243
- Wieler LH, Iliciff A, Herbst W, Bauer C, Wieler E, Bauerfeind R, Failing K, Klos H, Wengert D, Bajer G, Zahner H (2001) Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *J Vet Med B* 48:151–159
- Xiao L, Herd RP, Bowman GL (1994) Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. *Vet Parasitol* 52:331–336
- Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, Cabrera L, Gilman RH, Lal AA (2001) Identification of 5 types of *Cryptosporidium* rasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis* 183:492–497
- Xiao L, Moore JE, Ukoh U, Gatei W, Lowery CJ, Murphy TM, Dooley JS, Millar BC, Rooney PJ, Rao JR (2006) Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. *Appl Environ Microbiol* 72:4461–4463
- Zintl A, Neville D, Maguire D, Fanning S, Mulcahy G, Smith HV, De Waal T (2007) Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. *Parasitology* 134:1575–1582