

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

KRYPTOSPORIDIOVÉ INFEKCE ZÁJMOVÝCH ZVÍŘAT

Cryptosporidial infections of pets

Autor práce: Michaela Maroušová

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

České Budějovice

duben 2012

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

Datum:

Podpis:.....

Michaela Maroušová

Poděkování:

Děkuji doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. nejen za cenné rady a náměty, ale také za odborné vedení a konzultace při zpracování bakalářské práce. V neposlední řadě velice děkuji svým přátelům a rodině za pomoc a podporu při vypracování bakalářské práce.

Michaela Maroušová

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá výskytem a prevalencí kryptosporidií ve vybraných zoo buticích a zájmovém chovu zvířat na území Českých Budějovic. V letech 2011 až 2012 bylo vyšetřeno celkem 104 vzorků trusu zájmových zvířat (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Cricetinae* ssp., *Cavia aperea porcellus*, *Oryctolagus cuniculus*). Vzorky byly vyšetřeny pomocí mikroskopických metod, pozitivní vzorky byly následně vyšetřeny molekulárně (PCR). Kryptosporidiové infekce byly pozorovány pouze u myši (*Mus musculus*) a potkanů (*Rattus norvegicus*). Byly detekovány dva druhy zoonotických kryptosporidií, *C. tyzzeri* a *C. muris*. Výsledky ukazují na to, že zvířata chovaná v zájmových chovech, jsou infikována kryptosporidii a představují tak riziko pro člověka

Klíčová slova: Kryptosporidie; kryptosporidióza; zájmová zvířata

Abstract

This thesis was focused on the incidence and prevalence of *Cryptosporidium* spp. in selected zoo boutiques and companion animals in České Budějovice. A total of 104 fecal samples of companion animals (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Cricetinae* ssp., *Cavia aperea porcellus*, *Oryctolagus cuniculus*) were examined during 2011 to 2012. Samples were investigated by microscopic methods; positive samples were investigated by PCR. *Cryptosporidium* infections were observed only in mice (*Mus musculus*) and rats (*Rattus norvegicus*). There were detected two species of zoonotic cryptosporidia, *C. tyzzeri* and *C. muris*. The results show that animals bred in hobby breeding are infected by cryptosporidia and they should represent health risk for human.

Key words: *Cryptosporidium* spp.; cryptosporidiosis; pets

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1	Zájmové zvíře.....	8
2.2	Rod <i>Cryptosporidium</i>	8
2.3	Taxonomie.....	8
2.4	Vývojový cyklus.....	10
2.5	Oocysty.....	11
2.6	Zdroje infekce.....	12
2.7	Kryptosporidióza.....	12
2.7.1	Klinické příznaky.....	12
2.8	Kryptosporidie hlodavců.....	13
2.8.1	Myš domácí (<i>Mus musculus</i>).....	13
2.8.2	Morče domácí (<i>Cavia aperea porcellus</i>).....	14
2.8.3	Křečci (<i>Cricetinae</i> ssp.).....	14
2.8.4	Potkan obecný (<i>Rattus norvegicus</i>).....	15
2.9	Kryptosporidie zajícovitých.....	16
2.9.1	Králík domácí (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).....	16
2.10	Kryptosporidie lidí – ve vztahu k hlodavčím kryptosporidiím.....	17
3	CÍL PRÁCE	18
4	MATERIÁL A METODIKA	19
4.1	Materiál.....	19
4.1.1	Zoo butik I.....	19
4.1.2	Zoo butik II.....	19
4.1.3	Zájmový chov myši domácích (<i>Mus musculus</i>).....	19
4.2	Metodika.....	20

4.2.1	Odběr trusu pro parazitologické vyšetření	20
4.2.2	Barvení oocyst kryptosporidií anilin - karbol methyl - violetí dle Miláčka a Vítovce (1985).....	20
4.2.3	Vyšetření vzorků	21
4.2.4	Genotypizace kryptosporidií	21
4.2.4.1	Izolace DNA	21
4.2.5	Polymerázová řetězová reakce - PCR.....	23
4.2.6	Gelová elektroforéza	24
4.2.7	Sekvenace vzorků.....	25
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	26
5.1	Výskyt a prevalence kryptosporidií.....	26
5.2	Molekulární charakterizace	27
6	ZÁVĚR.....	30
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	31

1 ÚVOD

Lidé začali domestikovat zvířata již před 12 000 lety, konkrétně psa (*Canis lupus*). Postupně člověk ochočoval více druhů zvířat, zpravidla ale jen ta, která měla nějaký hospodářský nebo náboženský význam. V 16. století můžeme najít první zmínky o šlechtění morčat a jejich dovážení do Evropy. V 19. století byl vyšlechtěn laboratorní potkan (*Rattus norvegicus var. alba*) z divoce žijícího potkana (*Rattus norvegicus*), používaný jako laboratorní zvíře. S každým dnem stále přibývá více druhů a vyšlechtěných poddruhů zvířat, které si člověk podmaňuje, ochočuje a chová jako takzvané domácí mazlíčky.

Domácí zvířata mohou trpět řadou infekčních i neinfekčních chorob, mezi široce rozšířené neinfekční choroby patří i parazitózy. U hlodavců, zejména volně žijících se velice často můžeme setkat s kryptosporidiemi.

Kryptosporidie poprvé popsal Ernest Edward Tyzzer v roce 1907, detekoval tyto parazity ve sliznici žaludku laboratorních myší a pojmenoval je *Cryptosporidium muris*. Roku 1912 popsal i další druh kryptosporidií v tenkém střevě taktéž u laboratorních myší a pojmenoval ho *Cryptosporidium parvum*. Velký zájem o studium těchto parazitických prvoků začal v roce 1993, kdy se při masivní infekci z vody nakazilo v USA více než 403 000 lidí.

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšířeni jednobuněční paraziti napadající především sliznice žaludku a střeva celé řady obratlovců a člověka. Infekci způsobenou těmito parazity nazýváme kryptosporidióza a z pohledu lidského zdraví představuje nebezpečí především pro oslabené a imunodeficitní jedince jako jsou například pacienti s AIDS, u kterých infekce probíhá velmi prudce a může vyústit i ve smrt jedince.

Některé druhy kryptosporidií infikují velké spektrum hostitelů, jiné jsou specifické pro konkrétní skupiny hostitelů, například pro hlodavce, přežvýkavce, ptáky a další. Patogenita závisí na jednotlivých druzích kryptosporidií a na hostiteli. Za referenční druh se považuje *Cryptosporidium parvum* z důvodu velkého geografického rozšíření, vysoké efektivity oocyst a jeho infekčnosti pro široké spektrum hostitelů.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Zájmové zvíře

„*Zvíře v zájmovém chovu: Zvíře, u kterého hospodářský efekt není hlavním účelem chovu, a to buď chované v prostorách k tomu určených, nebo v domácnosti, jehož chov slouží především zájmové činnosti člověka, nebo zvíře sloužící člověku jako jeho společník.*“ (Zákon č. 246/1992 Sb.).

2.2 Rod *Cryptosporidium*

Rod *Cryptosporidium* zahrnuje celosvětově rozšířené parazitické prvky parazitující na povrchu střevní nebo žaludeční sliznice poikilotermních i homoiotermních obratlovců (Volf a Horák 2007, Fayer a Xiao 2008). Jako první tento rod popsal Ernest Edward Tyzzer v roce 1907, našel parazita v žaludeční sliznici myši (*Mus musculus*), kterého pojmenoval *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). V roce 1912 popsal nový druh - *Cryptosporidium parvum* infikující střevní epitel hlodavců (Tyzzer 1912).

Kryptosporidie mají tkáňovou lokalizaci v zóně mikroklků epitelu gastrointestinálního traktu všech tříd obratlovců. Některé druhy infikují primárně žaludek, jiné druhy střeva. Méně často se kryptosporidie lokalizují i v dýchacím traktu. Některé druhy jsou patogenní, u jiných druhů se příznaky nákazy u hostitele nevyskytují (Volf a Horák 2007, Fayer a Xiao 2008, Plutzer a Karanis 2009, Fayer 2010).

2.3 Taxonomie

Dříve byly kryptosporidie řazeny ke kokcidiím, ale molekulárně fylogenetický výzkum ukazuje, že jsou blíže příbuzné gregarinám. V současné době existuje 29 uznaných druhů kryptosporidií (tabulka 1) a zhruba 60 doposud nepojmenovaných kryptosporidií známých pouze jako genotypy (Morgan a kol. 1999, Fayer a Xiao 2008).

Tabulka 1. Platné druhy kryptosporidií, jejich hostitel a lokalizace

Druh	Popsal	Hostitel	Lokalizace
<i>C. andersoni</i>	Lindsay a kol. 2000	skot	slez
<i>C. baileyi</i>	Current a kol. 1986	savci, drůbež	střevo, burza fabricii
<i>C. bovis</i>	Baker a Carbonell 1974	skot	tenké střevo
<i>C. canis</i>	Fayer a kol. 2001	psi	tenké střevo
<i>C. cichlidis</i>	(Paperna a Vilenkin 1996)	ryby	---
<i>C. cuniculus</i>	Inman a Takeuchi 1979	králíci	tenké střevo
<i>C. ducismarci</i>	Traversa 2010	želvy	---
<i>C. fayeri</i>	Ryan a kol. 2008	klokani	střevo
<i>C. felis</i>	Iseki 1979	kočky	tenké střevo
<i>C. fragile</i>	Jirků a kol. 2008	obojživelníci	žaludek
<i>C. galli</i>	Pavlásek 1999	ptáci	žláznatý žaludek
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan a kol. 2002	člověk	tenké a tlusté střevo
<i>C. macropodum</i>	Power a Ryan 2008	klokani	střevo
<i>C. meleagridis</i>	Slavin 1995	ptáci, savci	plíce, tenké střevo
<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero a Sitjá-Bobadilla 2002	ryby	žaludek, střevo
<i>C. muris</i>	Tyzzer 1907	hlodavci, myš	žláznatý žaludek
<i>C. nasoris</i>	Hoover a kol. 1981	ryby	tenké střevo
<i>C. parvum</i>	Tyzzer 1912	savci, myš	tenké střevo
<i>C. pestis</i>	Šlapeta 2006	savci	tenké střevo
<i>C. ryanae</i>	Fayer a kol. 2008	skot	střevo
<i>C. saurophilum</i>	Koudela a Modrý 1998	plazi	střevo
<i>C. scopthalmi</i>	Alvarez-Pellitero a kol. 2004	platýs	střevo
<i>C. serpentis</i>	Levine 1980	plazi	žaludek
<i>C. suis</i>	Ryan a kol. 2004	prase	střevo
<i>C. tyzzeri</i>	Levine 1961	myš	tenké střevo
<i>C. ubiquitousum</i>	Fayer a kol. 2010	skot	střevo
<i>C. varanii</i>	Pavlásek a kol. 1995	plazi	žaludek, střevo
<i>C. wrairi</i>	Vetterling a kol. 1971	morče	tenké střevo
<i>C. xiaoi</i>	Fayer a Santín 2009	ovce	střevo

Zdroj: Šlapeta (2012), upraveno autorem.

Tabulka 2. Taxonomické zařazení kryptosporidií

Klasifikace	Latinský název	Autor
Doména	Eucaryota	Whittaker a Margielis 1978
Říše	Chromalveolata	Adl a kol. 2005
Nadkmen	Alveolata	Cavalier-Smith 1991
Kmen	Apicomplexa	Levine 1970
Třída	Coccidea	Leuckart 1879
Řád	Eucoccidiorida	Leger a Duboscq 1910
Čeleď	Cryptosporidiidae	Leger 1911
Rod	<i>Cryptosporidium</i>	Tyzzer 1910

Zdroj: Fayer a Xiao (2008), upraveno autorem.

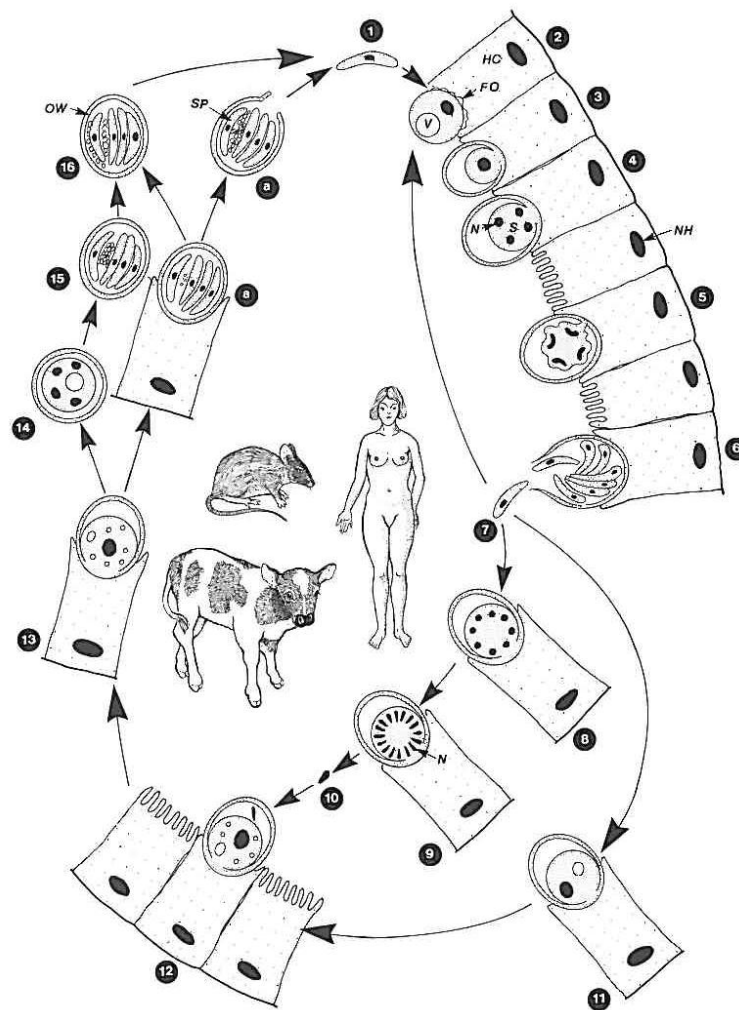
Všichni zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou intracelulární paraziti. Patří mezi eukaryotické prvoky, což znamená, že většina jejich DNA je uložena v jádře obklopeném dvojitou membránou. Rod *Cryptosporidium* je jedním z více než 300 rodů zahrnujících více než 4800 pojmenovaných druhů patřících do kmene Apicomplexa (tabulka 2). Všechny tyto druhy žijí parazitickým způsobem života, přičemž někteří jsou významnými parazity člověka a zvířat (Morgan a kol. 1999, Fayer a Xiao 2008, Plutzer a Karanis 2009).

2.4 Vývojový cyklus (obrázek 1)

Hostitel se infikuje exogenními vývojovými stádii-oocystami, fekálně-orální cestou. V oocystě sporogonií vznikají čtyři pohybliví sporozoiti. Vlivem trávicích tekutin obal oocysty praskne, uvolnění sporozoiti vyhledají povrch sliznice hostitele a usidlují se zde v zóně mikrokřků. Následuje první merogonie, která zahrnuje vytvoření parazitoformní vakuoly, ve které srůstá trofozoit s mikrovily hostitelské buňky. Kryptosporidie mají epicelulární lokalizaci. Nepohlavním dělením jádra se trofozoit mění na meront. Meront I typu se rozpadá na šest až osm merozoitů, kteří se uvolňují do prostředí, infikují okolní buňky a merogonii I typu opakují. Během druhé merogonie vznikají meronty II typu, ty se rozpadají na čtyři merozoity, které gametogonií vytvoří dva typy buněk - mikrogametocyty a makrogametocyty. Z mikrogametocytu vzniká 16 mikrogamet, které se uvolní do okolního prostředí a vyhledají makrogamety. Z makrogametocytu vzniká zpravidla jen jedna makrogameta. Výsledkem tohoto pohlavního rozmnožování je zygota, sporulující *in situ*. Vzniká oocysta se čtyřmi sporozoity. *Cryptosporidium parvum* má oocysty dvojího druhu, tenkostěnné zodpovědné za autoinfekce hostitele a silnostěnné, které se po smrti buňky uvolní do *lumen* střeva a jsou vylučovány s trusem ven z těla hostitele. Do prostředí se oocysta dostává jako plně infekční (Mehlhorn 2001, Fayer 2004, Volf a Horák 2007, Fayer a Xiao 2008, Hijjawi 2010).

Existují různá místa infekce (tabulka 1), např. pro *C. hominis*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. cuniculus* a *C. parvum* je místem primární infekce tenké střevo. *Cryptosporidium muris*, *C. andersoni*, *C. fragile*, *C. galli*, a *C. serpentis* jsou lokalizovány v žaludeční sliznici. *Cryptosporidium baileyi* infikuje bronchiální strom a kloaku (Fleta a kol. 1995, Carey a kol. 2004, Fayer a Xiao 2008).

Obrázek 1. Vývojový cyklus kryptosporidií (Mehlhorn 2001)



2.5 Oocysty

Exogenním vývojovým stádiem kryptosporidií jsou oocysty, které patří k nejmenším oocystám. Mají velikost 5-7 μm v závislosti na druhu kryptosporidie. V oocystě jsou čtyři sporozoiti, neutvářející sporocystu. Oocysty jsou z gastrointestinálního traktu vylučovány výkaly, ty z dýchacích cest opouští hostitele dýchacími cestami a nosními sekrety. (Volf a Horák 2007, Fayer a Xiao 2008).

Stěna oocysty je trilamelární konstrukce. Vnější vrstva má nepravidelnou tloušťku a je tvořena glykoproteinem. Druhá, střední vrstva je tvořena glykolipidy a lipoproteiny a určuje strukturu oocysty. Třetí, vnitřní vrstva, která se jeví jako lineární a filamentózní poskytuje oocystě pevnost a pružnost. Stěna oocysty je kontinuální s výjimkou jednoho pólu, kde je přerušena švem, který se táhne po celém

obvodu oocysty. Tenkostěnné oocysty se liší od silnostěnných v tom, že nemají silnou multizonální vnitřní vrstvu (Kang a kol. 2006, Fayer a Xiao 2008).

2.6 Zdroje infekce

Kryptosporidie jsou přenášeny fekálně - orální cestou pomocí oocyst. Infekce kryptosporidii u lidí může být přenesena z člověka na člověka, nebo ze zvířete na člověka při ošetřování hospodářských a domácích zvířat. Infekce může být přenášena i požitím infikované vody a čerstvé zeleniny. Kryptosporidie se často vyskytují v povrchové vodě. Oocysty zůstávají infekční ve vlhkém, chladném prostředí až několik měsíců, zejména tam, kde je teplota vody těsně nad bodem mrazu (Fayer 2004). Bez důkladné filtrace mohou kryptosporidie infikovat pitnou vodu. V USA, Velké Británii a Japonsku je nákaza kryptosporidii nejčastější příčinou epidemií z pitné a rekreační vody (Bajer a kol. 2008, Fayer a Xiao 2008, Smith a Nichols 2010).

2.7 Kryptosporidióza

Kryptosporidie způsobují onemocnění zvané kryptosporidióza. Závažnost, délka trvání a projev infekce patogenními druhy závisí na imunitním stavu jedince a má četné klinické příznaky (Xiao a kol. 2004, Jex a kol. 2008).

2.7.1 Klinické příznaky

U většiny jedinců infikovaných kryptosporidii jsou klinické příznaky asymptomatické. U imunologicky zdravých jedinců se kryptosporidióza projevuje mírným, středním, nebo těžkým akutním průběhem nemoci. Objemnými, vodnatými průjmy, které jen vzácně mohou obsahovat krev a leukocyty. Dále je onemocnění doprovázeno křečemi břicha, nechutenstvím, nevolností, ztrátou hmotnosti, horečkou a únavou. Průměrné trvání nemoci je 12 dní, v rozmezí 2 až 26 dní (Jokipii a Jokipii 1986).

U imunokomprimovaných jedinců (podvyživení jedinci, jedinci s virovými infekcemi - HIV, spalničky, apod.) trvání a závažnost onemocnění závisí na rozsahu poškození buněčné imunity. Onemocnění mívá závažný chronický průběh, který může končit letálně (Fayer 2004, Fayer a Xiao 2008, Beneš 2009).

2.8 Kryptosporidie hlodavců

2.8.1 Myš domácí (*Mus musculus*)

Myši začaly být chovány již v roce 1 200 př. n. l. v Asii, v dobách Alexandra Velikého se jejich chov výrazně rozšířil. V Číně a Japonsku došlo k vyšlechtění bílých i barevných variant tohoto drobného hlodavce. V roce 1664 začaly být myši používány k pokusům. K prvním průkopníkům v chovu laboratorních myší patřila Abbie Lathropová, která otevřela obchod s drobnými hlodavci kolem roku 1900. Brzy jí následovalo mnoho dalších vědců a chov laboratorních myší se rozšířil i do domácností (Harper 2008, Vejlupková 2011).

Tito drobní hlodavci jsou na infekce kryptosporidii velice vnímaví. Nejčastěji u nich můžeme detekovat *C. muris*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. meleagridis* a *C. tyzzeri* (Iseki a kol. 1989, Bajer a kol. 2004, Fayer 2004). Nejčastěji lze kryptosporidie u těchto hlodavců detekovat v tenkém střevě (Tyzzer 1912, Levine 1961). Özkul a Aydin (1994) detekovali kryptosporidie v žaludeční sliznici těchto zvířat.

Nejčastější kryptosporidiální infekcí u myší je *C. muris*, lokalizovaná v žaludeční sliznici. Tito drobní hlodavci se mohou infikovat *per os* od jedinců stejného druhu, nebo od ostatních zvířat, ze zájmových hlodavců zejména od potkanů a morčat. Myši infikované *C. muris* nevykazují žádné klinické příznaky (Angus a kol. 1985, Aydin a Özgul 1996). Druhou nejčastější kryptosporidií infikující myši je *C. parvum*, která se lokalizuje ve střevě. Bajer a kolektiv (2004) tyto parazity detekovali u tří měsíčních jedinců. Prevalence výskytu *C. parvum* u divokých myší je 22 % (Chalmers a kol. 1997). K nákaze dalšími druhy kryptosporidií jsou zdravé, dospělé myši jen málo vnímavé. Imunodeficitní jedinci podléhají infekci *C. andersoni* a *C. meleagridis* (Sréter a kol. 2000, Matsubayashi a kol. 2005). Často se mohou myši nakazit kryptosporidii morčat, mezi které patří např. *C. parvum*. Tyto kryptosporidie představují zdroj infekce především pro kojící samice a sající mláďata, u těchto infikovaných jedinců je průběh infekce asymptomatický (Tilley a kol. 1991, Iseki a kol. 1989). U dospělých myší (*Mus musculus*) nebyla nákaza kryptosporidii morčat prokázána (Angus a kol. 1985, Chrisp a kol. 1992). Celková prevalence výskytu kryptosporidií u divokých myší v roce 2010 ve Spojených státech

amerických, Velké Británii, Austrálii a na Novém Zélandu byla 18,7 %, což ukazuje na to, že myši mohou být významným zdrojem infekce pro hospodářská i domácí zvířata a člověka (Fayer 2004, Feng 2010).

2.8.2 Morče domácí (*Cavia aperea porcellus*)

První zmínky o domestikaci morčat sahají do doby 5 000 až 900 let př. n. l., kdy Inkové v Peru chytali a chovali tato zvířata pro obživu. V roce 1540 byla morčata přivezena Španěly na Evropský kontinent. V 19. století britští přistěhovalci převezli morčata z Evropy do Ameriky, kde se tato zvířata začala šlechtit, vzniklo mnoho plemen, která jsou dnes chována pro obživu, jako výstavní zvířata, nebo pro zábavu jako domácí mazlíčci (Bartash-Dawley 2006).

Morčata se mohou infikovat *C. wairi*, *C. muris* a *C. parvum* (Angus a kol. 1985, Iseki a kol. 1989, Tilley a kol. 1991).

Nejčastěji se morčata infikují *C. wairi*, lokalizujícího se v tenkém střevě (Vetterling a kol. 1971). Více vnímaví k nákaze jsou juvenilní jedinci do šestnácti týdnů věku, ti mohou pozitivní oocysty vylučovat až dva týdny. Oproti nim jsou dospělí, zdraví jedinci k infekci jen málo vnímaví (Angus a kol. 1985, Iseki a kol. 1989). Od ostatních druhů zvířat např. myši se morčata mohou infikovat *C. muris* (Aydin a Özgül 1996), nebo antigenně příbuzným druhem *C. wairii* - *C. parvum* (Iseki a kol. 1989, Tilley a kol. 1991, Chrisp a kol. 1992, Fayer 2010) avšak na infekci oběma těmito druhy jsou morčata jen málo náchylná (Iseki a kol. 1989). Kromě běžných klinických příznaků kryptosporidie se u morčat mohou objevovat deprese, anorexie a vodnaté průjmy, končící letálně v důsledku dehydratace organismu zvířete (Angus a kol. 1985).

2.8.3 Křečci (*Cricetinae* ssp.)

První zmínky o křečcích se objevily již v roce 1797, nicméně původ domácích křečků, tak jak je známe dnes, se datuje až od roku 1930, kdy byl v Sýrii chycen první pár divokých křečků pro vědecké účely laboratoře ve Švýcarsku. Během druhé světové války se křečci chovaní jako laboratorní zvířata dostali do Ameriky, ale stále byla všechna zvířata potomky prvního páru dovezeného ze Sýrie

v roce 1930. Až v roce 1971 byli dovezeni ze Sýrie další divocí křečci, kteří byli kříženi a začali být chováni jako domácí mazlíčci (Bartash-Dawley 2006, McGrath 2008).

Křečci se mohou infikovat *C. muris* lokalizovaným v žaludku (Feng 2010). K nákaze jsou vnímaví juvenilní i adolescentní jedinci bez ohledu na věk a pohlaví (Morgan a kol. 2000). Pavlásek a Lávička (1995) detekovali tyto kryptosporidie u jedenácti měsíčních a tří měsíčních křečků. Dalším druhem kryptosporidií infikujícím křečky je *C. parvum*, která se, jak již bylo zmíněno, lokalizuje ve střevech (Elangbam a kol. 1993). Rasmussen a Healey (1992) vyšetřovali osmi až dvanácti týdenní a dvaceti až dvaceti-čtyř týdenní jedince a porovnávali náchylnost k nákaze u těchto skupin. Z jejich výsledků vyplívá, že juvenilní jedinci jsou náchylnější k infekci *C. parvum* oproti adolescentním jedincům. Kryptosporidíóza u těchto drobných hlodavců způsobuje mimo běžných klinických příznaků také přetížení plic, sleziny, jater, akutní katarální záněty, třes, ospalost, zhoršenou kvalitu srsti a u samců také parézu pánevních končetin (Pavlásek a Lávička 1995).

2.8.4 Potkan obecný (*Rattus norvegicus*)

Potkan, zvíře žijící původně v Asii se dostal do Evropy přes Norský poloostrov a do Ameriky lodní dopravou v polovině 18. století. Díky své agresivitě a adaptabilitě v novém prostředí vytlačil zdomácnělou krysou obecnou (*Rattus rattus*) a stal se obávaným škůdcem. Lidé začali cvičit psy, kteří uměli tyto hlodavce chytit a usmrtit. Tyto zápasy se staly sportem a potkani byli chytáni z volné přírody po stovkách jedinců. Lidé, kteří se zabývali odchytem divokých potkanů, jejich prodejem a chovem na zápasy, se nazývali krysaři. Ti v první polovině 19. století chytli první hnědé potkany, jejichž křížením vznikly různě barevné varianty, které krysaři prodávali do laboratoří k vědeckým účelům. Na začátku 20. století byly pořádány první výstavy milovníků potkanů jako domácích mazlíčků (Castle 1947, Webster a Macdonald 1995, Lange a Linke-Grün 2006).

U potkanů byla detekována nákaza *C. muris* a *C. parvum* (Iseki a kol. 1989, Aydin a Özgül 1996, Fayer 2004). Které se, jak uvádí tabulka 2, lokalizují v žaludku a střevech.

Cryptosporidium muris je celosvětově rozšířeným parazitem a potkani ať už domácí, nebo divocí jsou na infekci tímto prvokem velice náchylní. Potkani se *C. muris* mohou infikovat *per os* z životního prostředí, zejména z vody, nebo od ostatních druhů zvířat. Ze zájmových hlodavců, především od myší. Tento parazit lokalizovaný v žaludku, infikuje hlodavce nezávisle na věku a pohlaví (Torres a kol. 2000). Prevalence výskytu *C. muris* u divoce žijících potkanů je 20,3 % a infikovaní jedinci vylučují infekční oocysty v trusu již za deset až sedmnáct dní po nakažení (Aydin a Özgül 1996). Podobně jako *C. muris* je velmi často u potkanů prokázán výskyt *C. parvum*. Ve Velké Británii se z vody a od ostatních zvířat kontaminuje až 40 % juvenilních a 12 % dospělých jedinců, což svědčí o větší náchylnosti mladých jedinců oproti starým. Stejně tak samci jsou náchylnější než samice (Quy a kol. 1999). Prevalence *C. parvum* u potkanů je 22,7 % (Abd el-Wahed a kol. 1999). Divocí potkani slouží jako vektorů nemocí pro lidi, hospodářská i domácí zvířata (Webster a Macdonald 1995, Webster 1996). V České Republice je extenze kryptosporidií do 5 % (Jelínek a kol. 1993), v Japonsku a Spojeném království do 21,9 % infikovaných jedinců (Feng 2010). Jedinci trpící kryptosporidiózou mohou mimo běžných klinických příznaků vykazovat ještě nechutenství, hubnutí, celkovou skleslost, apatii a různě akutní enteritidy (Jelínek a kol. 1993). Ve většině případů však kryptosporidióza u potkanů probíhá asymptomaticky (Aydin a Özgül 1996).

2.9 Kryptosporidie zajícovitých

2.9.1 Králík domácí (*Oryctolagus cuniculus*)

Proces domestikace králíků se datuje do doby 2 500 až 1 800 let př. n. l., kdy Iberové chytali tyto hlodavce za účelem obživy a zavírali je do oplocených podzemních děr. V Evropě Římané chovali králíky stejným způsobem až v prvním století našeho letopočtu. Do střední Evropy se chov divokých plemen dostal z Francie ve 12. století. Až v 19. století se objevují první zmínky o chovu králíků v králíkárnách a šlechtění těchto zvířat. Jako domácí mazlíčci jsou dnes běžně chovaná plemena užitkových králíků a jejich vyšlechtěné zakrslé varianty (Barát 1986).

Nejčastější kryptosporidiální infekcí u králíků domácích jsou *C. cuniculus*, *C. parvum* a *C. muris* (Iseki a kol. 1989, Aydin a Özgül 1996). *Cryptosporidium*

cuniculus a *C. parvum* se lokalizují ve střevech (tabulka 2), *C. muris*, jak již bylo zmíněno, se lokalizuje v žaludku savců.

Cryptosporidium cuniculus je parazit úzce příbuzný *C. hominis*. Jeho přirozenými hostiteli jsou králíci a lidé (Robinson a kol. 2010). Podnětem ke sledování prevalence kryptosporidií králíků bylo zejména přemnožení těchto hlodavců ve venkovských i městských pásmech na území Austrálie a vysoké procento infikovaných lidí na tomto kontinentu (Nolan a kol. 2010). Méně náchylní jsou králíci na nákazu *C. muris* a *C. parvum*, kterými se mohou nakazit zejména od myši. Prevalence výskytu kryptosporidií u divokých králíků je 10 % (Feng 2010). Onemocnění kryptosporidii se u těchto hlodavců projevuje běžnými klinickými příznaky, nebo zcela asymptomatically (Aydin a Özgul 1996).

2.10 Kryptosporidie lidí - ve vztahu k hlodavčím kryptosporidiím

Divoce žijící hlodavci jsou velmi často zdrojem infekce vody a mohou také působit jako zdroj nákazy hospodářských i domácích zvířat (Webster a Macdonald 1995, Webster 1996).

Lidé se mohou infikovat kryptosporidii ve věku od 3 do 95 let. Malé děti a osoby s imunitními nedostatky jsou k infekci náchylnější. Zpráva o rozšíření nákazy u člověka se poprvé objevila v roce 1982 a týkala se mužů v USA s šířící se nákazou syndromu získaného selhání imunity (AIDS) (Goldfarb a kol. 1982). Do roku 1986 Americké centrum pro kontrolu nemocí (CDC) uvádí, že 3,6 % AIDS pacientů měla kryptosporidiózu a jejich úmrtnost byla 61 %.

Kryptosporidie infikující lidi: *C. andersoni*, *C. bayleyi*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. ryanae*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum*, *C. wrairi*, *Cryptosporidium* pig genotype II, money genotype, horse genotype, skunk genotype, chipmunk I genotype. Člověk je hlavním hostitelem *C. hominis*. Pro imunokompresivní jedince je vysoce infekční *C. parvum*, které je i zdrojem infekce lidí v České republice (Fayer 2004, Hajdušek a kol. 2004, Kváč a kol. 2009).

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je:

- Vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidiových infekcí u zájmových zvířat pocházejících z různých zdrojů a prodávaných v zoo buticích.
- V případě pozitivního nálezu oocyst a spor pomocí molekulárních metod určit druh, genotyp sledovaných parazitů na základě sekvencí genů pro SSU a GP60.
- Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů parazitů

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Zoo butik I

Hlodavci v tomto butiku jsou chováni v dřevěných teráriích se skleněnou přední stěnou, o rozměrech zhruba 50×30×30 cm (d×š×v). Jsou rozděleni podle druhu a někteří jedinci i dle pohlaví. Chovná místnost je oddělena skleněnou stěnou od prodejních prostor butiku. Místnost pro zvířata není klimatizovaná, je bez oken. Terária jsou hlodavcům čištěna jednou denně. Pilinová podestýlka je vymetena z klece a nahrazena novou. Voda v keramických miskách je nabízena *ad libitum*. Komerčně vyráběná suchá zrnitá krmná směs pro hlodavce, je podávána jednou denně a měla by vystačit na pokrytí celodenní potřeby.

4.1.2 Zoo butik II

Hlodavci v tomto butiku jsou chováni ve skleněných a dřevěných teráriích, nebo v chovných nádobách s plastovým dnem. Zvířata jsou rozdělena podle druhu a pohlaví. Chovná místnost je stavebně oddělena od prodejních prostor butiku. Místnost je bez oken a klimatizace. Terária hlodavců jsou čištěna jednou denně. Pilinová podestýlka je vymetena a nahrazena novou. Voda v keramických miskách je nabízena *ad libitum*. Potrava – komerčně vyráběná suchá krmná směs pro hlodavce, je podávána jednou denně a měla by vystačit na pokrytí celodenní krmnou dávku.

4.1.3 Zájmový chov myši domácích (*Mus musculus*)

Chovná skupina byla založena v roce 2010 dospělou samicí pocházející z nejmenovaného zoo butiku v Českých Budějovicích. Tato samice byla křížena se samcem pocházejícím od stejného dodavatele. Od F1 generace byla skupina ponechána k samovolnému páření.

Myši byly chovány v teráriu o velikosti 80×40×40 cm (d×š×v). Maximální kapacita chovné nádoby byla 30 ks. Po naplnění kapacity chovného zařízení byly nejstarší a neonatální jedinci vyloučeni z chovu. Jako podestýlka byly požívány dřevěné hobliny. Podestýlka byla měněna podle potřeby. Krmení dvakrát denně-

komerční krmnou směsí pro hlodavce, směsí obilovin, vitamínů, sušeného ovoce a psích granulí. Krmná dávka byla obohacována o čerstvou zeleninu a ovoce. Tvrdý chléb k broušení hlodáků byl nabízen *ad libitum*. Pitná voda z kuličkových napáječek byla zvířatům k dispozici *ad libitum*. Na konci pokusu byla všechna zvířata usmrcena manipulací šíje.

4.2 Metodika

4.2.1 Odběr trusu pro parazitologické vyšetření

Vzorky byly odebírány v časovém intervalu od března 2011 do února 2012. Čerstvý vzorek trusu byl odebrán do 1,5 ml zkumavek typu eppendorf a část trusu byla ihned natřena pomocí dřevěné špejle na podložní sklo. Sklo i zkumavka byly označeny číslem vzorku. Do vyšetření byly vzorky fixovány 5% dichromanem a uchovávány v lednici při 4 °C.

Celkem bylo odebráno 104 vzorků. Z toho bylo 44 vzorků od myší domácích (*Mus musculus*), 23 vzorků od potkanů obecných (*Rattus norvegicus*), 18 vzorků od křečků (*Crycetinae* ssp.), 12 vzorků od morčat domácích (*Cavia aperea porcellus*) a 7 vzorků od zakrslých králíků (*Oryctolagus cuniculus*).

4.2.2 Barvení oocyst kryptosporidií anilin - karbol methyl - violetí dle Miláčka a Vítovce (1985)

Pracovní postup:

1. Vzorky byly fixovány methanolem v plameni.
2. Obarveny anilin-karbo-methyl-violetí, po dobu 30 minut.
3. Opláchnuty pod tekoucí vodou.
4. Diferenciovány 2% kyselinou sírovou, po dobu 2 minut.
5. Opláchnuty pod tekoucí vodou.
6. Dobarveny tartrazinem, po dobu 2 minut.
7. Opláchnuty pod tekoucí vodou.
8. Vzorky se nechaly uschnout.

Zásobní roztoky byly namíchány podle metodiky (tabulka 3).

Tabulka 3. Zásobní roztoky pro barvení oocyst kryptosporidií anilin-karbol-methylvioletí dle Miláčka a Vítovce (1985)

Zásobní roztoky	Chemikálie
Roztok anilin-karbol-methyl-violet	0,6 g methyl violeti 1 ml anilinu 1 g fenolu 30 ml 96 % alkoholu 70 ml deionizované vody
Roztok tartrazinu	1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové
Kyselina sírová	2% kyselina sírová

4.2.3 Vyšetření vzorků

Oocysty se barví modrofialově na žlutém pozadí. Všechny preparáty byly vyšetřeny světelným mikroskopem (Nikon YS 100) při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Vždy byl prohlédnut celý preparát.

4.2.4 Genotypizace kryptosporidií

Na základě mikroskopického vyšetření byly genotypizovány vzorky s pozitivním nálezem oocyst kryptosporidií.

4.2.4.1 Izolace DNA

Celková DNA byla extrahována přímo z trusu pomocí komerčního kitu - PSP Spin Stool DNA Kit (Invitek). Získaná DNA byla uchována při teplotě -20 °C.

Pracovní postup (dle návodu, který je součástí kitu):

1. Materiál byl dán do Safe-Lock-Tube, přidány skleněné a zirkonové kuličky a 0,8-1,2 ml Lysis Buffer P a obsah zkumavek byl rozbíjen 1 min. při rychlosti 5,5 m/s užitím Fast-Prep24.
2. Získaný materiál byl inkubován 10 min./95 °C v termobloku.
3. Centrifugován 1 min./16000 g.
4. Veškerý supernatant přenesen do InviAdsorb-Tube, 15 s vortexován, 1 min. inkubován při laboratorní teplotě, centrifugován 3 min./16000 g.
5. Supernatant přepipetován do čistých zkumavek, centrifugován 3 min./16000 g.

6. Do čistých 1,5 ml mikrozkušavek napipetováno 25 µl Proteinase K, přidáno 400 µl supernatantu, vortexováno.
7. Materiál byl inkubován 10 min./70 °C.
8. Připipetováno 400 µl Binding Buffer P, vortexován.
9. Přepipetován veškerý objem do Spin Filter+Tube, inkubován 1 min. při laboratorní teplotě, centrifugován 1 min./16000 g.
10. Vylití odpadu z eppendorf zkumavek, napipetováno 500 µl Wash I, centrifugováno 1 min./16000 g.
11. Vylití odpadu z eppendorf zkumavek, napipetováno 800 µl Wash II, centrifugováno 1 min./16000 g.
12. Vylití odpadu z eppendorf zkumavek, centrifugováno 3 min./16000 g.
13. Kolona dána na čistou eppendorf zkumavku, napipetováno 200 µl předehřátého Elution Buffer D, inkubováno 3 min. při laboratorní teplotě, centrifugováno 1 min./8000 g.

Materiál: 180-200 mg čerstvého nebo mraženého trusu.

Příprava Proteinase K lyofilizátu:

Pracovní postup:

1. Proteinase K lyofilizát rozpuštěn přidáním 1,5 ml deionizované PCR vody.
2. Skladován při -20 °C.

Příprava Elution Buffer D:

Pracovní postup:

1. Elution Buffer D byl vytemperován na 70 °C.

4.2.5 Polymerázová řetězová reakce - PCR

Chemikálie použité pro analýzu PCR jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4. Chemikálie použité pro PCR

Chemikálie	Zkratka
Deoxyribonukleosid trifosfát	dNTP's; 1,25 mM roztok
kompletní pufr pro Taq purple DNA polymerázu	1 U/ μ l; 10 \times koncentrovaný
Deionizovaná voda	PCR H ₂ O
MgCl ₂	25 mM
Bovinní sérový albumin	BSA; 10 mg/ml

Pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) byl použit nested PCR protokol. Jednotlivé reakční směsi polymerázové reakce měly objem 20 μ l (tabulka 5). Pro primární i sekundární PCR byl použit stejný amplifikační program (tabulka 6).

Primery (10 μ l):

Primární primery: F 5'-TCTAGAGCTAATACATGCG-3'

R 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'

Sekundární primery: F 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

R 5'-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3'

Tabulka 5. Protokol-reakční směs PCR pro amplifikaci části genu kódujícího část malé ribozomální podjednotky

chemikálie	PRIMÁRNÍ REAKCE		SEKUNDÁRNÍ REAKCE	
	koncentrace	objem [μ l]	koncentrace	objem [μ l]
H ₂ O	-	12,3	-	13,1
MgCl ₂	(25 mM)	1,2	(25 mM)	1,2
10xbuffer	-	2,0	-	2,0
dNTP	10 mM	0,4	10 mM	0,4
forward	10 μ M	0,4	10 μ M	0,4
reverse	10 μ M	0,4	10 μ M	0,4
BSA	(10 mg/ml)	0,8	-	0,0
taq	(1U/1 μ l)	0,5	(1U/1 μ l)	0,5
DNA	-	2,0	-	2,0
celkem	-	20,0	-	20,0

Tabulka 6. Amplifikační program pro amplifikaci části genu kódujícího část malé ribozomální podjednotky

Počet cyklů	Fáze PCR	Teplota	Čas (s)
35	Počáteční denaturace	94 °C	180
	Denaturace	94 °C	45
	Nasedání primerů	55 °C	45
	Dosyntetizování nového řetězce	72 °C	60
	Finální extenze	72 °C	420

4.2.6 Gelová elektroforéza

Velikost PCR fragmentů byla ověřována gelovou elektroforézou. Chemikálie použité pro gelovou elektroforézu jsou uvedeny v tabulce 7. Výsledný PCR produkt byl detekován na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (302 nm).

Tabulka 7. Chemikálie použité pro gelovou elektroforézu

Chemikálie	Složení
50× TAE pufr	242 g TRIS báze
	47,1 ml ledová kyselina octová
	100 ml 0,5 MEDTA pH 8,00
Agaróza	---
Ethidium-bromid	---
100 bp DNA Ladder	---

Pracovní postup:

1. Smíchána agaróza s 1× TAE puftrem do výsledné koncentrace 1%, rozpuštěno v mikrovlnné troubě, zchlazeno pod tekoucí vodou na teplotu 50 °C.
2. Přidán ethidium-bromid, výsledná koncentrace 0,5 mg/1ml.
3. Nalítí gelu, vložení hřebenu, nechaní ztuhnout.
4. Gel vložen do elektroforetického tanku naplněného 1× TAE puftrem, do jamek nanášeno 10 µl PCR sekundárního produktu, přidáno 2× 5 µl ladderu.
5. Nastavení napětí na 70 V, vyvíjení na dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA (minimálně 30 min.).
6. Použití UV transiluminátor pro vizualizaci DNA fragmentů.

4.2.7 Sekvence vzorků

K přípravě na sekvenaci vzorků byl použit kit BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. Reakční směs byla namíchána pro každý primer (tabulka 8). V tabulce 9 je uveden amplifikační program. Vzorky byly sekvenovány z obou stran za použití primerů pro sekundární PCR.

Tabulka 8. Reakční směsi pro sekvenční reakci a jejich složení

Chemikálie	Množství (μl)
PET	2
Primer	1
PCR produkt	5
PCR H ₂ O	8

Tabulka 9. Amplifikační program pro termocycler

Počet cyklů	Fáze PCR	Teplota	Čas (s)
35	Denaturace	94 °C	10
	Nasedání primerů	50 °C	5
	Dosyntetizování	60 °C	240

Pracovní postup:

1. Přidat 1 ml glykogenu k produktu PCR, pro zviditelnění peletu.
2. Napipetovat 5 ml 0,1 M EDTA, přidat 60 ml 96% etanolu.
3. Protřepat vzorek, inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě.
4. Centrifugovat 30 min. / 4 °C (21910 g).
5. Odsát supernatant, vysráženou DNA vysušit při laboratorní teplotě/ 30 min.
6. Odeslat k sekvenování do komerční laboratoře Macrogen, Soul, Jižní Korea.

Získané sekvence byly upraveny pomocí ChromasPro (Technelysium, verze 1.5) a získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank pomocí programu Clustal X (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>, verze 2.0.12) a BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>, verze 7.0.5.3).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výskyt a prevalence kryptosporidií

V období od března 2011 do února 2012 bylo vyšetřeno celkem 104 vzorků trusu hlodavců pocházejících ze zoo butiků v Českých Budějovicích a ze zájmového chovu myší (*Mus musculus*) (tabulka 10). Konkrétně bylo odebráno 44 vzorků od myší domácích (*Mus musculus*), 28 vzorků od potkanů domácích (*Rattus norvegicus*), 18 vzorků od křečků (*Cricetinae* ssp.), 12 vzorků od morčat domácích (*Cavia aperea porcellus*) a 7 vzorků od králíků domácích (*Oryctolagus cuniculus*).

Tabulka 10. Celkový počet a druhové zastoupení zájmových zvířat ve vyšetřovaných chovech

Chov	Druh	Počet vyšetřených
ZOOBUTIK I	<i>Cavia aperea porcellus</i>	8
	<i>Mus musculus</i>	8
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	5
	<i>Cricetinae</i> ssp.	10
	<i>Rattus norvegicus</i>	10
	Celkem	45
ZOOBUTIK II	<i>Cavia aperea porcellus</i>	4
	<i>Mus musculus</i>	5
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	2
	<i>Cricetinae</i> ssp.	8
	<i>Rattus norvegicus</i>	13
	Celkem	28
ZÁJMOVÝ CHOV	<i>Mus musculus</i>	31
	Celkem	31

Všechny vzorky byly vyšetřeny mikroskopicky na přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu. Toto vyšetření prokázalo celkem 18 pozitivních vzorků, a to 15 vzorků u *Mus musculus* a 3 vzorky u *Rattus norvegicus*. Tabulka 11 uvádí prevalenci výskytu kryptosporidií v jednotlivých chovech.

Nejvyšší počet infikovaných jedinců byl zaznamenán v zájmovém chovu myší domácích (*Mus musculus*), kde byla prevalence výskytu 18,7 %, což odpovídá rozpětí 2,3 % až 32,8 %, které uvádí Fengová (2010), která zjišťovala prevalenci volně žijících myší (*Mus musculus*). Nižší výskyt kryptosporidiózy je v chovech díky tomu, že zvířata v domácnostech nemají možnost nakazit se od volně žijících

hlodavců, ale mohou se nakazit jen od ostatních infikovaných zvířat v chovu, jak popisují i Iseki a kolektiv (1989).

Tabulka 11. Prevalence výskytu kryptosporidií v jednotlivých chovech

Chov	Druh	Počet pozitivních	Počet negativních	Prevalence (%)
ZOO BUTIK I	<i>Cavia aperea porcellus</i>	0	8	0
	<i>Mus musculus</i>	2	6	0,2
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	0	5	0
	<i>Cricetinae</i> ssp.	0	10	0
	<i>Rattus norvegicus</i>	2	8	0,2
	Celkem	4	37	1,6
ZOO BUTIK II	<i>Cavia aperea porcellus</i>	0	4	0
	<i>Mus musculus</i>	0	5	0
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	0	2	0
	<i>Cricetinae</i> ssp.	0	8	0
	<i>Rattus norvegicus</i>	1	12	0,1
	Celkem	1	31	0,3
ZÁJMOVÝ CHOV	<i>Mus musculus</i>	13	18	4,0
	Celkem	13	18	4,0

5.2 Molekulární charakterizace

Vzorky s pozitivním nálezem oocyst mikroskopickým vyšetřením byly dále vyšetřovány molekulární analýzou genů PCR. Nested PCR genu kódujícího malou ribozomální podjednotku kryptosporidií bylo získáno 5 sekvencí. Rozbor sekvencí prokázal ve třech případech *C. tyzzeri* a ve dvou případech *C. muris* RN66. Všechny tyto pozitivní vzorky pocházely ze zájmového chovu myší (*Mus musculus*). U zbývajících pozitivních vzorků se nepodařilo získat čisté sekvence a určit druh kryptosporidií. Toto lze vysvětlit tím, že ve vzorku bylo přítomno více druhů a genotypů kryptosporidií (Tanriverdi a kol 2003).

Intenzita infekce se v případě *C. muris* pohybovala od 8500 do 15000 OPG a v případě *C. tyzzeri* od 18000 do 25000 OPG (tabulka 12).

Výskyt *C. muris* (kmen RN66) je zcela běžným druhem kryptosporidie infikující *Mus musculus* (Aydin a Özgül 1996, Morgan a kol. 2000, Feng 2010). U divoce žijících myší pozoroval *C. muris* Chalmers a kolektiv (1997). I přes to, že byly myši infikovány, nevykazovaly žádné vnější klinické příznaky, což se shoduje s dříve publikovanými výsledky (Miller a Schaefer 2007, Hůrková a Modrý 2003).

Dalším námi detekovaným druhem kryptosporidie bylo *C. tyzzeri*. Tento druh kryptosporidie běžně infikuje myši domácí (*Mus musculus*) (Xiao a kol. 2012, Ren a kol. 2012).

Tabulka 12. Zjištěné druhy kryptosporidií a intenzita infekce

Označení jedince	Druh	<i>Cryptosporidium</i>	OPG
8162	<i>Mus musculus</i>	<i>C. tyzzeri</i>	20000
8164	<i>Mus musculus</i>	<i>C. tyzzeri</i>	25000
8172	<i>Mus musculus</i>	<i>C. tyzzeri</i>	18000
8970	<i>Mus musculus</i>	<i>C. muris</i> RN66	15000
8971	<i>Mus musculus</i>	<i>C. muris</i> RN66	8500

U každého vyšetřovaného zvířete bylo zjištěno pohlaví. Z pěti hlodavců nakažených kryptosporidiiemi byli 4 samci a 1 samice. Rozdílnost pohlaví prokázala vliv na vnímavost pohlaví k infekcím (tabulka 13), bez rozdílu na druhu kryptosporidií, které hlodavce infikovaly. Quy a kolektiv (1999) uvádějí, že při infekci *C. parvum* jsou náchylnější k nákaze samci oproti samicím.

Tabulka 13. Pohlaví jedinců pozitivních na kryptosporidie

Označení jedince	Druh	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Pohlaví
8162	<i>Mus musculus</i>	<i>C. tyzzeri</i>	samec
8164	<i>Mus musculus</i>	<i>C. tyzzeri</i>	samec
8172	<i>Mus musculus</i>	<i>C. tyzzeri</i>	samice
8970	<i>Mus musculus</i>	<i>C. muris</i> RN66	samec
8971	<i>Mus musculus</i>	<i>C. muris</i> RN66	samec

U každého vyšetřovaného zvířete byl zjištěn věk. Mezi všemi infikovanými jedinci se nenacházel žádný juvenilní hlodavec, jak popisuje tabulka 14. Toto zjištění odpovídá výsledkům Torrese a kolektivu (2000). Výsledky Rena a kolektivu (2012), kteří detekovali *C. tyzzeri* pouze u dospělých jedinců *Mus musculus* se shodují i s našimi výsledky (tabulka 14).

Tabulka 14. Věk pozitivních jedinců

Označení jedince	Druh	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Věk
8162	<i>Mus musculus</i>	<i>C. tyzzeri</i>	dospělý
8164	<i>Mus musculus</i>	<i>C. tyzzeri</i>	dospělý
8172	<i>Mus musculus</i>	<i>C. tyzzeri</i>	dospělý
8970	<i>Mus musculus</i>	<i>C. muris</i> RN66	dospělý
8971	<i>Mus musculus</i>	<i>C. muris</i> RN66	dospělý

Z celkového počtu pěti infikovaných jedinců byla nákaza detekována ve třech případech v květnu a ve dvou případech v dubnu. Tyto výsledky se shodují se závěry Jagaiové a kolektivu (2009), kteří zjistili zvýšený výskyt infekce *C. parvum* v jarních měsících. I přes to, že u zvířat chovaných v domácím prostředí nelze předpokládat vliv sezónní dynamiky na výskyt infekce kryptosporidiiemi.

6 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo prokázat, změřit a porovnat výskyt a prevalenci kryptosporidií ve vybraných zoo buticích a zájmovém chovu myší domácích (*Mus musculus*) na území Českých Budějovic. Z našich dosavadních výsledků vyplívají tyto závěry:

- Kryptosporidiové infekce byly pozorovány pouze u myší (*Mus musculus*) a potkanů (*Rattus norvegicus*).
- Byly detekovány dva druhy zoonotických kryptosporidií, *C. tyzzeri* a *C. muris*.
- Výsledky ukazují na to, že zvířata chovaná v zájmových chovech, jsou infikována kryptosporidiiemi a představují tak riziko pro člověka.

7 POUŽITÁ LITERATURA

ABD EL-WAHED M.M., SALEM G.H., EL-ASSALAY T.M. (1999). The role of wild rats as a reservoir of some internal parasites in Qalyobia overnorate. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 29 (2), s. 495-503. ISSN 02535890.

ANGUS K.W., HUTCHISON G., MUNRO H.M.C. (1985). Infectivity of a strain of *Cryptosporidium* found in the guinea-pig (*Cavia porcellus*) for guinea-pigs, mice and lambs. *Journal of Comparative Pathology* 95 (2), s. 151-165. ISSN 00219975.

AYDIN Y., ÖZKUL I.A. (1996). Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Veterinary Parasitology* 66 (3-4), s. 257-262. ISSN 03044017.

BAJER A., BEHNKE J.M., BEDNÁŘSKÁ M., KULÍŠ K., SIŇSKI E. (2004). The co-occurrence of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia* spp. and helminth infections in small rodent populations. *Wiadomosci Parazytologiczne* 50 (2), s. 307-315. ISSN 00435163.

BAJER A., BEDNÁŘSKÁ M., ROMANOWSKI J., SIŇSKI E. (2008). Semi-aquatic animals as a source of water contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Wiadomosci Parazytologiczne* 54 (4), s. 308-315. ISSN 00435163.

BARÁT E. (1986). História a hospodársko-spoločenský význam chovu kralikov. *Chováme králiky: História a hospodársko-spoločenský význam chovu kralikov*. 2. vyd. Bratislava: Príroda, s. 7-9. edice: Živočišná výroba-Knižnica drobnochovateľa.

BARTASH-DARWLEY L.M. (2006). Good pet names and pet history from A-Z: Pet guinea pigs [online]. PublicBookshelf, [cit. 2012-04-03]. ISBN 1932496599. Dostupné z: <http://www.publicbookshelf.com/nonfiction/pet-names/pet-guinea>

BARTASH-DAWLEY L.M. (2006). Good pet names and pet history from A-Z: Pet hamsters [online]. PublicBookshelf, [cit. 2012-04-03]. ISBN 1932496599. Dostupné z: <http://www.publicbookshelf.com/nonfiction/pet-names/pet-hamsters>

BENEŠ J. (2009). UV dezinfekce vs. *Cryptosporidium* a *Giardia*. DISA v.o.s. Brno, s. 79-83.

CAREY C.M, LEE H., TREVORS J.T. (2004). Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research* 38 (4), s. 818-862. ISSN 00431354.

CASTLE W.E. (1947). The domestication of the Rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Washington, D.C.: The Academy 33 (5), s. 109-117. ISSN 0027-8424.

Česká republika. Zákon 246: na ochranu zvířat proti týrání. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 1992.

ELANGBAM C.S., QUALS C.W. jr., EWING S.A., LOCHMILLER R.L. (1993). Cryptosporidiosis in a cotton rat (*Sigmodon hispidus*). *Journal of Wildlife Diseases* 29 (3), s. 161-164. ISSN 00903558.

FAYER R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* 126 (1-2), s. 37-56. ISSN 03044017.

FAYER R., XIAO L. (2008). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 2. vyd. London: IWA Pub., 560 s. ISBN 14-200-5226-8.

FAYER R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology* 124 (1), s. 90-97. ISSN 00144894.

FENG Y. (2010). *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Experimental Parasitology* 124 (1), s. 128-137. ISSN 00144894.

FLETA J., SÁNCHEZ-ACEDO C., CLAVEL A., QUÍLEZ J. (1995). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs. *Veterinary Parasitology* 59 (3-4), s. 201-205. ISSN 03044017.

GOLDFARB J., TANNOWITZ H., GROSSNER R., BONNANO C., KAUFMAN D. (1982). Epidemiologic Notes and Reports Cryptosporidiosis: Assessment of Chemotherapy of Males with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Morbidity and Mortality Weekly Report* 31 (44), s. 589-591. ISSN 01492195.

HAJDUŠEK O., DITRICH O., ŠLAPETA J. (2004). Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* 122 (3), s. 183-192. ISSN 03044017.

HARPER J.M. (2008). Wild-derived mouse stocks: an underappreciated tool for aging research. *AGE* 30 (2-3), s. 135-145. ISSN 0161-9152.

HIJJAWI N. (2010). *Cryptosporidium*: New developments in cell culture. *Experimental Parasitology* 124 (1), s. 54-60. ISSN 00144894.

HŮRKOVÁ L., MODRÝ D. (2003). *Cryptosporidium muris* - původce žaludeční kryptosporidiózy hlodavců. *Veterinářství* 53 (6), s. 230-232. ISSN 05068231.

CHALMERS R. M., STURDEE A. P., BULL S. A., MILLER A., WRIGHT S. E. (1997). The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitology Research* 83 (5), s. 478-482. ISSN 0932-0113.

CHRISP C.E., SUCKOW M.A., FAYER R., ARROWOOD M.J., HEALEY M.C., STERLING C.R. (1992). Comparison of the host ranges and antigenicity of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium wrairi* from guinea pigs. *Journal of Protozoology* 39 (3), s. 406-409. ISSN 00223921.

ISEKI M., MEAKAWA T., MORIVA K., UNI S., TAKADA S. (1989). Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN66) in various laboratory animals. *Journal of Parasitology Research* 75 (3), s. 218-222. ISSN 20900031.

JAGAI J.S., CASTRONOVO D.A., MONCHAK J., NAUMOVA E.N. (2009). Seasonality of cryptosporidiosis: A meta - analysis approach. *Environmental Research* 109 (4), s. 465-478. ISSN 00139351.

JELÍNEK F., ALDOVÁ E., LÁVIČKOVÁ M., ŠKARDOVÁ O., ZAJÍČEK D. (1993). *Nemoci laboratorních zvířat*. 1. vyd. Brno: Ústav patologické morfologie FVL VŠVF v Brně, s. 62-63.

JEX A.R., SMITH H.V., MONIS P.T., CAMPBELL B.E., GASSER R.B. (2008). *Cryptosporidium*? Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances* 26 (4), s. 304-317. ISSN 07349750.

JOKIPII L., JOKIPII A.M. (1986). Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine* 315 (26), s. 1643-1647. ISSN 15334406.

KANG CH.D., LEE S.W., PARK T.H., SIM S.J. (2006). Performance enhancement of real-time detection of protozoan parasite, *Cryptosporidium* oocyst by a modified surface plasmon resonance (SPR) biosensor. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (3), s. 387-390. ISSN 01410229.

KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B., DITRICH O. (2009). *Cryptosporidium* Pig Genotype II in Immunocompetent Man. *Emerging Infectious Diseases* 15 (6), s. 982-983. ISSN 10806040.

LANGE M., LINKE-GRÜN G. (2006). *Můj potkan a já*. 1., české vyd. Praha: Jan Vašut, s. 63. edice: Máme rádi zvířata. ISBN 80-723-6444-8

LEVINE N.P. (1961). Protozoan parasites of domestic animals and of man [online]. Mineapolis: Burgess Publishing, [cit. 2012-04-10]. Dostupné z: <http://www.biodiversitylibrary.org/title/7000#page/430/mode/1up>

MATSUBAYASHI M., KIMATA I., ISEKI M., HAJIRI T., TANI H., SASAI K., BABA E. (2005). Infectivity of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. *Veterinary Parasitology* 129 (1-2), s. 165-168. ISSN 03044017.

MCGRATH J. (2008). How animal domestication works: The birds and the bees: Uses of other animals. In: BRAIN, Marshall. *HowStuffWorks* [online]. Raleigh, N.C.: HowStuffWorks, Inc, [2008] [cit. 2012-04-03]. Dostupné z: <http://science.howstuffworks.com/environmental/life/zoology/all-about-animals/animal-domestication7.htm>

MEHLHORN H. (2001), with contributions by ARMSTRONG P.M., ASPÖCK H., BAUGHMAN R.P., BEHR C., COMBES C., DE BONT J., DUBREMETZ J.F., FREEMAN J., HÄNEL J.K., HANSEN O., HARDER A., KANESHIRO E.S., KÖHLER P., LONDERSHAUSEN M., MACKENSTENDT U., MEHLHORN H., PEREIRA DA SILVA L.H., RAETHER W., REITER-OWONA J., RICHTER D., RÖLLINGHOFF M., SHAUB G., SCHNIEDER T., SEITZ H.M., SPIELMAN A., SPINDLER K.D., TARASCHLEWSKI H., TIELENS A.G.M., TURBERG A., VERCRUYSSSE J., VOIGHT W.P., WALLDORF V., WERHSDORFER W.H. Encyclopedic reference of parasitology. 2. vyd. Berlin: Springer, s. 678. ISBN 35-406-6819-5.

MILÁČEK P., VÍTOVEC J. (1985). Differential staining of Cryptosporidia by aniline-carbolmethyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica* 32 (50). ISSN 18036465.

MILLER T.A., SCHAEFER F.W. (2007). Characterization of a *Cryptosporidium muris* infection and reinfection in CF-1 mice. *Veterinary Parasitology* 144 (3-4), s. 208-221. ISSN 03044017.

MORGAN U.M., XIAO L., FAYER R., LAL A., THOMPSON R.C.A. (1999). Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *International Journal for Parasitology* 29 (11), s. 1733-1751. ISSN 00207519.

MORGAN U.M., XIAO L., MONIS P., SULAIMAN I., BLAGBURN B., OLSON M., UPTON S.J., KHRAMTSOV N.V., LAI A., ELLIOT A., THOMPSON R.C.A. (2000). Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. *Parasitology* 120 (5), s. 547-564. ISSN 00311820.

NOLAN M.J., JEX A.R., HAYDON S.R., STEVENS M.A., GASSER R.B. (2010). Molecular detection of *Cryptosporidium cuniculus* in rabbits in Australia. *Infection, Genetics and Evolution* 10 (8), s. 1179-1187. ISSN 15671348.

ÖZKUL I.A., AYDIN Y. (1994). Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Veterinary Parasitology* 55 (1-2), s. 129-132 ISSN 03044017.

PAVLÁSEK I., LÁVIČKA M. (1995). The first finding of a spontaneous gastric cryptosporidiosis infection in hamsters (*Phodopus roborovskii* Satunin, 1903). *Veterinární medicína* 40 (8), s. 261-263. ISSN 03758427.

PLUTZER J., KARANIS P. (2009). Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. *Veterinary Parasitology* 165 (3-4), s. 187-199. ISSN 03044017.

QUY R.J., COWAN D.P., HAYNES P.J., STURDEE A.P., CHALMERS R.M., BODLEY-TICKELL A.T., BULL S.A. (1999). The Norway rat as a reservoir host of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Wildlife Diseases* 35 (4), s. 660-670. ISSN 00903558.

RASMUSSEN K.R., HEALEY M.C. (1992). *Cryptosporidium parvum*: experimental infections in aged Syrian golden hamsters. *Journal of Infectious Disease* 165 (4), s. 769-772. ISSN 00221899.

REN X., ZHAO J., ZHANG L., NING CH., JIAN F., WANG R., LV CH., WANG Q., ARROWOOD M.J., XIAO L. (2012). *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology* 130 (3), s. 274-281. ISSN 00144894.

ROBINSON G., WRIGHT S., ELWIN K., HADFIELD S.J., KATZER F., BARTLEY P.M., HUNTER P.R., NATH M., INNES E.A., CHALMERS R.M. (2010). Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *International Journal for Parasitology* 40 (13), s. 1539-1548. ISSN 00207519.

SMITH H.V., NICHOLS A.B.R. (2010). *Cryptosporidium*: Detection in water and food. *Experimental Parasitology* 124 (1), s. 61-79. ISSN 00144894.

SRÉTER T., KOVÁCS G., DA SILVA A.J., PIENIAZEK N.J., SZÉLL Z., DOBOS-KOVÁCS M., MÁRIALIGETI K., VARGA I. (2000). Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2), s. 735-738. ISSN 00992240.

ŠLAPETA J. (2012). Letter: The name *Cryptosporidium tyzzeri* Ren, Zhao, Zhang, Ning, Jian, Wang, Lv, Arrowood and Xiao, 2012 is permanently invalid. *Experimental Parasitology* 130 (3), s. 306-307. ISSN 00144894.

TANRIVERDI S., ARSLAN M.O., AKIYOSHI D.E., TZIPORI S., WIDMER G. (2003). Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations

in humans and calves. *Molecular and Biological Parasitology*. 130 (1), s. 13-48. ISSN 01666851.

TILLEY M., UPTON S.J., CHRISP C.E. (1991). A comparative study on the biology of *Cryptosporidium* sp. from guinea pigs and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *Canadian Journal of Microbiology* 37 (12), s. 949-952. ISSN 14803275.

TORRES J., GRACENEA M., GÓMEZ M.S., ARRIZABALAGA A., GONZÁLEZ-MORENO O. (2000). The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Veterinary Parasitology* 92 (4), s. 253-260. ISSN 03044017.

TYZZER E.E. (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 5 (1), s. 12-13. ISSN 00223921.

TYZZER E.E. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde* 26, s. 394-412. ISSN 00039284.

VEJLUPKOVÁ L. (2011). Historie myšek: Něco málo z historie myšek. In: *Chovatelská stanice Mettler* [online]. 2011 [cit. 2012-04-03]. Dostupné z: <http://www.mouseworld.g6.cz/index/index25.html>

VETTERLING J.M., TAKEUCHI A., MADDEN P.A. (1971). Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. *Journal of Protozoology* 18 (2), s. 248-260. ISSN 00223921.

VOLF P., HORÁK P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. 1. vyd. Praha: Triton, s. 318. ISBN 978-807-3870-089.

WEBSTER J.P., MACDONALD D.W. (1995). Parasites of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Veterinary Parasitology* 111 (3), s. 247-255. ISSN 03044017.

WEBSTER J.P. (1996). Wild brown rats (*Rattus norvegicus*) as a zoonotic risk on farms in England and Wales. *Communicable Disease Report CDR Review* 1;6 (3), s. R46-49. ISSN 13509349.

XIAO L., FAYER R., RYAN U., UPTON S.J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* 17 (1), s. 72-97. ISSN 10986618.

XIAO L., RYAN U.M., FAYER R., BOWMAN D.D., ZHANG L. (2012). *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium pestis*: Which name is valid? *Experimental Parasitology* 130 (3), s. 308-309. ISSN 00144894.