

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

**Kryptosporidiové a mikrosporidiové infekce domácích
a divokých prasat**

autoreferát disertační práce

Ing. Karel Němejc

Školitel: **doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.**

Školitel specialista: **prof. MVDr. Jiří Vítovec, DrSc.**

České Budějovice 2014

Autoreferát disertační práce

Doktorand: Ing. Karel Němejc
Studijní program: Zootechnika
Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat
Název práce: **Kryptosporidiové a mikrosporidiové infekce domácích a divokých prasat**

Školitel: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
Školitel specialista: prof. MVDr. Jiří Vítovec, DrSc.

Oponenti: prof. Ing. Iva Langrová, CSc.
FAPPZ ČZU v Praze
prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.
FTZ ČZU v Praze
doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.
PřF JU v Českých Budějovicích

Obhajoba disertační práce se koná dne 30. dubna 2014 v 10:00 hod. v místnosti B126 - Katedra zootechnických a veterinárních disciplín a kvality produktů, ZF JU v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.
předseda OR DSP Zootechnika
ZF JU v Českých Budějovicích

Disertační práce vznikla za podpory následujících grantů

GA ČR 523/07/P117 - Zoonotický potenciál kryptosporidií infikujících skot a prasata
(2007 - 2009)

GA JU 022/2010/Z - Využití genetických a biotechnologických postupů při upevňování
zdraví zvířat (2010 - 2012)

GA JU 11/2013/Z - Zdraví hospodářských zvířat a zdravotní bezpečnost potravin
- genetické, parazitární a nutriční aspekty (2013 - 2015)

MŠMT ČR - LH11061 - Diverzita, biologie a fylogenetika kryptosporidií parazitujících
u hlodavců (2011 - 2014)

MŠMT ČR - MSM 6007665806 - Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření
v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření
souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním
(2005 - 2011)

NCRR - NIH č. 2P20 RR015566 - Proteases in Disease (National Center for Research
Resources)

PaÚ BC AV ČR - AVOZ60220518 - Parazitismus a parazito-hostitelské vztahy
na organismální, buněčné a molekulové úrovni (2005 - dosud)

ANOTACE

Cílem práce bylo popsat výskyt, prevalenci a biologii kryptosporidií a mikrosporidií infikujících domácí a divoká prasata se zaměřením na vliv zoohygieny a technologie chovu, na porovnání výsledků získaných z chovů prasat domácích s výsledky volně žijících prasat divokých, a na charakteristiku věkové a hostitelské specifity kryptosporidií prasat. Mezi roky 2009 a 2012 byl v 24 náhodně vybraných komerčních chovech prasat v České republice a v 41 náhodně vybraných oborách a lesních lokalitách čtyř středoevropských států (Rakousko, Česká republika, Polsko a Slovensko) sledován výskyt *Cryptosporidium* spp. Standardní mikroskopii a molekulárními technikami bylo na přítomnost *Cryptosporidium* spp. vyšetřeno celkem 2097 vzorků trusu domácích prasat všech věkových kategorií a 653 vzorků trusu divokých prasat. Dále byl u černé zvěře pomocí molekulárních technik studován výskyt mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon bieneusi*. V reakci na nevyhovující postupy pro detekci smíšených infekcí *Cryptosporidium suis* a *C. scrofarum* byly v průběhu výzkumu navrženy a testovány nové druhově specifické primery. Naše výsledky ukázaly rozdíly ve vnímavosti prasat k druhově specifickým kryptosporidiím v závislosti na věku zvířat. Zatímco *C. suis* bylo primárně detekováno u všech selat v období od narození do 5. týdne věku a následně u starších zvířat ve smíšených infekcích spolu s *C. scrofarum*, posledně zmíněný druh kryptosporidie byl detekován pouze u zvířat starších 6 týdnů. Tyto výsledky byly následně potvrzeny na základě experimentálních infekcí. U selat odstavených ve věku 3 týdnů byla prokázána dvakrát větší pravděpodobnost infekce druhem *C. scrofarum* než u prasat odstavovaných později. U prasat chovaných ve stelivových systémech je větší pravděpodobnost výskytu kryptosporidií než u bezstelivových systémů. Kromě výskytu *C. suis*, *C. scrofarum* a jejich smíšených infekcí byl v trusu komerčně chovaných prasat zaznamenán výskyt *C. muris* a *C. parvum*. Podobně jako u domácích prasat, bylo u dospělých jedinců černé zvěře *C. scrofarum* detekováno jako dominantní druh kryptosporidií. U nich byly nalezeny také dva genotypy mikrosporidií *Encephalitozoon cuniculi* a jedenáct genotypů *Enterocytozoon bieneusi*. *Enterocytozoon bieneusi* byl detekován jako převládající druh mikrosporidií prasat divokých. Výskyt žádného jiného druhu kryptosporidií ani mikrosporidií nebyl u prasat divokých zjištěn. Ani u domácích prasat, ani prasat divokých nebyla u kryptosporidiových infekcí potvrzena souvislost mezi průjmem a intenzitou produkovaných oocyst. I přes zoonotický potenciál všech

detekovaných druhů a genotypů kryptosporidií a mikrosporidií nepředstavují ani divoká, ani domácí prasata významné zdravotní nebezpečí pro veřejné zdraví obyvatelstva.

Klíčová slova:

Cryptosporidium suis; *Cryptosporidium scrofarum*; *Encephalitozoon* spp.; *Enterocytozoon bieneusi*; *Sus scrofa*; molekulární analýzy; experimentální infekce; věková specifita; vnímavost; technologie chovu

ANNOTATION

The aim of the thesis was to describe the occurrence, prevalence and biology of *Cryptosporidium* spp. and microsporidia infecting domestic pigs and European wild boars (*Sus scrofa*) with focus on the influence of animal hygiene, management and breeding technology, comparison of results obtained from commercially raised pigs to results from European wild boars, and the characteristics of age and host specificity of porcine cryptosporidia. From 2009 to 2012 the occurrence of *Cryptosporidium* spp. was investigated on 24 randomly selected pig farms in the Czech Republic and 41 randomly selected enclosures and forest areas with European wild boars across four Central European countries (Austria, the Czech Republic, Poland and the Slovak Republic). A total of 2097 faecal samples of domestic pigs of all age categories and a total of 653 faecal samples of Eurasian wild boars were evaluated for the presence of *Cryptosporidium* spp. by standard microscopy and molecular tools. In addition, the occurrence of microsporidia of the genus *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon bienewisi* were studied using molecular tools in Eurasian wild boars. As a reaction to inconvenient methods for the detection of mixed infections of *Cryptosporidium suis* and *C. scrofarum*, novel species-specific primers were designed and tested during the study. Our results showed differences in age-dependent susceptibility of pigs to species-specific cryptosporidia. While *Cryptosporidium suis* was primarily detected in all pre-weaners of domestic pigs (from birth to 5 weeks of age) and subsequently in older animals in mixed infections with *C. scrofarum* - the latter species of cryptosporidia was detected only in animals older than 6 weeks. These results were subsequently confirmed through experimental infections. Piglets weaned at 3 weeks of age were twice more likely to be infected with *C. scrofarum* than piglets weaned at an older age. Pigs raised on straw bedding were more likely to have *Cryptosporidium* than the ones raised on slat/ slurry systems. Besides the occurrence of *C. suis*, *C. scrofarum* and their concurrent infections, *C. muris* and *C. parvum* were detected in faeces of commercially raised pigs. Similarly to domestic pigs, *C. scrofarum* was detected as a dominant species infecting adult Eurasian wild boars, in which two genotypes of *Encephalitozoon cuniculi* and eleven genotypes of *Enterocytozoon bienewisi* were found. *Enterocytozoon bienewisi* was detected as a predominant species of microsporidia in them. No other cryptosporidia and microsporidia were detected in Eurasian wild boars. Neither in domestic pigs, nor in Eurasian wild boars, *Cryptosporidium* infections, relationship

between diarrhoea and intensity of produced oocysts, was confirmed. Despite the zoonotic potential of all detected species and genotypes of *Cryptosporidium* and microsporidia, neither wild nor domestic pigs represent any significant health risk to public health.

Key words:

Cryptosporidium suis; *Cryptosporidium scrofarum*; *Encephalitozoon* spp.; *Enterocytozoon bieneusi*; *Sus scrofa*; molecular analyses; experimental infections; age specificity; susceptibility; farming technology

Obsah

1. ÚVOD	1
2. CÍL PRÁCE	3
3. MATERIÁL A METODY	4
3.1 Materiál	4
3.2 Metody	5
3.2.1 Mikroskopická diagnostika oocyst kryptosporidií s použitím barvicích metod	5
3.2.2 Stanovení intenzity kryptosporidiových infekcí (OPG).....	5
3.2.3 Experimentální infekce	6
3.2.3.1 Zdroj oocyst pro experimentální infekce	6
3.2.3.2 Životaschopnost oocyst.....	6
3.2.3.3 Průběh experimentu.....	6
3.2.3.4 Izolace DNA a molekulární analýzy biologických vzorků z experimentu.....	7
3.2.4 Diagnostika kryptosporidií a mikrosporidií molekulárními metodami.....	7
3.2.4.1 Izolace DNA.....	7
3.2.4.2 PCR - nested PCR s rodově specifickými primery pro kryptosporidie	8
3.2.4.3 Genotypizace kryptosporidií - PCR-RFPL	9
3.2.4.4 Genotypizace kryptosporidií - nested PCR s druhově specifickými primery	10
3.2.4.5 PCR - nested PCR diagnostika pro mikrosporidie	11
3.2.4.6 Gelová elektroforéza.....	13
3.2.4.7 Sekvenování	13
3.2.4.8 Fylogenetické analýzy.....	13
3.3 Statistické zpracování výsledků	14
4. VÝSLEDKY A SHRUTÍ	15
4.1 Vliv zoohygieny a technologie chovu na výskyt kryptosporidiových infekcí v chovech prasat	15
4.2 Výskyt a prevalence kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí v populacích divokých prasat.....	17
4.3 Porovnání výsledků získaných z chovů prasat domácích s výsledky získanými u volně žijících prasat divokých	19
4.4 Charakteristika věkové a hostitelské specifity kryptosporidií prasat	19
5. ZÁVĚRY	21
6. PŘEHLED AUTOROVÝCH PUBLIKACÍ	22
7. REFERENCE	23

1. ÚVOD

Chov prasat patří i na začátku 21. století mezi významná a poměrně stabilní odvětví živočišné výroby. Obliba vepřového masa navazuje na tradiční českou kuchyni a v současnosti patří k nejkonzumovanějším masům v Česku (Český statistický úřad, 2012; Poltársky et Ochodnický, 2003). Ekonomické aspekty výroby vepřového masa tlačí výrobce ke stále většímu počtu úsporných opatření, jež nejsou relevantní k zdravotnímu a produkčnímu stavu v chovech prasat, která v podmínkách intenzivních chovů vyžadují mimořádné nároky nejen z hlediska kvality výživy a ustájení, ale i zdravotního stavu. Jedním z elementárních problémů při úspěšném chovu prasat jsou kromě chorob neinfekčního, virového a bakteriálního původu také parazitózy, které mohou výrazně ovlivnit zdravotní stav zvířat a následnou ekonomiku chovu. Ve většině případů nebývají paraziti přímou příčinou výrazných klinických onemocnění či úhynů zvířat, nicméně u všech kategorií prasat způsobují velké ekonomické ztráty v důsledku snižování celkové odolnosti a přírůstků zvířat. V neposlední řadě také vznikají predispozice k vzniku jiných infekčních nemocí (Bergeland, 1977; Boes et al., 2000; Fayer et Ungar, 1986; Wieler et al., 2001; Xiao et al., 1994; Xiao et Fayer, 2008).

Prasata divoká jsou všeobecně považována za jeden z významných rezervoárů infekčních agens, a to jak pro hospodářská zvířata, tak pro lidi (Dorny et al., 2009; Macpherson, 2005). Veterinární péče u černé zvěře je soustředěna především na infekční virové, případně bakteriální choroby a z parazitóz je ostře sledována *Trichinella* spp. V důsledku nárůstu populace prasat divokých a značného rozšiřování oborních chovů se vytvářejí příznivé podmínky pro šíření některých parazitóz těchto zvířat (Chroust, 2001; Straková et Ševčík, 2002).

K jednomu z největších problémů myslivosti nejen v České republice patří populační exploze černé zvěře (Zbořil, 2013). Mezi hlavní negativa, která se s výskytem černé zvěře pojí, se bezesporu řadí astronomické škody na polních kulturách, velkou potíží je rozšiřování divočáků na území, kde se dříve vůbec nevyskytovali, osídlování příměstských oblastí či městských parků, což s sebou přináší bezprostřední interakci s člověkem. Z epidemiologického hlediska představují prasata významný rezervoár zoonotických infekcí (Zbořil, 2013). Navíc adlibitní nabídka potravy na krmelištích a vnadištích zvyšuje rozmnožovací úspěšnost černé zvěře, pokles mortality a dřívější

nástup pohlavní dospělosti, což má za následek vyšší přežívání i za velmi nepříznivých podmínek (Nentvichová, 2011).

K jedné z celosvětově intenzivně sledovaných skupin parazitů se řadí jednobuněční paraziti patřící do rodu *Cryptosporidium* (Apicomplexa), kteří byli popsáni jako přímá příčina různých respiračních a gastrointestinálních onemocnění člověka, hospodářských a volně žijících zvířat (Fayer et Ungar, 1986; Xiao et Fayer, 2008; Xiao, 2009). Přestože byla kryptosporidióza domácích prasat popsána u všech věkových kategorií po celém světě, existuje jen omezené množství informací o výskytu, rozšíření a patogenitě těchto protozoí u volně žijících prasat divokých (Castro-Hermida et al., 2011; García-Preedo et al., 2013; Izumiyama et al., 2001; Koudela et al., 1986; Mølbak et al., 1994; Quílez et al., 1996; Wieler et al., 2001; Xiao et al., 1994). Za jediné hostitelsky specifické kryptosporidie prasat jsou v současné době považovány *Cryptosporidium suis* a *Cryptosporidium scrofarum* (Kváč et al., 2013; Morgan et al., 1999; Ryan et al., 2003; Ryan et al., 2004).

Mikrosporidie, dříve klasifikovány jako prvoci (Weber et al., 1994) a nedávno na základě genetických a molekulárních výsledků zahrnuty do říše Fungi (Hibbett et al., 2007), jsou intracelulární obligátní paraziti patřící do kmene Mikrosporidia zahrnující více než 1000 druhů v přibližně 100 rodech (Wittner, 1999). Mikrosporidie byly detekovány u široké škály bezobratlých (zejména hmyzu) a obratlovců (ryby a savci) (Wittner, 1999). Čtrnáct druhů patřících do osmi rodů je infekčních pro člověka (Didier et al., 2004; Didier et Weiss, 2006). *Encephalitozoon cuniculi* je nejvíce studovaným druhem mikrosporidií vyskytujících se u savců. U domácích prasat byl *E. cuniculi* poprvé identifikován v roce 2007 (Kahler et Thurston-Enriquez, 2007). Dále u nich byl popsán výskyt mikrosporidií *E. intestinalis* (Bornay-Llinares et al., 1998; Da Silva et al., 1997) a *Enterocytozoon bieneusi* (Breitenmoser et al., 1999; Buckholt et al., 2002; Dengjel et al., 2001; Deplazes et al., 1996; Jeong et al., 2007; Rinder et al., 2000; Sak et al., 2008), avšak data týkající se prevalence a výskytu mikrosporidiových infekcí domácích prasat jsou stále nekompletní, v případě volně žijících prasat divokých jsou relevantní informace minimální a nepostačující k jejich bližšímu poznání a konkrétnějším závěrům sloužícím pro navazující výzkumné účely.

2. CÍL PRÁCE

Cílem řešení disertační práce bylo popsat výskyt, prevalenci a biologii kryptosporidií a mikrosporidií infikujících domácí a divoká prasata.

Dílčí cíle:

- Vliv zoohygieny a technologie chovu na výskyt kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí v chovech prasat.
- Výskyt a prevalence kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí v populacích divokých prasat.
- Porovnání výsledků získaných z chovů prasat domácích s výsledky získanými u volně žijících prasat divokých.
- Charakteristika věkové a hostitelské specifity kryptosporidií prasat.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

Na přítomnost kryptosporidií v trusu prasat bylo v letech 2009 až 2012 vyšetřeno 2097 vzorků trusu domácích prasat a 653 vzorků trusu černé zvěře (*Sus scrofa*), z nichž 460 bylo zároveň vyšetřeno na přítomnost mikrosporidií.

Vzorky trusu domácích prasat pocházely celkem z 24 náhodně vybraných chovatelských zařízení České republiky, bez předchozí znalosti parazitologické situace, s různými technologiemi chovu (celoroštové podlahy či částečně zarošтовané podlahy v kombinaci s betonovou plochou, ustájení na betonové podlaze s manuálním či plně automatizovaným odklizem v dvoudenních intervalech, stelivové ustájení prasat měněné jednou nebo dvakrát týdně).

V případě oborně chovaných či volně žijících prasat divokých byl trus získán z celkem 41 náhodně vybraných lokalit střední Evropy, konkrétně bylo vyšetřeno 424 vzorků trusu z 26 lokalit České republiky, 129 vzorků z 9 lokalit Polska, 56 vzorků z 3 lokalit Slovenska a 44 vzorků z 3 lokalit Rakouska.

U domácích prasat byly čerstvé vzorky trusu odebírány ihned po defekaci zvířat z podlahy ustájení, individuálně umístěny do plastové odběrové nádoby bez fixace. V době odběru byla zaznamenána konzistence trusu. Aby byla vyloučena kumulativní prevalence sledovaných parazitů, nebyly vzorky, vyjma zvířat zařazených do experimentálního pokusu, sbírány opakovaně od stejných zvířat. Vzorky byly převezeny do laboratoře, skladovány při 4 °C a do 24 hodin vyšetřeny.

Vzorky trusu prasat divokých byly odebírány přímo z konečnicku ulovené zvěře (n = 29) nebo ze země v okolí krmelišť (n = 624), kde bývá vysoká koncentrace zvířat. Odebraný trus byl jednotlivě umístěn do sterilních plastových nádob bez fixace. Byla zaznamenána konzistence trusu v čase odběru a vzorky byly v chladičím boxu dopraveny do laboratoře a skladovány při teplotě 4 °C do doby zpracování.

3.2 Metody

3.2.1 Mikroskopická diagnostika oocyst kryptosporidií s použitím barvicích metod

Odebrané vzorky trusu domácích prasat i černé zvěře byly mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií pomocí barvení anilin-karbol-methylvioletí dle Miláčka et Vítovce (1985).

Zásobní roztoky:

- roztok anilin-karbol-methylvioletí
 - 0,6 g methylvioletí
 - 1 ml anilinu
 - 1 g fenolu
 - 30 ml ethanolu
 - 70 ml deionizované vody
- 2 % roztok kyseliny sírové
- 1 % roztok tartrazinu v 1 % kyselině octové

Postup:

Na podložní sklo natřít tenkou vrstvou trusu, nechat zaschnout a fixovat methanolem v plameni (sklo ponořit do methanolu a po vyjmutí zapálit). Podložní sklo s nátěrem barvit 30 minut roztokem anilin-karbol-methylvioletí. Takto obarvený preparát opláchnout vodou a po dobu 2 minut diferencovat 2 % kyselinou sírovou. Sklíčko opláchnout pod tekoucí vodou a 3 - 5 minut dobarvovat v roztoku tartrazinu. Znovu opláchnout preparát slabým proudem tekoucí vody, osušit a prohlížet světelným mikroskopem za použití imerzního oleje při zvětšení 1000×.

3.2.2 Stanovení intenzity kryptosporidiových infekcí (OPG)

Intenzita kryptosporidiových infekcí byla stanovována mikroskopickým vyšetřením vzorků jako počet detekovaných oocyst v 1 gramu vzorku trusu (OPG - oocysts per gram) dle Kváče et al. (2007).

3.2.3 Experimentální infekce

3.2.3.1 Zdroj oocyst pro experimentální infekce

Vzorky trusu pocházely od 7 týdnů starých prasat chovaných v komerčních podnicích, kde bylo *C. scrofarum* zjištěno již dříve (Jeníková et al., 2011). Vzorky pozitivních zvířat byly denně odebírány a uchovávány v 2,5 % roztoku dichromanu draselného. Oocysty kryptosporidií byly vyčištěny za použití sacharózového gradientu (Arrowood et Sterling, 1987) a centrifugací v cesium chloridovém gradientu (Kilani et Sekla, 1987). Vyčištěné oocysty byly skladovány v temnu při teplotě 4 °C maximálně po dobu 4 týdnů v PBS pufru (phosphate buffered saline) s přidavkem antimykotik a antibiotik. Přítomnost kryptosporidiových oocyst byla stanovena a jejich druhová příslušnost určena za použití mikroskopického vyšetření anilin-karbol-methylvioletí barvených preparátů odebíraných vzorků (Miláček et Vítovec, 1985) a nested PCR amplifikací částečného fragmentu malé ribozomální podjednotky rDNA (SSU).

3.2.3.2 Životaschopnost oocyst

Počet oocyst inokulovaných zvířatům v experimentu byl stanoven výpočtem v hemacytomu. Životaschopnost oocyst byla testována s použitím barvení propidium jodidem (PI) (Sauch et al., 1991). Oocysty byly promyty v destilované vodě (DW, 1×10^5 oocyst v 100 μ l) a smíseny s 10 μ l PI (1 % roztok, SIGMA). Po 30 minutách inkubace při pokojové teplotě, v temnu, byly oocysty dvakrát promyty v destilované vodě. Jejich životaschopnost byla testována pomocí fluorescence (mrtvé oocysty svítí červeně; filtr 420 nm, Olympus IX70). Bylo napočítáno celkem 5×100 oocyst.

3.2.3.3 Průběh experimentu

Skupiny 4-, 5-, 6-, 7- a 8- týdenních prasat (*Sus scrofa*) (3 zvířata v každé skupině; zakoupena z vybraného chovatelského zařízení bez kryptosporidiových infekcí) byla perorálně infikována dávkou 1×10^6 životaschopných oocyst *C. scrofarum* v 20 ml destilované vody na každé zvíře. Aby bylo zamezeno kontaminaci prostředí oocystami, každé prase bylo individuálně ustájeno v 5 m² kotcích s betonovými stěnami a podlahami v experimentální stáji. Sterilní voda a krmění byly zvířatům podávány *ad libitum*. Vzorky trusu všech zvířat v experimentu byly odebírány denně po dobu 30 dnů od inokulace (DPI - days post inoculation/ infection). Vzorky byly barveny anilin-karbol-methylvioletí a přítomnost specifické kryptosporidiové DNA byla potvrzena pomocí nested PCR

amplifikující část genu kódující malou ribozomální podjednotku. Intenzita infekce byla stanovena jako počet oocyst na gram trusu (OPG) dle Kváče et al. (2007). Všechny experimenty byly ukončeny 30 DPI, zvířata byla utracena a vzorky odebrány a zpracovány pro PCR analýzu.

3.2.3.4 Izolace DNA a molekulární analýzy biologických vzorků z experimentu

K potvrzení přítomnosti *C. scrofarum* a vyloučení jiných druhů kryptosporidií u zvířat v experimentu byla vyizolována celková DNA z 200 mg každého odebraného vzorku trusu, 200 mg vzorků tkání či 1×10^6 oocyst (odpovídá infekční dávce) za pomoci kitu QIAamp DNA Stool Mini Kit nebo DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Další postup izolace DNA odpovídá podkapitole 3.2.4.1, metodika použitých molekulárních analýz je popsána v kapitolách 3.2.4.2, 3.2.4.3 a 3.2.4.4. Jako pozitivní kontroly byly použity vzorky obsahující DNA *C. scrofarum*, *C. suis* nebo *C. hominis*.

3.2.4 Diagnostika kryptosporidií a mikrosporidií molekulárními metodami

Ze všech vzorků trusu domácích i divokých prasat byla komerčním kitem vyizolována DNA, jež byla následně molekulárně analyzována pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce) metod. Další vyhodnocení vzorků proběhlo pomocí gelové elektroforézy s vizualizací UV transiluminátorem při vlnové délce 302 nm. V případě pozitivního nálezu byl fragment obsahující DNA vyříznut, extrahován z gelu a dále zpracováván. Jednotlivé kroky molekulárních analýz jsou detailněji uvedeny níže.

3.2.4.1 Izolace DNA

Extrakce DNA z trusu byla provedena pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitek) s mírnou modifikací podle níže uvedeného postupu.

Součásti izolačního kitu:

- lyzační pufr P
- proteinase K
- pufr P
- promývací pufry Wash I a Wash II
- eluční pufr D
- Spin Filter + Tube kolony se sběrnými zkumavkami

Postup:

Čerstvý trus o množství 200 mg dát do Safe-Lock-Tube, přidat skleněné kuličky (BioSpec Products, Inc., USA) a 1,2 ml Lysis Buffer P. Rozbít 2 minuty při maximální rychlosti užitím BeadBeateru (FastPrep[®] - 24 Instrument, M.P. Biomedicals, USA). Inkubovat 10 minut při teplotě 95 °C v inkubačním termobloku. Po 10 minutách centrifugovat 1 minutu rychlostí 14 000 g. Přenést veškerý supernatant do InviAdsorb-Tube, 15 sekund vortexovat, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat po dobu 3 minut při rychlosti 14 000 g. Supernatant přepipetovat do čistých ependorfeek, centrifugovat 3 minuty při rychlosti 14 000 g. Do čistých mikrozkuavek napipetovat 25 µl proteinase K a přidat 400 µl supernatantu, zhomogenizovat. Inkubovat 10 minut při 70 °C. Poté připipetovat 400 µl Binding Buffer P, zhomogenizovat. Přepipetovat veškerý objem na kolonu Spin Filter + Tube (kolona se sběrnou mikrozkuavkou), inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g. V další fázi vylít odpad ze sběrné mikrozkuavky, napipetovat 500 µl Wash I na kolonu, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g. Vylít odpad ze sběrné mikrozkuavky, napipetovat 800 µl Wash II na kolonu, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g. Vylít odpad a znovu centrifugovat 3 minuty/14 000 g. V konečné fázi na čistou ependorfkku dát kolonu, napipetovat 200 µl předehřátého Elution Buffer D (70 °C) na kolonu, inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.

3.2.4.2 PCR - nested PCR s rodově specifickými primery pro kryptosporidie

Pro amplifikaci části genu kódující malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) byla použita metoda nested PCR dle protokolu Xiao et al. (1999) a Jiang et al. (2005). Celkový objem jednotlivých reakčních směsí činil pro primární PCR reakci 20 µl a sekundární PCR reakci 30 µl (Tabulka 1). K amplifikaci byly použity rodově specifické primery uvedené v tabulce 2. Požadované úseky templátové DNA byly amplifikovány v termocycleru (Little Genius, BIOER). Po počáteční denaturaci 94 °C 3 minuty, bylo provedeno celkem 35 cyklů sestávajících z denaturace 94 °C po 45 s, annealingu 55 °C po 45 s a extenze 72 °C po 60 s, s finální extenzí 72 °C 7 minut. Ke každé reakci byla přidána pozitivní a negativní kontrola (PCR voda). Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 3 µl primárního PCR produktu.

Chemikálie:

- deionizovaná PCR H₂O (Top-Bio, ČR)
- deoxyribonukleosid trifosfáty (200 µM dNTP's, 10 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- Taq purple DNA polymeráza (1 U/µl, Top-Bio, ČR)
- MgCl₂ (25 mM, Top-Bio, ČR)
- bovinní sérový albumin (BSA 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, ČR)
- primery (10 µM, Generi Biotech, ČR)

Tabulka 1: Předpis reakce pro nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou ribosomální podjednotku kryptosporidií s použitím rodově specifických primerů

Reagencie	Koncentrace	Primární PCR (µl)	Sekundární PCR (µl)
H ₂ O		11,30	19,65
MgCl ₂	25 mM	1,20	1,80
10× buffer	1×	2,00	3,00
dNTP	10 mM	0,40	0,60
Primer - forward	10 µM	0,40	0,60
Primer - reverse	10 µM	0,40	0,60
BSA	10 mg/ml	0,80	-
Taq	1 U/1µl	0,50	0,75
DNA		3,00	3,00
Celkem		20	30

Tabulka 2: Rodově specifické primery pro nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou ribosomální podjednotku kryptosporidií (Jiang et al., 2005; Xiao et al., 1999)

Primární PCR	Sekvence
Cry F1	5'- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG -3'
Cry R1	5'- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA -3'
Sekundární PCR	Sekvence
Cry F2	5'- GGA AGG GTT GAT TTT ATT AGA TAA -3'
Cry R2	5'- CTC ATA AGG TGC TAG AGG AGT A -3'

3.2.4.3 Genotypizace kryptosporidií - PCR-RFPL

K rozlišení jednotlivých druhů či genotypů kryptosporidií byla použita metoda PCR-RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů) a rodově specifické primery (3.2.4.2).

Chemikálie:

- restriční endonukleáza *Ssp* I nebo *Vsp* I (10 U/μl, BioLabs® Inc., USA)
- 10× pufr *Ssp* I nebo *Vsp* I (BioLabs® Inc., USA)
- PCR H₂O (Top-Bio, ČR)
- sekundární PCR produkt

Postup:

Pro restriční analýzu použít 15 μl sekundárního PCR produktu do 25 μl reakce obsahující 10 U/μl *Ssp* I restričního enzymu (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) a 2,5 μl restričního pufru. Reakční směs inkubovat v inkubačním termobloku při 37 °C po dobu 12 hodin. Vzorky vizualizovat v 2 % agarózovém gelu s přidáním ethidium-bromidu.

3.2.4.4 Genotypizace kryptosporidií - nested PCR s druhově specifickými primery

Na základě námi navržených druhově specifických primerů (Jeníková et al., 2011) pro detekci *C. suis* a *C. scrofarum* byly u DNA extrahované z trusu prasat provedeny nested PCR reakce pro amplifikaci SSU rRNA v celkovém objemu 20 μl (Tabulka 3 a 4). Reakční směs byla amplifikována v termocycleru (Little Genius, BIOER). Po počáteční denaturaci 94 °C 3 minuty, bylo provedeno 35 cyklů sestávajících v primární reakci z denaturace 94 °C po 45 s, annealingu 55 °C po 45 s a extenze 72 °C po 60 s, s finální extenzí 72 °C 7 minut. Cykly pro sekundární reakci byly totožné kromě annealingu - 62 °C po 45 s. Ke každé reakci byla přidána pozitivní (kontrolní DNA *C. suis* a *C. scrofarum*) a negativní kontrola (PCR voda). Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 2 μl primárního PCR produktu.

Chemikálie:

- deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP's, 10 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- 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 10mg/ml, Sigma-Aldrich, ČR)
- sekundární rodově specifické primery (10 μM, Generi Biotech, ČR)
- druhově specifické primery (10 μM, Generi Biotech, ČR)

Tabulka 3: Předpis reakce pro nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou ribosomální podjednotku kryptosporidií s použitím druhově specifických primerů

Reagencie	Koncentrace	Primární PCR (μl)	Sekundární PCR (μl)
H ₂ O		12,30	12,30
MgCl ₂	25 mM	1,20	1,20
10× buffer	1×	2,00	2,00
dNTP	10 mM	0,40	0,40
Primer - forward	10 μM	0,40	0,40
Primer - reverse	10 μM	0,40	0,40
BSA	10 mg/ml	0,80	0,80
Taq	1 U/1μl	0,50	0,50
DNA		2,00	2,00
Celkem		20	20

Tabulka 4: Druhově specifické primery pro nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou ribosomální podjednotku kryptosporidií (Jeníková et al., 2011)

Primární PCR (rodově specifické)	Sekvence
Cry F2	5′ - GGA AGG GTT GAT TTT ATT AGA TAA -3′
Cry R2	5′ - CTC ATA AGG TGC TAG AGG AGT A -3′
Sekundární PCR (druhově specifické)	Sekvence
<i>C. suis</i>	
suis 3F	5′ - CAT AAT AAC TTT ACG GAT CAC ATT TTT -3′
suis R	5′ - CTC AAA GTA AAA TTT CAT ATA CTA ATA AAA AT -3′
<i>C. scrofarum</i>	
pig genotype II 2F	5′ - GCG GAT CAC GTT ATG TGA CAT -3′
pig genotype II 2R	5′ - TTC CAC ATA CTG TAA AGT AAT GTG -3′

3.2.4.5 PCR - nested PCR diagnostika pro mikrosporidie

K detekci mikrosporidií ve vyšetřovaných vzorcích trusu byla použita již vyizolovaná DNA (viz. 3.2.4.1). Molekulární charakterizace izolátů mikrosporidií byla provedena metodou PCR. Všechny vzorky byly testovány na přítomnost specifické mikrosporidiové DNA. K amplifikaci byly použity primery uvedené v tabulkách 6 a 7. Reakce byly prováděny v celkovém objemu 25 μl (Tabulka 5). Amplifikace úseků templátové DNA proběhla v termocycleru (Little Genius, BIOER) v následujícím sledu: počáteční denaturace 94 °C 3 minuty, 35 cyklů - 94 °C denaturace DNA po 45 s; annealing 55 °C po 45 s; extenze 72 °C po 60 s, dosyntetizování nového řetězce při 72 °C po dobu

10 minut. Ke každé reakci byla přidána pozitivní (*E. intestinalis*, *E. bienersi* genotype D) a negativní kontrola (PCR voda). Pro sekundární amplifikaci byl použit produkt primární PCR. Všechny vzorky byly prováděny v duplikátu z důvodu reprodukovatelného záchytu.

Chemikálie:

- deionizovaná PCR H₂O (Top-Bio, ČR)
- MgCl₂ (25 mM, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP's, 10 mM roztok - 2,5 mM každé báze, Top-Bio, ČR)
- primery forward a reverse (10 μm, Generi Biotech, ČR)
- bovinní sérový albumin (BSA, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)
- Taq purple DNA polymeráza (1 U/μl, Top-Bio, ČR)

Tabulka 5: Předpis reakce pro nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou a velkou ribosomální podjednotku a ITS (internal transcribed spacer) mikrosporidií s použitím rodově specifických primerů

Reagencie	Koncentrace	Primární PCR (μl)	Sekundární PCR (μl)
H ₂ O		12,87	16,87
MgCl ₂	25 mM	1,50	1,50
10× buffer	1×	2,50	2,50
dNTP	10 mM	0,50	0,50
Primer - forward	10 μM	0,50	0,50
Primer - reverse	10 μM	0,50	0,50
BSA	10 mg/ml	1,00	-
Taq	1 U/1μl	0,63	0,63
DNA		5,00	2,00
Celkem:		25	25

Tabulka 6: Primery (~320 bp) pro nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou a velkou ribosomální podjednotku a ITS (internal transcribed spacer) *Encephalitozoon* spp. (Didier et al., 1995; Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996)

Primární PCR	Sekvence
int580f	5'- TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT -3'
int580r	5'- TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG -3'
Sekundární PCR	Sekvence
MSP3	5'- GGA ATT CAC ACC GCC CGT CVY TAT -3'
MSP4A	5'- CCA AGC TTA TGC TTA AGT YMA ARG GGT -3'

Tabulka 7: Primery (~390 bp) pro nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou a velkou ribosomální podjednotku a ITS (internal transcribed spacer) *Enterocytozoon bieneusi* (Buckhold et al., 2002)

Primární PCR	Sekvence
EBITS3	5'- GGT CAT AGG GAT GAA GAG -3'
EBITS4	5'- TTC GAG TTC TTT CGC GCT C -3'
Sekundární PCR	Sekvence
EBITS1	5'- GCT CTG AAT ATC TAT GGC T -3'
EBITS2.4	5'- ATC GCC GAC GGA TCC AAG TG -3'

3.2.4.6 Gelová elektroforéza

Velikost PCR fragmentů byla ověřována gelovou elektroforézou. Výsledný PCR produkt byl detekován v 2 % (kryptosporidie) a 1 % (mikrosporidie) agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu (0,2 µg/ml) a vizualizován pomocí UV záření o vlnové délce 302 nm.

Chemikálie:

- 50× TAE pufr (242 g tris báze; 457,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA)
- agaróza (Biotech, ČR)
- ethidium-bromid (Sigma-Aldrich, ČR)
- 100 bp DNA Ladder (O'Gene Ruler™, Biogen, ČR)

3.2.4.7 Sekvenování

Amplifikované fragmenty DNA byly vyříznuty, izolovány z gelu a obousměrně sekvenovány analyzérem ABI 3130 či ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA), aby byla potvrzena jejich identita. Sekvence byly upraveny pomocí programu ChromasPro verze 1.32 či BioEdit (verze 7.2.0.) (Technelysium, Queensland, Australia). Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank pomocí programu ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/> - version 2.0.12).

3.2.4.8 Fylogenetické analýzy

V případě mikrosporidiových infekcí byla evoluční historie odvozena získanými sekvencemi a analýzou distančními metodami (neighbor-joining method - metoda nejmenších čtverců) založenou na Kimura 2 parametrové distanci. Opakování bylo

provedeno 1000×. Fylogenetické stromy byly vytvořeny v programu TREECON verze 1.3b. Získané sekvence byly uloženy v GenBank pod ID: JQ804971-JQ804979.

3.3 Statistické zpracování výsledků

Výsledky jednotlivých studií byly statisticky vyhodnoceny pomocí chí-kvadrát testu a studentova t-testu pro vyhodnocení rozdílů v prevalenci výskytu a intenzitě infekce.

Dále byla použita metodika zobecněného lineárního modelu (generalized linear model, GLM) modelující pravděpodobnostní vztahy mezi výskytem *C. suis* a *C. scrofarum* (věk zvířat, věk selat při odstavu, použitá technologie chovu, intenzita infekce, výskyt průjmu).

Odchylky pro GLM byly použity pro identifikaci hlavních významných proměnných. Pravděpodobnost výskytu *Cryptosporidium* spp. závisí na příčinných proměnných, které byly vyjádřeny následujícím vztahem:

$$\hat{\pi}_i = \frac{\exp(\beta_1 \text{age}_i + \beta_2 \text{weaning}_i + \beta_3 \text{management}_i + \dots + \beta_5 \text{managment}_i)}{1 + \exp(\beta_1 \text{age}_i + \beta_2 \text{weaning}_i + \beta_3 \text{managment}_i + \dots + \beta_5 \text{managment}_i)}$$

Pravděpodobnost výskytu průjmu v závislosti na příčinných proměnných byla vyjádřena následovně:

$$\hat{\pi}_i = \frac{\exp(\beta_1 \text{age}_i + \beta_2 \text{weaning}_i + \beta_3 \text{managment}_i + \dots + \beta_5 \text{managment}_i + \beta_6 \text{infection intensity}_i + \beta_7 C. \text{ suis}_i + \beta_8 C. \text{ pig II}_i)}{1 + \exp(\beta_1 \text{age}_i + \beta_2 \text{weaning}_i + \beta_3 \text{managment}_i + \dots + \beta_5 \text{managment}_i + \beta_6 \text{infection intensity}_i + \beta_7 C. \text{ suis}_i + \beta_8 C. \text{ pig II}_i)}$$

U experimentálně infikovaných prasat byly kumulované hodnoty intenzity infekce vypočteny jako poměr plochy pod křivkou (AUC, area under the curve). Byl vypočten čas v době maximální intenzity infekce (t_{\max}) a maximální intenzita infekce (C_{\max}). Rozdíly v průběhu infekce mezi všemi skupinami experimentálně infikovaných zvířat byly testovány pomocí studentova t-testu. Bonferroniho korekce byla provedena vzhledem k mnohačetným srovnáním jednotlivých skupin zvířat v experimentu. Všechny statistické výpočty byly provedeny pomocí softwaru Statistica[®] 6.0, EpiInfo (TM), 3.5.3 (CDC, USA, Atlanta) a v programovacím prostředí R 2.15.0 (R Development Core Team, 2007).

4. VÝSLEDKY A SHRNU TÍ

4.1 Vliv zoohygieny a technologie chovu na výskyt kryptosporidiových infekcí v chovech prasat

Mezi roky 2009 a 2012 bylo na výskyt kryptosporidiových infekcí vyšetřeno celkem 1620 vzorků trusu komerčně chovaných prasat různých věkových kategorií (selata, odstav, předvýkrm, výkrm, prasnice) z 22 chovatelských zařízení České republiky [publikace III]. Dále bylo vyšetřeno 477 vzorků trusu prasnic a selat z vybraného zemědělského podniku pro testování hypotézy věkové specifity kryptosporidií prasat. Na vyzolované DNA těchto vzorků zároveň probíhalo testování nově navržených druhově specifických primerů k detekci porcinních kryptosporidií [publikace I]. Na získané poznatky z tohoto výzkumu navázala studie týkající se vnímavosti různých věkových kategorií prasat k infekci *C. scrofarum* [publikace VI]. Vzorky trusu byly vyšetřovány standardními parazitologickými a molekulárními metodami.

Výskyt a prevalence kryptosporidií v chovech prasat

Studie prováděné v chovech prasat jednoznačně ukázaly na velkou disproporci v zachytu kryptosporidiových infekcí pomocí mikroskopických technik ve srovnání se zachytem specifické kryptosporidiové DNA pomocí technik molekulárních. Bylo prokázáno, že mikroskopické techniky jsou minimálně 2× méně efektivní než molekulární diagnostika [publikace I a III]. Tyto závěry terénního výzkumu byly následně potvrzeny i v rámci experimentálních infekcí. Mikroskopicky bylo oproti PCR zachyceno v průměru o 7 - 12 % pozitivních vzorků méně v závislosti na věku zvířat [publikace VI].

Tyto závěry však lze aplikovat pouze ve vztahu ke kryptosporidiovým infekcím prasat. V případě jiného hostitele může být poměr v zachytnosti kryptosporidií v trusu odlišný.

V souladu s ostatními autory byla prokázána prevalence kryptosporidií v rozmezí 0,9 až 71,4 % v závislosti na věku zvířat [publikace III].

Námi navrženými druhově specifickými a standardními rodově specifickými primery byly identifikovány čtyři druhy kryptosporidií: *C. suis* v 224 případech, *C. scrofarum* v 208, *C. parvum* subtyp IIa A16G1R1b v jednom a *C. muris* ve 3 případech [publikace III]. Výsledky dosud nejrozsáhlejší studie ukázaly, že *C. suis* a *C. scrofarum* jsou

dominantními druhy infikující prasata a ostatní druhy kryptosporidií jsou detekovány jen v ojedinělých případech [publikace III].

Smíšené infekce různých druhů a genotypů kryptosporidií u domácích prasat

Na základě podrobného studia získaných výsledků, zejména velmi nízkého výskytu smíšených infekcí *C. suis* a *C. scrofarum*, byla vyslovena hypotéza o věkové specifičnosti těchto druhů kryptosporidií [publikace I]. Byly srovnány výsledky standardní rodově specifické PCR a RFLP s výsledky získanými pomocí setů druhově specifických primerů. Jako první jsme ukázali, že smíšené infekce *C. suis* a *C. scrofarum* se vyskytují s relativně vysokou frekvencí (2,1 - 18,2 %), tedy více než bylo dříve předpokládáno [publikace I a III].

Intenzita kryptosporidiových infekcí prasat

Na rozdíl od kryptosporidiových infekcí telat vyvolaných druhem *C. parvum*, byla prokázána velmi nízká intenzita vylučování oocyst *C. suis* i *C. scrofarum* v trusu jak přirozeně, tak i experimentálně infikovaných prasat [publikace I, III a VI]. Bylo zjištěno, že prasata infikovaná *C. suis* vylučují statisticky významně vyšší počet oocyst na gram trusu (OPG) (průměr 150 000 OPG) ve srovnání s monoinfekcemi *C. scrofarum* (průměr 35 000 OPG) [publikace I a III]. V případě experimentálních infekcí prasat *C. scrofarum* byla u vnímavých zvířat celkově zaznamenána nízká průměrná intenzita infekce (>6 000 OPG) [publikace VI].

Vliv odstavu na výskyt kryptosporidiových infekcí

Odstav mláďat představuje kritický moment v chovu zvířat a u prasat je navíc spojen s vývojem imunitního systému v období nutričních a environmentálních změn. Jako první jsme provedli analýzu dopadu různého věku odstavu na výskyt kryptosporidiových infekcí. Bylo zjištěno, že v případě odstavu selat ve 3. týdnu věku se dvojnásobně zvyšuje pravděpodobnost infekce druhem *C. scrofarum* v pozdějším věku prasat, oproti zvířatům odstavovaným ve 4. nebo 5. týdnu věku. V případě druhu *C. suis* nebyly zjištěny žádné korelace mezi jeho výskytem a věkem odstavu [publikace III].

Prevalence kryptosporidií v závislosti na technologii chovu

Byly testovány různé typy komerčních chovatelských zařízení s variabilními technologiemi chovu prasat. Rozdílný management a podmínky chovu významně ovlivňují výskyt nejrůznějších infekcí, včetně kryptosporidií. Z rozsáhlého výzkumu zaměřeného na tuto problematiku vyplynulo, že u prasat chovaných v podestýlkové technologii byla odhalena větší pravděpodobnost výskytu kryptosporidiových infekcí, než u prasat chovaných v systémech bezstelivových (betonové podlahy, celoroštové či částečně zaroštované podlahy). Zatímco v chovech využívajících roštovou technologii nebo chov na betonových podlahách byla prokázána promořenost zvířat od 7 do 13 %, v chovech s podestýlkou bylo infikováno 30 % jedinců. Komplexní výsledky a závěry výzkumu jsou součástí **publikace III**.

Klinické příznaky infekcí *C. suis* a *C. scrofarum* u prasat

Statistická analýza na vzorku 2097 jedinců neprokázala vztah mezi výskytem kryptosporidií a průjmovým onemocněním [**publikace I a III**]. Rovněž výsledky experimentálních infekcí prasat různého věku vyvolané *C. scrofarum* nepotvrdily souvislost mezi výskytem průjmu, kryptosporidiovými infekcemi a intenzitou jejich infekce [**publikace VI**].

4.2 Výskyt a prevalence kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí v populacích divokých prasat

Výzkum zaměřený na výskyt kryptosporidiových a mikrosporidiových infekcí evropských prasat divokých (*Sus scrofa*), unikátní tým, že se danou problematikou dosud takto podrobně a komplexně nikdo nezabýval, vyjma jediné publikace (García-Preledo et al., 2013), proběhl ve dvou fázích, a to jako pilotní studie v letech 2009 a 2010 na úrovni náhodně vybraných obor a revírů České republiky a v druhé fázi jako komplexní studie probíhající v letech 2011 a 2012 se zapojením zahraničních spolupracovníků s cílem popsat současný stav ve střední Evropě.

Výskyt a prevalence kryptosporidií u divokých prasat

Na rozdíl od domácích prasat byly oocysty kryptosporidií detekovány pomocí mikroskopické diagnostiky (barvené preparáty anilin-karbol-methylvioletí) v menším procentu vyšetřovaných vzorků. Rozdíl v záchytnosti mikroskopických a molekulárních

technik byl více než šestinásobný [**publikace II a IV**]. Celková prevalence kryptosporidií stanovená námi vyvinutou technikou za použití druhově specifických primerů [**publikace I**] se pohybovala v rozmezí od 5 do 35 %. Stejně jako u domácích prasat byly smíšené infekce relativně časté [**publikace II a IV**].

V porovnání s výsledky získanými z chovů domácích prasat, jak v rámci této studie, tak i prací jiných autorů, jsme neprokázali přítomnost jiných druhů kryptosporidií u divokých prasat, přestože by to bylo vzhledem k způsobu jejich obživy vysoce pravděpodobné [**publikace II a IV**].

Rovněž v případě dospělých jedinců černé zvěře bylo *C. scrofarum* označeno za dominantní druh kryptosporidie. Detailnější údaje o výzkumu jsou rozpracovány v **publikaci II**.

Intenzita kryptosporidiových infekcí divokých prasat

Ve všech případech byla detekována velmi nízká intenzita infekce, a to v rozsahu 500 až 1500 OPG [**publikace IV**].

Klinické příznaky infekcí *C. suis* a *C. scrofarum* u divokých prasat

Všechny vyšetřované vzorky trusu vykazovaly normální konzistenci, u žádného nebyl registrován průjem. Ačkoli se tato studie nezabývala výskytem *Cryptosporidium* spp. u všech věkových kategoriích černé zvěře, naše dosavadní výsledky jsou v souladu s našimi [**publikace I, III a VI**] i jinými studiemi, které neprokázaly souvislost mezi kryptosporidiovými infekcemi prasat a klinickým onemocněním. Kompletní výsledky k příslušné problematice jsou uveřejněny v **publikaci IV**.

Výskyt a prevalence mikrosporidií u divokých prasat

Mikrosporidie *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon* spp. jsou ubikvitárně rozšířené s širokým hostitelským spektrem. Tato práce přináší vůbec první poznatky o diverzitě mikrosporidií u divokých prasat. Za dominantní druh mikrosporidie byl na základě našich výsledků označen *E. bieneusi* nalezený u 8 % zvířat. V rámci rodu *Encephalitozoon* jsme detekovali pouze *Encephalitozoon cuniculi* s průměrnou prevalencí 4,5 %.

Byly pozorovány rozdíly ve výskytu infekcí v závislosti na lokalitě (4 - 60 %), nicméně vzhledem k migrační schopnosti divokých prasat a absenci dalších dat nebylo možné provést statistické vyhodnocení.

Na základě sekvenací ITS lokusu (internal transcribed spacer) byly detekovány 2 genotypy *E. cuniculi* (genotyp I a II) a jedenáct, z toho šest nových, genotypů *E. bieneusi*, (D, EbpA, EbpC, G, Henan-I, + nové genotypy WildBoar1-6). Genotypy D, EbpA, EbpB a G se vyskytovaly velmi často. Ostatní známé i nové genotypy (Henan-I, WildBoar1-6) byly nalezeny ojediněle. Vzhledem k tomu, že o biologii těchto nových genotypů nejsou žádné informace, nelze činit závěry ohledně jejich hostitelské specificity pro divoká prasata a prasata obecně.

Dosud nejkomplexnější pojednání o mikrosporidiových infekcích u černé zvěře je shrnuto v **publikaci V**.

4.3 Porovnání výsledků získaných z chovů prasat domácích s výsledky získanými u volně žijících prasat divokých

Na základě výše uvedených výsledků lze konstatovat, že prevalence kryptosporidií v chovech domácích prasat je výrazně vyšší v porovnání s divokými prasaty. Nicméně oproti jiným druhům hospodářských zvířat - např. skot - je promořenost prasat obecně nižší. Jak u domácích, tak i u divokých prasat je u dospělých zvířat dominantním druhem *C. scrofarum*. Ani u domácích, ani u volně žijících (divokých) prasat nebyl prokázán vztah mezi kryptosporidiovou infekcí a průjmy. Taktéž intenzity infekcí u obou populací prasat jsou přibližně shodné, tedy velmi nízké.

4.4 Charakteristika věkové a hostitelské specificity kryptosporidií prasat

Obě specifické porcinní kryptosporidie (*C. suis* a *C. scrofarum*) byly popsány u širokého věkového rozpětí domácích prasat. Náš výzkum, který se věnoval věkové a hostitelské specificitě kryptosporidií domácích prasat, přinesl výsledky, jež prokázaly rozdíly ve vnímavosti prasat ke kryptosporidiovým infekcím v závislosti na věku zvířat [**publikace I a III**].

V rámci sledování populace domácích prasat (n = 2097) bylo zjištěno, že druh *C. scrofarum* nebyl nikdy detekován u selat mladších pěti týdnů věku. Tento druh byl poprvé detekován u šesti týdenních selat a současně s tím byly poprvé nalezeny smíšené

infekce *C. suis* a *C. scrofarum*. Tyto výsledky nás vedly k provedení experimentální infekce s cílem zjistit minimální věk selat nutný pro vnímavost k infekci *C. scrofarum*. Na základě infekčního pokusu bylo jednoznačně prokázáno, že selata mladší 4 týdnů věku nejsou vnímavá k infekci *C. scrofarum*, zatímco u selat infikovaných ve věku 5, 6, 7 a 8 týdnů byla experimentální infekce navozena. Prepatentní periodě 8 dnů u pěti týdenních selat odpovídá detekce oocyst *C. scrofarum* v trusu 6 týdenních selat v rámci terénního sledování. Nebyly zjištěny žádné rozdíly ani v intenzitě ani v průběhu infekce v závislosti na věku zvířat. Podrobnější přiblížení tohoto výzkumu pojednávajícím o experimentálně získaných výsledcích, které podporují hypotézu, že vnímavost prasat k infekcím *C. scrofarum* je ovlivněna věkem hostitele, je součástí **publikace VI.**

5. ZÁVĚRY

- *Cryptosporidium suis* a *Cryptosporidium scrofarum* jsou specifické druhy kryptosporidií infikující domácí i divoká prasata.
- *Cryptosporidium scrofarum* je dominantním druhem kryptosporidie u dospělých domácích i divokých prasat.
- Divoká prasata jsou promořena kryptosporidii méně než prasata domácí.
- Byla navržena nová metoda pro detekci smíšených infekcí *C. suis* a *C. scrofarum*, přičemž bylo prokázáno, že smíšené infekce zmíněných druhů se vyskytují s relativně vysokou četností.
- Byl prokázán negativní vliv stlaných technologií na výskyt *C. scrofarum* u prasat.
- Byla potvrzena věková specificita *C. scrofarum*; selata mladší 4 týdnů nejsou k infekci vnímavá.
- Intenzita infekce *C. suis* je u selat 250× vyšší než u dospělých prasat.
- Intenzita infekce *C. suis* a *C. scrofarum* u dospělých prasat je na hranici detekovatelnosti mikroskopickými metodami (>2 000 OPG).
- Kryptosporidiové infekce prasat nejsou spojeny s klinickými příznaky onemocnění.
- Selata odstavená ve věku 2 týdnů jsou vystavena 2× vyššímu riziku infekce *C. scrofarum* než zvířata odstavovaná v pozdějším věku.
- Nebyl prokázán vliv odstavu na výskyt *C. suis* u dospělých prasat.
- *Cryptosporidium suis* a *C. scrofarum* nepředstavují významné zdravotní riziko pro veřejné zdraví obyvatelstva.
- Divoká prasata jsou hostitelé jak *Enterocytozoon bieneusi*, tak *Encephalitozoon cuniculi*.
- Bylo detekováno 6 nových genotypů *E. bieneusi* s nejasnou hostitelskou specificitou.

6. PŘEHLED AUTOROVÝCH PUBLIKACÍ

- I. Jeníková, M., **Němejc, K.**, Sak, B., Květoňová, D., Kváč, M., 2011. New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. *Veterinary Parasitology* 176, 120-125.
- II. **Němejc, K.**, Sak, B., Květoňová, D., Hanzal, V., Jeníková, M., Kváč, M., 2012. The first report on *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) (Czech Republic). *Veterinary Parasitology* 184, 122-125.
- III. **Němejc, K.**, Sak, B., Květoňová, D., Kernerová, N., Rost, M., Cama, V.A., Kváč, M., 2013a. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitology Research* 112, 1143-1154.
- IV. **Němejc, K.**, Sak, B., Květoňová, D., Hanzal, V., Janiszewski, P., Forejtek, P., Rajský, D., Ravaszová, P., McEvoy, J., Kváč, M., 2013b. *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) in Central Europe. *Veterinary Parasitology* 197, 504-508.
- V. **Němejc, K.**, Sak, B., Květoňová, D., Hanzal, V., Janiszewski, P., Forejtek, P., Rajský, D., Kotková, M., Ravaszová, P., McEvoy, J., Kváč, M., 2014. Prevalence and diversity of *Encephalitozoon* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in wild boars (*Sus scrofa*) in Central Europe. *Parasitology Research* 113, 761-767.
- VI. Kváč, M., **Němejc, K.**, Kestránová, M., Květoňová, D., Wagnerová, P., Kotková, M., Rost, M., Samková, E., McEvoy, J., Sak, B., 2014. Age related susceptibility of pigs to *Cryptosporidium scrofarum* infection. *Veterinary Parasitology* - akceptováno 10.02.2014, v tisku.

7. REFERENCE

- [1] Arrowood M.J., Sterling C.R. (1987): Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.* 73: 314-319.
- [2] Bergeland M.E. (1977): Necrotic enteritis in nursing piglets. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.* 20: 151-158.
- [3] Boes J., Willingham A.L., Shi F.H., Hu X.G., Eriksen L., Nansen P., Stewart T.B. (2000): Prevalence and distribution of pig helminthes in the Dongting Lake Region (Hunan Province) of the People's Republic of China. *J. Helminthol.* 74: 45-52.
- [4] Bornay-Llinares F.J., Da Silva A.J., Moura H., Schwartz D.A., Visvesvara G.S., Pieniazek N.J., Cruz-Lopez A., Hernandez-Jaurequi P., Guerrero J., Enrique F.J. (1998): Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *J. Infect. Dis.* 178: 820-826.
- [5] Breitenmoser A.C., Mathis A., Burgi E., Weber R., Deplazes P. (1999): High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. *Parasitology* 118: 447-453.
- [6] Buckholt M.A., Lee J.H., Tzipori S. (2002): Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at slaughterhouse in Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2595-2599.
- [7] Castro-Hermida J.A., García-Preledo I., González-Warleta M., Mezo M. (2011): Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain). *Vet. Parasitol.* 179: 216-219.
- [8] Český statistický úřad (2012): Analýza spotřeby potravin v roce 2010. pp. 2-9.
- [9] Da Silva A.J., Slemenda S.B., Visvesvara G.S., Schwartz D.A., Mel Wilcox C., Wallace S., Pieniazek N.J. (1997): Detection of *Septata intestinalis* (Microsporidia), Cali et al. (Eds.). 1993, using polymerase chain reaction primers targeting the small subunit ribosomal RNA coding region. *Mol. Diagn.* 2: 47-52.
- [10] Dengjel B., Zahler M., Hermanns W., Heinritzi K., Spillmann T., Thomschke A., Loscher T., Gothe R., Rinder H. (2001): Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4495-4499.

- [11] Deplazes P., Mathis A., Muller C., Weber R. (1996): Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. J. Eukaryot. Microbiol. 43: S93.
- [12] Didier E.S., Stovall M.E., Green L.C., Brindley P.J., Sestak K., Didier P.J. (2004): Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Vet. Parasitol. 126: 145-166.
- [13] Didier E.S., Vossbrinck C.R., Baker M.D., Rogers L.B., Bertucci D.C., Shadduck J.A. (1995): Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology 111: 411-421.
- [14] Didier E.S., Weiss L.M. (2006): Microsporidiosis: current status. Curr. Opin. Infect. Dis. 19: 485-492.
- [15] Dorny P., Praet N., Deckers N., Gabriel S. (2009): Emerging food-borne parasites. Vet. Parasitol. 163: 196-206.
- [16] Fayer R., Ungar B.L. (1986): *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. Microbiol. Rev. 50: 458-483.
- [17] García-Preledo I., Pedraza-Díaz S., González-Warleta M., Mezo M., Gómez-Bautista M., Ortega-Mora L.M., Castro-Hermida J.A. (2013): Presence of *Cryptosporidium scrofarum*, *C. suis* and *C. parvum* subtypes IIAA16G2R1 and IIAA13G1R1 in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*). Vet. Parasitol. 196: 497-502.
- [18] Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., et al. (2007): A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol. Res. 111: 509-547.
- [19] Chroust K. (2001): Parazitární choroby spárkaté zvěře - Supplementum No. I. Myslivecké listy: pp. 2-3.
- [20] Izumiyama S., Furukawa I., Kuroki T., Yamai S., Sugiyama H., Yagita K., Endo T. (2001): Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 54: 23-26.
- [21] Jeníková M., Němejc K., Sak B., Květoňová D., Kváč M. (2011): New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. Vet. Parasitol. 176: 2-3.

- [22] Jeong D.K., Won G.Y., Park B.K., Hur J., You J.Y., Kang S.J., Oh I.G., Lee Y.S., Stein B.D., Lee J.H. (2007): Occurrence and genotypic characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs with diarrhoea. *Parasitol. Res.* 102: 123-128.
- [23] Jiang J., Alderisio K.A., Xiao L. (2005): Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4446-4454.
- [24] Kahler A.M., Thurston-Enriquez J.A. (2007): Human pathogenic microsporidia detection in agricultural samples: method development and assessment. *Parasitol. Res.* 100: 529-538.
- [25] Katzwinkel-Wladarsch S., Lieb M., Helse W., Loscher T., Rinder H. (1996): Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health* 1: 373-378.
- [26] Kilani R.T., Sekla L. (1987): Purification of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites by cesium chloride and Percoll gradients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 505-508.
- [27] Koudela B., Vítovec J., Dat D.T., Lan P.D. (1986): Preliminary communication on cryptosporidiosis of pigs in Vietnam. *Folia Parasitol.* 33: 301-304.
- [28] Kváč M., Kestránová M., Pinková M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková, M. Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B. (2013): *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet. Parasitol.* 191: 218-227.
- [29] Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. (2007): Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 143: 229-233.
- [30] Mølbak K., Aaby P., Højling N., Da Silva A.J. (1994): Risk factors for *Cryptosporidium* diarrhea in early childhood: a case - control study from Guinea-Bissau, West Africa. *Am. J. Epidemiol.* 139: 734-740.
- [31] Macpherson C.N. (2005): Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35: 1319-1331.
- [32] Miláček P., Vítovec J. (1985): Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scraping of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32: 50.

- [33] 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.
- [34] Nentvichová M. (2011): A co dál s černou zvěří? *Myslivost* 59: 109.
- [35] Poltársky J., Ochodnický D. (2003): Ovce, kozy a prasata. *Príroda*, Bratislava, pp. 4-5.
- [36] Quílez J., Sánchez-Acedo C., Clave A., Del Cacho E., López-Bernard F. (1996): Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 56: 345-348.
- [37] Rinder H., Thomschke A., Dengjel B., Gothe R., Loschner T., Zahler M. (2000): Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. *J. Parasitol.* 86: 185-188.
- [38] 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.
- [39] Ryan U.M., Samarasinghe B., Read C., Buddle J.R., Robertson I.D., Thompson R.C. (2003): Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3970-3974.
- [40] 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.
- [41] Sauch J.F., Flanigan D., Galvin M.L., Berman D., Jakubowski W. (1991): Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3243-3247.
- [42] Straková J., Ševčík B. (2002): Použití přípravku CERMIX premix ad usum vet. u divokých prasat. *Myslivost* 50: 3.
- [43] Weber R., Bryan R.T., Schwarz D.A., Owen R.L. (1994): Human microsporidial infections. *J. Clin. Microbiol.* 7: 426-461.
- [44] Wieler L.H., Ilieff 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.

- [45] Wittner M. (1999): Historic perspectives on the microsporidia: expanding horizons. In: The microsporidia and microsporidiosis. Wittner M., Weiss L. (Eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D.C., pp. 1-6.
- [46] Xiao L. (2009): Overview of *Cryptosporidium* presentations: IWOP-10 2008. Eukaryot. Cell 8: 429-436.
- [47] Xiao L., Escalante L., Yang C., Sulaiman I., Escalante A.A., Montali R.J., Fayer R., Lal A.A. (1999): Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1578-1583.
- [48] Xiao L., Fayer R. (2008): Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. Int. J. Parasitol. 38: 1239-1255.
- [49] 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.
- [50] Zbořil J. (2013): Černá zvěř ...fenomén 21. století. Myslivost 61: 6.