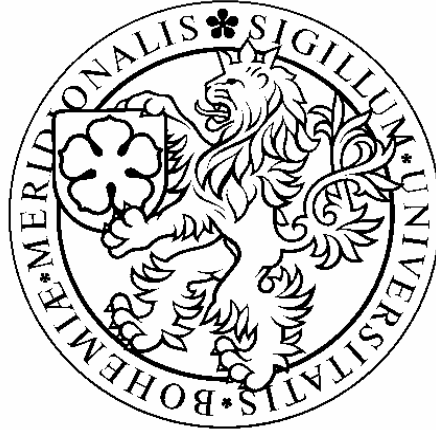


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Biologická fakulta



Bakalářská práce

**Výskyt kryptosporidií u exotických zvířat
chovaných v zoologických zahradách**

Alena Kodádková

Školitel: doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Školitel specialista: Ing. Martin Kváč, Ph.D.

České Budějovice, 2007

Kodádková A., 2007: Výskyt kryptosporidií u exotických zvířat chovaných v zoologických zahradách [Occurrence of cryptosporidia in exotic mammals kept in zoological gardens]. 27 pp., University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Biological Sciences, Czech Republic.

Annotation:

A total of 331 faecal samples of 102 exotic mammalian species were collected in four zoological gardens in the Czech Republic and examined for *Cryptosporidium* spp. oocysts by staining method, immunofluorescent assay for detection of cryptosporidia and PCR of the SSU rRNA loci. In this study, the prevalence of these parasites was found to be low. *Cryptosporidium* sp. was found only in a reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). Sequence analysis identified our isolate with *C. muris* genotype previously found in rock hyrax (*Procavia capensis*) and bactrian camel (*Camelus bactrianus*). Our *Cryptosporidium* isolate was not infectious for neonatal and adult mice BALB/c.

Prohlašuji, že jsem uvedenou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím 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, Biologickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 9. května 2007

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala mému školiteli Olegu Ditrichovi a školiteli specialistovi Martinu Kváčovi za obětavé vedení práce a cenné rady při jejím psaní. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Laboratoře oportunních parazitů. Mé poděkování patří i pracovníkům zoologických zahrad ve Dvoře Králové, Hluboké nad Vltavou, Praze a Plzni.

Tato práce byla finančně podpořena grantovými projekty GAČR č. 524/005/0992 a č. 523/07/P117.

1. Úvod	1
1.1. Biologie kryptosporidií	1
1.2. Kryptosporidie v zoologických zahradách	4
2. Cíle práce	7
3. Materiál a metodika	8
3.1. Materiál	8
3.2. Metodika.....	8
3.2.1. Diagnostika oocyst kryptosporidií	8
3.2.2. Čištění kryptosporidií na sacharózovém gradientu	9
3.2.3. Přímý imunofluorescenční test.....	10
3.2.4. Izolace DNA.....	10
3.2.5. PCR	11
3.2.6. Gelová elektroforéza	12
3.2.7. Příprava vzorků na sekvenaci a sekvenace	13
3.2.8. Experimentální infekce	14
4. Výsledky	15
5. Diskuze	19
6. Literatura	22

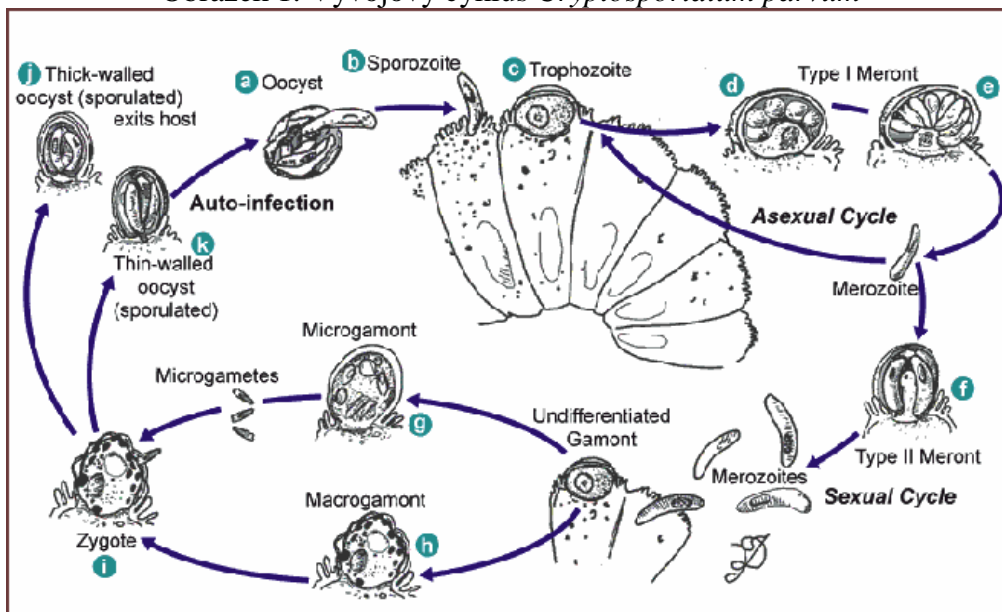
1. Úvod

1.1. Biologie kryptosporidií

Kryptosporidie (rod *Cryptosporidium*) jsou jednobuněční obligatorní paraziti považovaní za jednu z bazálních linií kmene Apicomplexa. Původně byly kryptosporidie řazeny do jedné z čeledí třídy Coccidea (Corliss 1994, Fayer et al. 1997). Podle současných poznatků jsou příbuzné gregarinám (Carreno et al. 1999). S těmi je pojí nepřítomnost plastidového genomu (Zhu et al. 2000), antigenní příbuznost zjištěná pomocí reakce monoklonálních protilátek (Bull et al. 1998) a podobnost některých stádií vývojového cyklu (Hijawi et al. 2001).

Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní (obrázek 1; Fayer et al. 1997, Thompson et al. 2005). Celý cyklus probíhá v gastrointestinálním traktu hostitele (Current et Blagburn 1990). Spolknuté případně inhalované oocysty v hostiteli excystují. Proteolytické enzymy (serinové a cysteinové endopeptidázy, aminopeptidázy) degradují suturu (Chappell et al. 2003). Z oocysty se posléze uvolní infekční stádia - sporozoiti, kteří adherují k hostitelským buňkám. Na rozdíl od kokcií (Ortega et al. 1997) se nezanořují do cytoplazmy, ale zůstávají inkorporovány intracelulárně extracytoplazmaticky. Sporozoiti se mění na trofozoity uzavřené v parazitoforní vakuole v enterocytech mikroklků (Elliott et al. 2001). Jádro trofozoita se dělí a dochází k asexuálnímu množení - merogonii. U druhu *C. parvum* existují dva typy merontů: meront typu I (vytváří 8 merozoitů) a typu II (vytváří 4 merozoity). Merozoiti z meronta typu I se dále množí asexuálně, zatímco merozoiti z meronta typu II vstupují do sexuální fáze - gametogonie. Merozoiti typu II napadají hostitelské buňky, ve kterých se transformují v pohlavní stádia - jednojaderné mikrogamonty a vícejaderné mikrogamonty. Obě pohlavní stádia vytvářejí samostatné makrogametocyty a mikrogametocyty. Z mikrogametocytu se uvolňují pohyblivé mikrogamety, které oplodní makrogametocyt, splynutím vznikne zygota. Během endogenní sporulace vznikají ze zygoty dva typy oocyst - silnostěnné a tenkostěnné. Z celkového počtu oocyst tvoří 80 % silnostěnné oocysty (charakteristické dvojitou membránou), které opouštějí tělo hostitele se stolicí (popř. sekrety dýchacích cest) a slouží k přenosu infekce na další vnímavé hostitele. Tenkostěnné oocysty excystují ještě v těle hostitele a infikují další buňky v trávicím traktu (Current 1988).

Obrázek 1. Vývojový cyklus *Cryptosporidium parvum*



ilustrace Kip Carter, reprint Current et Blagburn (1990) p. 159, CRC Press

Od nalezení prvního druhu rodu *Cryptosporidium* (*C. muris*, Tyzzer 1910) bylo popsáno značné množství druhů kryptosporidií infikujících široké spektrum hostitelů. Vzhledem k tomu, že byly kryptosporidie taxonomicky řazeny mezi kokcidie, předpokládala se i u nich striktní hostitelská specifita. Na základě úspěšných mezidruhových infekcí bylo mnoho druhů prohlášeno za neplatné.

Taxonomie je však nejednotná, stále chybí všeobecně přijímaný konsensus, řada autorů se rozchází v pojetí jednotlivých druhů. V tabulce 1 je uveden přehled druhů platných dle Thompsona et al. (2005) doplněný o druh *C. bovis* (Fayer et al. 2005). V rámci rodu *Cryptosporidium* se u některých genotypů předpokládá přejmenování na nový druh (*C. pestis*, Šlapeta 2006). Recentně bylo popsáno větší množství dalších druhů, popisy jsou často nekompletní, chybějí klíčové znaky, včetně molekulární analýzy a stanovení lokalizace v hostiteli apod. (např. *C. nasorum* Hoover et al., 1981). Protože různými autory nejsou tyto popisy z výše uvedených důvodů akceptovány, nebyly do přehledu zahrnuty.

V rámci rodu *Cryptosporidium* lze odlišit dvě monofyletické linie - žaludeční a střevní kryptosporidie (Xiao et al. 2004). Střevní kryptosporidie mají menší kulaté oocysty (např. *C. parvum* $5 \times 4,5 \mu\text{m}$; Tyzzer 1912), kdežto žaludeční druhy mají oocysty větší a oválné (např. *C. andersoni* $7,4 \times 5,5 \mu\text{m}$; Lindsay et al. 2000).

Tabulka 1. Přehled platných druhů rodu *Cryptosporidium*
(podle Fayer et al. 2005, Thompson et al. 2005)

Druh	Typický hostitel	Lokalizace
<i>C. andersoni</i> Lindsay et al., 2000	skot	slez
<i>C. baileyi</i> Current et al., 1986	drůbež	bursa
<i>C. bovis</i> Fayer et al., 2005	skot	není známa
<i>C. canis</i> Fayer et al., 2001	psi	tenké střevo
<i>C. felis</i> Iseki, 1979	kočky	tenké střevo
<i>C. hominis</i> Morgan-Ryan et al., 2002	člověk	tenké střevo
<i>C. galli</i> Pavlásek, 1999	ptáci	žláznatý žaludek
<i>C. meleagridis</i> Slavin, 1955	ptáci	tenké střevo
<i>C. molnari</i> Alvarez-Pellitero et Sitjá-Bobadilla, 2002	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. muris</i> Tyzzer, 1910	hlodavci	žaludek
<i>C. parvum</i> Tyzzer, 1912	savci	tenké střevo
<i>C. saurophilum</i> Koudela et Modrý, 1998	ještěrky	žaludek, tenké střevo
<i>C. serpentis</i> Levine, 1980	plazi	žaludek
<i>C. suis</i> Ryan et al., 2004	prasata	žaludek, tlusté střevo
<i>C. wrairi</i> Vetterling et al., 1971	křečci	tenké střevo

Kryptosporidióza postihuje nejčastěji savce (včetně člověka, hospodářských a domácích zvířat) v menší míře ptáky, plazy a ryby. Infekce může být způsobena jedním nebo více druhy kryptosporidií současně (Torres et al. 2000).

Klinické projevy kryptosporidiózy u imunokompetentních jedinců se liší dle lokalizace v hostiteli a podle druhu kryptosporidie. U většiny střevních druhů (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis*, *C. canis* atd.), které jsou lokalizovány převážně v tenkém střevě, je průvodním znakem onemocnění vodnatý průjem. Dalšími příznaky mohou být křeče v břiše, zvracení, mírně zvýšená teplota, nevolnost, slabost, únava, nechutenství, zimnice a zvýšené pocení (Fayer 2003). U neonatálních zvířat mohou být střevní druhy příčinou mortality (O'Donoghue 1995). U střevních druhů kryptosporidií, jako je *C. suis*, s lokalizací v tlustém střevě probíhá kryptosporidióza často bez typických symptomů (Vítovec et al. 2006). Kryptosporidióza způsobená žaludečními druhy má ve většině případů asymptomatický průběh, pouze v několika případech byly popsány klinické příznaky spojené s anorexií a úbytkem hmotnosti (Anderson 1987, Pospischil et al. 1987).

U imunodeficitních jedinců je průběh kryptosporidiózy odlišný. Onemocnění je chronické, často diseminuje do dalších orgánů (celý gastrointestinální trakt, močový měchýř, žlučovody, slinivka, dýchací trakt; Fayer et al. 1997). Průběh onemocnění závisí na stupni imunodeficiency, u AIDS pacientů je rozhodujícím faktorem množství CD4+ lymfocytů (Flanigan et al. 1992).

Hostitelská specifita a od ní se odvíjející možnost přenosu z jednoho hostitelského druhu na jiný patří mezi významné epidemiologické faktory. Přenos kryptosporidií může probíhat přímým kontaktem mezi hostiteli, požitím kontaminované vody nebo jídla nebo pomocí kontaminativního přenosu (členovci a ptáci). Jedním z nejdůležitějších zdrojů kryptosporidiových infekcí jsou vodní zdroje znečištěné trusem nebo stolicí (Fayer et al. 2000a).

1.2. Kryptosporidie v zoologických zahradách

V zoologických zahradách je chováno široké spektrum druhů exotických zvířat, které jsou potenciálními hostiteli různých druhů rodu *Cryptosporidium*. Zvířata navíc často pochází z epidemiologicky neprozkoumaných oblastí a u většiny z nich není známa vnímavost ke kryptosporidiovým infekcím. Díky častým výměnám chovných zvířat mezi jednotlivými ZOO (Košťál et al. 2004) může docházet k přenosu kryptosporidiózy i na další jedince téhož ale i jiných druhů (Appelbee et al. 2005). Mezi potenciálními hostiteli patří, vzhledem k relativně úzkému kontaktu s nakaženými zvířaty, i ošetřovatelé.

Zoologické zahrady poskytují velké množství dobře dostupného materiálu ke studiu hostitelského spektra a přenosu mezi hostiteli. Díky velkému množství chovaných druhů jsou popisovány nové genotypy kryptosporidií (Ryan et al. 2003). I přes možný přenos kryptosporidií z exotických zvířat na člověka jsou však detailní vyšetření kryptosporidiózy v ZOO spíše výjimkou. Vzhledem k zaměření bakalářské práce se v následující rešerši blíže zabývám především lichokopytníky, sudokopytníky, hlodavci, chobotnatci a damany.

Detailnější studie byly prováděny pouze v ZOO v Barceloně, Lisabonu, Osace a Poznani (Majewska et al. 1997, Gómez et al. 2000, Delgado et al. 2003, Matsubayashi et al. 2005). V několika dalších případech byly publikovány pouze ojedinělé nálezy (Cranfield et al. 1984, Pospischil et al. 1987).

V zoologické zahradě v Torontu byli vyšetřováni volně žijící mývalové severní (*Prycyon lotor*), u kterých byla zjištěna střevní kryptosporidióza bez bližšího určení druhu, přenos na chovaná zvířata však studován nebyl (Cranfield et al. 1984). V mnichovské ZOO byla popsána žaludeční kryptosporidióza u čtyř gazel atlaských (*Gazella curvieri*) (Pospischil et al. 1987). V České republice byl u sluky lesní (*Scolopax rusticola*) z pražské ZOO popsán nový genotyp (Ryan et al. 2003).

Nejvíce údajů o kryptosporidiových infekcích v ZOO pochází z Evropy. V poznaňské ZOO bylo vyšetřeno pomocí 3 druhů barvení (barvení dle Ziehl-Neelsena, modifikovaného Kinyounovo barvení a barvení safranin-metylenovou modří) a imunoenzymatické metody celkem 66 vzorků trusu ze savců (primáti, chobotnatci, lichokopytníci a sudokopytníci). Kryptosporidie byly nalezeny u 6 asymptomatických jedinců: dva druhy primátů a tři druhy kopytníků (nosorožec tuponosý *Ceratotherium simum*, jelen lyrorohý *Cervus eldi*, jelen bělohubý *Cervus albirostris*) a slon indický (*Elephas maximus*) (Majewska et al. 1997).

V barcelonské ZOO bylo prováděno dlouhodobější sledování výskytu kryptosporidií. Během sledovaného období prevalence vyšetřovaných zvířat stoupala. První studie se zabývala výhradně primáty (Gómez et al. 1992). Další studie byla zaměřena na šelmy, sudokopytníky a lichokopytníky. Kryptosporidie byly zjištěny pouze u pěti druhů kopytníků (pakůň žíhaný *Connochaetes taurinus taurinus*, gazela dorcas *Gazella dorcas*, voduška znamenáná *Kobus ellipsiprymmus*, buvol kaferský *Syncerus caffer*, žirafa kapská *Giraffa camelopardalis* a nosorožce tuponosého *Ceratotherium s. simum*). Diagnostika kryptosporidií byla prováděna pouze na základě velikosti oocyst, z níž autoři usoudili, že infekce většiny zvířat byla způsobena druhem *C. parvum*, pouze u nosorožce tuponosého se pravděpodobně jednalo o druh *C. muris* (Gómez et al. 1996). V následujících letech byl soubor vyšetřovaných zvířat rozšířen na 21 druhů primátů a 36 druhů velkých býložravých obratlovců. Kryptosporidie byly nalezeny u 14 druhů primátů, 20 druhů sudokopytníků (antilopa jelenní *Antilope cervicapra*, guanako *Lama guanicoe*, pakůň modrý *Connochaetes t. taurinus*, sambar indický *Crotalus unicolor*, žirafa *Giraffa camelopardalis*, wapity východní *Cervus elaphus canadiensis*, bongo *Tragelaphus eurycerus*, velbloud jednohrbý *Camelus dromedarius*, velbloud dvouhrbý *Camelus bactrianus*, hrošík liberijský *Hexaprotodon liberensis*, gaur *Bos taurus frontalis*, nilgau pestrý *Bosephalus tragocamelus*, zubr evropský *Bison bonasus*, bizon *Bison bison*, gazela dorcas *Gazella dorcas*, anoa nížinný *Bubalus depressicornis*, oryx jihoafrický *Oryx damaah*, muflon *Ovis musimon*, pekari páskovaný *Tayassu tajacu*, daňek evropský *Dama dama*), 2 druhů lichokopytníků (tapír jihoamerický *Tapirus terrestris*, nosorožec tuponosý *Ceratotherium s. simum*) a u slona afrického (*Loxodonta africana*). K druhovému určení kryptosporidií byla, stejně jako v předchozí práci, použita výhradně morfometrie oocyst. Všechny nalezené kryptosporidie byly označeny jako *C. parvum* (Gómez et al. 2000). V poslední studii z barcelonské ZOO bylo parazitologické vyšetření na kryptosporidie prováděno třikrát do měsíce po dobu jednoho roku (Gracenea et al. 2002). Z diagnostických metod bylo použito barvení Henriksen a Pohlenz a IF test. Celkem 10 druhů kopytníků (pakůň modrý *Connochaetes taurinus*, velbloud dvouhrbý *Camelus bactrianus*,

velbloud jednohrbý *Camelus dromedarius*, žirafa *Giraffa camelopardalis*, antilopa losí *Taurotragus oryx*, daněk evropský *Dama dama*, wapity východní *Cervus elaphus canadiensis*, jelen indický *Axis axis*, oryx jihoafrický *Oryx dammah* a nosorožec tuponosý *Ceratotherium s. simum*) bylo pozitivních na kryptosporidie. Nejvyšší počet pozitivních jedinců byl zjištěn během zimy (35 pozitivních vzorků v zimě oproti 21 v létě).

V zoologické zahradě v Lisabonu bylo v první studii na kryptosporidie vyšetřeno 34 druhů přežvýkavců. Diagnostickými metodami bylo barvení podle Ziehl-Neelsova, IF test a ELISA. Vzorky trusu byly odebírány jednou měsíčně po dobu jednoho roku. Celkem bylo zjištěno 9 druhů pozitivních sudokopytníků (jelen lyrorohý *Cervus eldii*, bizon prérijní *Bison bison bison*, bongo *Tragelaphus eurycerus isaaci*, kudu velký *Tragelaphus s. strepsiceros*, adax nubijský *Addax nasomaculatus*, buvolec pestrý *Damaliscus dorcas*, paovce hřívnatá *Ammotragus lervia*, oryx jihoafrický *Oryx gazella* a přímorožec arabský *Oryx leucoryx*). Čtyři mláďata (dva adaxové nubijský *Addax nasomaculatus* a dva oryxové jihoafričtí *Oryx gazella*) na kryptosporidiózu uhynula (Delgado et al. 2003). Ve stejné ZOO popsali Alves et al. (2003) na základě molekulární analýzy získaných izolátů výskyt *C. parvum* bovinního genotypu u přežvýkavců. V další práci se Alves et al. (2005) zabývali výskytem kryptosporidií u 100 druhů savců a 28 druhů plazů. Oocysty kryptosporidií byly nalezeny u dvou druhů savců (pakůň běloocasý *Connochaetes gnou*, bizon *Bison bison*) a jedné želvy hvězdnaté (*Geochelone pardalis*). Izolát z bizona amerického byl totožný s *Cryptosporidium* myším genotypem a izolát z želvy hvězdnaté byl totožný s *Cryptosporidium* želvím genotypem. U pakoně byl nalezen dosud nepopsaný genotyp. U bizona amerického byly v lisabonské ZOO kryptosporidie zjištěny pouze jednou s nízkou intenzitou infekce. Autoři proto nevyklučují pasáž oocyst.

V zoologické zahradě v japonské Osace byla kryptosporidióza vyšetřována u 43 druhů savců a 43 druhů ptáků. Každý vzorek byl vyčištěn flotací na cukru a následně prohlížen za použití diferenciálního interferenčního kontrastu, dále byl použit IF test. Kryptosporidie byly detekovány pouze u psíka mývalovitěho (*Nyctereutes procyonoides*) (Matsubayashi et al. 2005).

2. Cíle práce

- zpracovat literární rešerši o tématu
- vyšetřit specifickými metodami soubor kopytníků a hlodavců chovaných v zoologických zahradách na kryptosporidie s cílem získat izoláty k dalšímu výzkumu
- pomocí analýzy významných genů zařadit vybrané izoláty do příslušných druhů a genotypů a pokusit se dát výsledky do souvislosti se současnými představami o druhové diverzitě i epidemiologii kryptosporidiózy
- posoudit roli exotických zvířat jako zdroje kryptosporidií infikujících hospodářská zvířata a imunodeficitní pacienty

3. Materiál a metodika

3.1. Materiál

Vzorky trusu pocházející ze zvířat chovaných v ZOO a z cirkusu byly individuálně odebírány ihned po vykálení zvířete a skladovány při 4 °C bez další fixace a konzervace. Počty vzorků z jednotlivých zoologických zahrad a cirkusu jsou uvedeny v tabulce 2.

Vyšetřována byla zvířata následujících taxonů: Artiodactyla (sudokopytníci), Perissodactyla (lichokopytníci), Rodentia (hlodavci) a Paenungulata (chobotnatci a damani). Seznam všech vyšetřených druhů zvířat je uveden v kapitole 4. Výsledky.

Tabulka 2. Počet vyšetřených vzorků v jednotlivých zoologických zahradách a cirkusu

Instituce	Datum odběru	Počet vzorků	Artiodactyla	Perissodactyla	Rodentia	Paenungulata
Zoo Dvůr Králové	12.10.2005	41	39	-	2	-
	17.02.2006	72	69	-	2	-
	14.08.2006	86	81	-	4	1
	27.02.2007	29	29	-	-	-
Zoo Ohrada	21.09.2006	9	9	-	-	-
Zoo Plzeň	06.10.2006	45	30	5	10	-
Zoo Praha	02.02.2007	41	-	16	23	2
Cirkus Berousek	12.05.2006	8	4	3	-	1
Celkem		331				

3.2. Metodika

3.2.1. Diagnostika oocyst kryptosporidií

Oocysty kryptosporidií byly detekovány pomocí specifického barvení anilin-karbol-metyl violetí s dobarvením tartrazinem (Miláček et Vítovec 1985).

Použité roztoky:

- roztok methylvioleti (methylviolet 0,6 g; anilin 1 ml; fenol 1 g; etanol 30 ml; deionizovaná voda 70 ml)
- kyselina sírová (2% vodný roztok)
- roztok tartrazinu (1% tartrazin v 1% kyselině octové)

Pracovní postup:

1. natřít vzorek trusu na podložní sklíčko, fixovat metanolem v plameni
2. barvit roztokem metylvioleti 30 minut
3. opláchnout vodou
4. diferencovat v 2% kyselině sírové
5. opláchnout vodou
6. dobarvit tartrazinem
7. opláchnout vodou, nechat zaschnout

Nabarvené vzorky byly prohlíženy světelným mikroskopem (Olympus IX 70) při zvětšení 1000×. Oocysty mají růžovou až fialovou barvu, pozadí se barví do zelena.

3.2.2. Čištění kryptosporidií na sacharózovém gradientu

Vzorky obsahující oocysty kryptosporidií byly vyčištěny sacharózovým gradientem (Arrowood et Sterling 1987).

Použité roztoky:

- Sheaterův cukerný roztok (deionizovaná voda 259 ml; cukr 405 g; fenol 7,29 g)
- PBS Tween (1% fosfátový pufr; 0,5 ml Tween 20 (Serva))
- pracovní Sheaterovy roztoky: 1+2 (1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly PBS Tween)
1+4 (1 díl Sheaterova roztoku + 4 díly PBS Tween)

Pracovní postup:

1. vzorek trusu (10-15 g) homogenizovat ve třecí misce a přecedit přes sítko
2. do zkumavky navrstvit gradienty: spodní vrstva 30 ml Sheaterova roztoku 1+2, 30 ml Sheaterova roztoku 1+4 a 15 ml naředěného vzorku
3. centrifugovat 20 minut při 1370 g a teplotě 4 °C
4. supernatant přelít do nové zkumavky a doplnit deionizovanou vodou
5. centrifugovat 20 minut při 1370 g a teplotě 4 °C
6. vodní vývěvou odsát horní polovinu obsahu zkumavky
7. body 5 a 6 2× opakovat
8. pelet obsahující oocysty kryptosporidií přenést pasterkou do čisté zkumavky a skladovat ve tmě při teplotě 4 °C

Ke každému vzorku (10 ml) bylo přidáno 150 µl antimykotik a antibiotik (Antibiotic, Antimycotic, Sigma) a 50 µl gentamicinu (Lek, Slovenia). Vzorky v nativu byly prohlíženy světelným mikroskopem (Olympus IX 70) při zvětšení 1000× za použití diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC).

3.2.3. Přímý imunofluorescenční test

Purifikované oocysty kryptosporidií (po sacharózovém gradientu) byly barveny pomocí *Cryptosporidium* spp. antigen IF testu (Crypto Cel, Medac).

Použité roztoky a chemikálie:

- metanol
- Crypto Cel Reagent (Medac)
- PBS
- Mounting Fluid (Medac)

Pracovní postup:

1. na jamkové podložní sklíčko nanést 10 µl vzorku, nechat zaschnout
2. fixovat 5 minut v metanolu, nechat zaschnout
3. nanést 10 µl Crypto Cel Reagent
4. inkubovat sklíčko ve vlhké komůrce 30 minut při 37 °C
5. opatrně omýt 1 minutu v PBS, nechat zaschnout
6. nanést 25 µl Mounting Fluid, přiložit krycí sklíčko

Vzorky byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX 70) při zvětšení 1000×. Na obal oocyst kryptosporidií se navázaly monoklonální protilátky s fluoresceinem. Při vlnové délce 490 nm mají oocysty kryptosporidií světle zelenou fluorescenci.

3.2.4. Izolace DNA

Celková DNA byla extrahována přímo z trusu pomocí komerčního kitu Qiamp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

Použité chemikálie:

- inhibiční tableta EX
- pufrý: ASL, AL, AW1, AW2, AE
- proteináza K

K 180 – 200 mg trusu bylo do mikrozkušavky (1,5 ml) přidáno 200 µl ASL a 150 mg skleněných kuliček (ø 0,5 mm). Poté bylo provedeno rozbíjení oocyst v mini-beadbeateru (MINI-BEADBEATER™) po dobu 2 minut při maximální rychlosti (5000 kmitů/min). Dále bylo postupováno podle návodu, který byl součástí kitu. Získaná DNA byla uchována při teplotě -20 °C.

3.2.5. PCR

Byl použit nested PCR protokol pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rDNA; Xiao et al. 1999b, Jiang et al. 2005). Celkový objem reakční směsi pro jednotlivé polymerázové řetězové reakce byl 25 µl.

Použité chemikálie:

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

Primární primery

F 5'-TCTAGAGCTAATACATGCG-3'

R 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'

Sekundární primery

F 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

R 5'-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3'

Reakční směs pro PCR (primární reakce, celkem 25 µl):

- 10× pufr 2,5 µl
- primer (každý) 0,5 µl
- MgCl₂ (25 mM) 1,5 µl
- dNTP's 4,0 µl
- BSA 1,0 µl
- *Taq* polymeráza 0,6 µl
- PCR H₂O 13,4 µl
- DNA 1,0 µl

Jako pozitivní kontrola byl použit 1 µl DNA *Cryptosporidium parvum* bovinní genotyp. K sekundární PCR reakci byly použity 2 µl primárního PCR produktu, reakční směs se lišila jen množstvím PCR vody a nebylo přidáno BSA. Při primární a sekundární amplifikaci byl použit stejný amplifikační program (viz tabulka 3).

Tabulka 3. Amplifikační program pro termocycler (Bioer) pro dvojici primerů

35 cyklů	}	počáteční denaturace	94 °C	3 min
		denaturace	94 °C	45 s
		nasedání primerů	55 °C	45 s
		dosyntetizování nového řetězce	72 °C	60 s
		finální extenze	72 °C	7 min

3.2.6. Gelová elektroforéza

Velikost PCR fragmentů byla ověřována gelovou elektroforézou. Výsledný PCR produkt (cca 799 bp bez primerů) byl detekován na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (302 nm).

Použité chemikálie:

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

Pracovní postup:

1. s 1× TAE pufrem smíchat agarózu (výsledná koncentrace je 1%), nechat rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou na teplotu přibližně 50 °C
2. přidat ethidium bromid (výsledná koncentrace v gelu 0,5 µg na ml)
3. gel nalít do předem připravené formy, vložit hřeben a nechat ztuhnout
4. gel vložit do elektroforetického tanku naplněného 1× TAE pufrem, do vzniklých jamek nanést 10 µl PCR sekundárního produktu a 2× 10 µl ladderu
5. nastavit napětí na 70 V a spustit přibližně na 1 hodinu (doba potřebná pro separaci fragmentů DNA)
6. pro vizualizaci DNA fragmentům použít UV transiluminátor, vlnová délka 302 nm.

3.2.7. Příprava vzorků na sekvenaci a sekvenace

K přípravě byl použit sekvenační kit BigDye[®] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. Pro každý primer byla namíchána reakční směs, v tabulce 4 je uveden amplifikační program. Vzorky byly sekvenovány z obou stran za použití primerů pro sekundární PCR. Získané sekvence byly upraveny v programu Chromas Pro, Bioedit a ClustalX a srovnány s referenčními sekvencemi SSU rRNA získanými z GenBank a ze CDC Atlanta USA.

Složení reakční směsi:

- PET 2 µl
- pufr (5×) 3 µl
- primer 1 µl
- PCR produkt (sekundární PCR) 5 µl
- PCR H₂O 9 µl

Tabulka 4. Amplifikační program pro termocycler (Bioer), 30 cyklů:

30 cyklů	}	denaturace	94 °C	1 min
		denaturace	54 °C	30 s
		nasedání primerů	50 °C	4 min

Srážení etanolem:

Po namnožení daného úseku DNA v termocycleru bylo ihned provedeno srážení etanolem.

Pracovní postup:

1. k produktu sekvenční PCR přidat 1 μ l glykogenu pro zviditelnění peletu.
2. napipetovat 5 μ l 0,1 M EDTA a 60 μ l 96% etanolu.
3. vzorek protřepat a inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě.
4. centrifugovat po dobu 30 minut při 4 °C (21910 g)
5. odsát supernatant a přidat 100 μ l chlazeného 75% etanolu (-20 °C)
6. centrifugovat 15 minut při 4 °C (21910 g)
7. odsát supernatant a vysráženou DNA vysušit při laboratorní teplotě po dobu přibližně 30 minut.

3.2.8. Experimentální infekce

Izolát získaný ze žirafy síťované (*Giraffa camelopardalis reticulata* De Winton, 1899) byl použit k infekci 6 neonatálních BALB/c myší (7 dní staré) a jejich matky. Všechna experimentální zvířata byla infikována perorálně v dávce 1×10^3 oocyst a denně individuálně vyšetřována na přítomnost oocyst kryptosporidii (výše uvedené metody 3.2.1.) po 22 dnů.

4. Výsledky

Z celkového počtu 331 vzorků od 102 druhů savců bylo na základě výsledků (barvení nátěrů trusu specifickou metodou pomocí anilin-carbol-methyl violetí) vyhodnoceno celkem 44 vzorků jako „pozitivních“ (tabulka 5). Po přečištění sacharózovým gradientem byly tyto vzorky barveny IF testem a prohlédnuty DIC. Na základě výsledků IF testu a morfologie byla zjištěna přítomnost oocyst kryptosporidií pouze ve vzorku č. 78 ze žirafy šíťované (*Giraffa camelopardalis reticulata*). V ostatních případech nebyly oocysty kryptosporidií prokázány.

Tabulka 5. Přehled vyšetřených zvířat (vědecká i české nomenklatura Anděry et al. 1999)

		DK	OH	PL	PR	BE
sudokopytníci (Artiodactyla)						
<i>Addax nasomaculatus</i> (de Blainville, 1816)	adax núbijský	5 ^[1]			1	
<i>Aepyceros m. melampus</i> (Lichtenstein, 1812)	impala jihoafrická	7 ^[2]				
<i>Alces a. alces</i> (Linnaeus, 1758)	los evropský				1	
<i>Antidorcas marsupialis</i> (Zimmermann, 1780)	antilopa skákavá	8 ^[3]				
<i>Bison bison</i> (Linnaeus, 1758)	bizon					1
<i>Bison b. bonasus</i> (Linnaeus, 1758)	zubr evropský			2	1 ^[1]	
<i>Bos primigenius</i> (Bojanus, 1827)	watusi	2		2		
<i>Boselaphus tragocamelus</i> (Pallas, 1766)	nilgau pestrý			2		
<i>Bubalus d. depressicornis</i> (H. Smith, 1827)	anoa nížinný				1	
<i>Budorcas t. taxicolor</i> (Hodgson, 1850)	takin indický				1	
<i>Camelus bactrianus</i> Linnaeus, 1758	velbloud dvouhrbý			4 ^[1]	1	3
<i>Camelus dromedarius</i> Linnaeus, 1758	velbloud jednohrbý	5 ^[1]				
<i>Capra hircus</i> Linnaeus, 1758	koza domácí		2			
<i>Capreolus capreolus</i> (Linnaeus, 1758)	srnec obecný		1			
<i>Cervus elaphus nannodes</i> (Merriam, 1905)	wapiti kalifornský			1		
<i>Cervus eldii</i> M'Clelland, 1842	jelen lyrorohý				1	
<i>Cervus timorensis</i> Blainville, 1822	jelen timorský			1		
<i>Connochaetes gnou</i> (Zimmermann, 1780)	pakůň běloocasý	6 ^[1]				
<i>Connochaetes taurinus albojubatus</i> Thomas, 1892	pakůň bělobradý	4				
<i>Connochaetes t. taurinus</i> (Burchell, 1823)	pakůň modrý	4 ^[2]				
<i>Dama dama</i> (Linnaeus, 1758)	daněk evropský		2			
<i>Damaliscus dorcas phillipsi</i> Harper, 1939	buvolec běločelý	12 ^[4]			1	
<i>Gazella dama</i> (Pallas, 1766)	gazela dama	7				
<i>Gazella leptoceros</i> (F. Cuvier, 1842)	gazela písková	5				
<i>Giraffa camelopardalis reticulata</i> De Winton, 1899	žirafa šíťovaná	25 ^[5]				
<i>Giraffa camelopardalis rothschildi</i> Lydekker, 1903	žirafa Rothschildova	20 ^[4]				
<i>Hexaprotodon liberiensis</i> (Morton, 1849)	hrošík liberijský	4				
<i>Hippotragus equinus</i> (Desmarest, 1804)	antilopa koňská	6				
<i>Hippotragus niger</i> (Harris, 1838)	antilopa vraná	5			1	
<i>Kobus ellipsiprymnus defassa</i> (Rüppell, 1835)	voduška jelenovitá	4 ^[1]				
<i>Kobus e. ellipsiprymnus</i> (Ogilby, 1933)	voduška znamenaná	4 ^[1]				
<i>Kobus leche</i> Gray, 1850	voduška červená	4		2 ^[2]		
<i>Kobus megaceros</i> (Fitzinger, 1855)	voduška abok	4			1	
<i>Lama guanicoe</i> (Müller, 1776)	guanako			2	1	

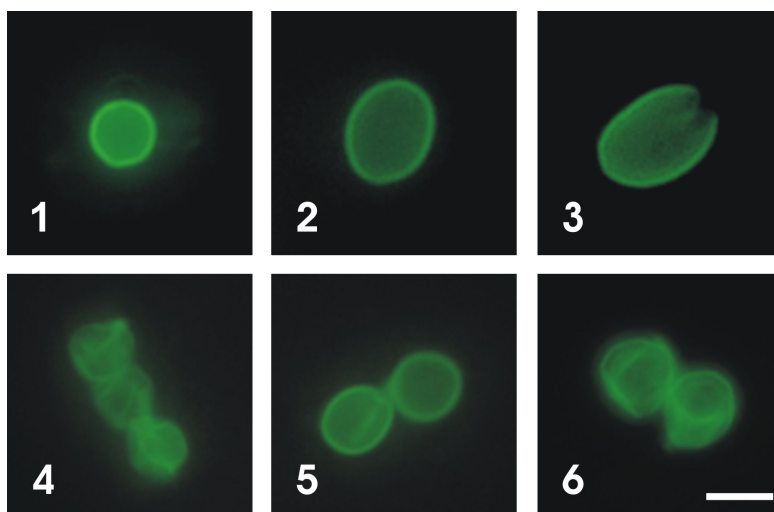
		DK	OH	PL	PR	BE
<i>Lama guanicoe f. glama</i> Linnaeus, 1758	lama krotká					1
<i>Lemniscomys striatus</i> (Linnaeus, 1758)	myš páskovaná				1	
<i>Madoqua kirkii</i> (Günther, 1880)	dikdik Kirkův	4				
<i>Muntiacus reevesi</i> (Ogilby, 1839)	muntžak malý			1		
<i>Naemorhedus goral</i> (Hardwicke, 1825)	goral tmavý			1		
<i>Okapia johnstoni</i> (Sclater, 1901)	okapi	4				
<i>Oreamnos americanus</i> (de Blainville, 1816)	kamzík bělák			1		
<i>Oryx dammah</i> (Cretzschmar, 1826)	přímorožec šavlorohý	6		2	1	
<i>Oryx g. gazella</i> (Linnaeus, 1758)	oryx jihoafrický	4				
<i>Oryx leucoryx</i> (Pallas, 1777)	přímorožec arabský	3				
<i>Ovis aries</i> Linnaeus, 1758	ovce kamerunská			1		
<i>Ovis aries</i> Linnaeus, 1758	ovce ouessantská		2			
<i>Ovis musimon</i> Pallas, 1811	muflon		2			
<i>Ovibos m. moschatus</i> (Zimmermann, 1780)	pižmoň aljašský			1		
<i>Pecari tajacu</i> (Linnaeus, 1758)	pekari páskovaný				1 ^[1]	
<i>Phacochoerus aethiopicus</i> (Pallas, 1767)	prase bradavičnaté	4 ^[1]				
<i>Potamochoerus porcus</i> (Linnaeus, 1758)	štětkoun africký	4				
<i>Pudu puda</i> (Molina, 1782)	pudu jižní			1 ^[1]		
<i>Rangifer tarandus</i> (Linnaeus, 1758)	sob				1	
<i>Redunca fulvorufula</i> (Afzelius, 1815)	bahnivec horský	7				
<i>Sus scrofa f. domestica</i> Linnaeus, 1758	prase domácí-čínské zakuklené			1		
<i>Syncerus c. caffer</i> (Sparman, 1779)	buvol kaferský	4 ^[1]				
<i>Syncerus caffer nanus</i> (Boddaert, 1875)	buvol pralesní	3				
<i>Taurotragus oryx</i> (Pallas, 1766)	antilopa losí	3		2		
<i>Tragelaphus angasii</i> Gray, 1849	nyala nížinná	9 ^[4]				
<i>Tragelaphus eurycerus</i> (Ogilby, 1837)	bongo	4			1	
<i>Tragelaphus imberbis</i> (Blyth, 1869)	kudu malý	8 ^[3]				
<i>Tragelaphus spekei gratus</i> Sclater, 1880	sitatunga západoafrická	5 ^[2]		2 ^[1]		
<i>Tragelaphus strepsiceros</i> (Pallas, 1766)	kudu velký	6				
lichokopytníci (Perissodactyla)						
<i>Equus burchellii boehmi</i> Matschie, 1892	zebra Böhmová					3
<i>Equus asinus</i> Linnaeus, 1758	osel africký			2		
<i>Equus burchellii chapmani</i> Layard, 1865	zebra Chapmanova			1		
<i>Equus kiang</i> Moorcroft, 1841	kiang			2		
hlodavci (Rodentia)						
<i>Acomys dimidiatus</i> (Cretzschmar, 1826)	myš sinajská			1	1	
<i>Acomys cahirinus</i> (Dermarest, 1819)	myš bodlinatá				1	
<i>Acomys cilicinus</i> Spitzenberger, 1978	myš kilikijská				1	
<i>Acomys russatus</i> (Wagner, 1840)	myš rezavá			1	1	
<i>Agouti taczanowskii</i> (Stolzmann, 1865)	paka horská	3 ^[1]				
<i>Arvicanthis abyssinicus</i> (Rüppell, 1842)	myš etiopská				1	
<i>Arvicanthis niloticus</i> (Desmarest, 1822)	myš nilská				1	
<i>Arvicanthis sp.</i>	myš				1	
<i>Cannomys badius</i> (Hodgson, 1841)	hlodoun menší				1	
<i>Capromys pilorides</i> (Say, 1822)	hutia-konga				1	
<i>Cricetomys emini</i> Wroughton, 1910	krysa velká				1	
<i>Dasyprocta leporina</i> (Linnaeus, 1758)	aguti zlatý	3				
<i>Dinaromys bogdanovi</i> (Martino, 1922)	hraboš skalní			1		
<i>Dolichotis patagonum</i> (Zimmermann, 1780)	mara stepní				1	
<i>Echinops telfairi</i> Martin, 1838	bodlín Telfairův				1	
<i>Eliomys melanurus</i> (Wagner, 1839)	plch pustinný			1		
<i>Eutamias sibiricus</i> (Laxmann, 1769)	burunduk			1		

		DK	OH	PL	PR	BE
<i>Graphiuris murinus</i> (Desmarest, 1822)	plch africký			1		
<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> (Linnaeus, 1766)	kapybara			1		
<i>Chinchilla lanigera</i> (Molina, 1782)	čínčila vlnatá	1				
<i>Jaculus jaculus</i> (Linnaeus, 1758)	tarbík egyptský				1	
<i>Meriones crassus</i> Sundevall, 1842)	pískomil hedvábný				1	
<i>Meriones libycus</i> Lichtenstein, 1823	pískomil rudoocasý			1	1	
<i>Meriones unguiculatus</i> (Milne-Edwards, 1867)	pískomil mongolský	1				
<i>Microtus fortis</i> Büchner, 1889	hraboš rákosní			1		
<i>Microtus guentheri</i> (Danford & Alston 1880)	hraboš			1		
<i>Pachyuris duprasi</i> Lataste, 1880	pískomil křečkovitý				1	
<i>Paraxerus cepapi</i> (A. Smith, 1836)	veverka bušová				1	
<i>Pedetes capensis</i> (Foster, 1778)	noháč kapský				1	
<i>Rhodomys pumilio</i> (Sparman, 1784)	myš čtyřpruhá				1	
<i>Sekeetamys calurus</i> (Thomas, 1892)	pískomil veverkoocasý				1	
<i>Thallomys nigricauda</i> Thomas, 1882	krysa akáciová			1	1	
<i>Xerus inauris</i> (Zimmermann, 1780)	veverka kapská				1	
chobotnatci a damani (Paenungulata)						
<i>Procavia capensis</i> (Pallas, 1766)	daman skalní	1			1	
<i>Elephas maximus</i> Linnaeus, 1758	slon indický				1	1

DK-ZOO Dvůr Králové; OH-ZOO Ohrada Hluboká nad Vltavou, PL-ZOO Plzeň, PR-ZOO Praha, BE-Cirkus Berousek; ^[x] počet zvířat vyšetřených IF testem.

Významným výsledkem této práce je zjištění, že komerčně dodávané protilátky proti stěně oocysty kryptosporidií se mohou vázat i na jiné struktury. Na obrázku 2 je vidět rozdíl mezi fluorescencí oocyst kryptosporidií a falešně pozitivní fluorescencí jiných objektů barvených ihned po přečištění vzorku. Po měsíčním skladování vzorků při 4 °C byl opakovaný IF test u všech falešně pozitivních vzorků negativní.

Obrázek 2. Fluorescence kryptosporidií a jiných struktur ze vzorků trusu



1 *C. parvum*; 2 *C. andersoni*; 3 *C. andersoni* (excystovaná); 4 objekt z *Tragelaphus imberbis*; 5 objekt z *Aepyceros m. melampus*; 6 objekt z *Tragelaphus imberbis*; měřítko = 5 µm

Částečná sekvence genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) námi získaného izolátu ze žirafy síťované se 100% shodovala s izoláty *C. muris* 34 z damana skalního (*Procavia capensis*) a *C. muris* 22 z velblouda dvouhrbého *Camelus bactrianus* (Xiao et al. 1999a, Morgan et al. 2000). V tabulce 6 je uvedena odlišnost našeho izolátu v části genu SSU rRNA oproti jiným druhům a genotypům žaludečních kryptosporidií savců.

Tabulka 6. Rozdíly mezi izoláty žaludečních kryptosporidií v 5 úsecích genu SSU rRNA

Druh nebo genotyp	260-264	630-633	643-661	684-703	824-826
<i>C. muris</i> 34 ¹	CTCTG	ATCT	CTAAGGTATATATATATAT	TTCTAAATATATAGGAAACT	GG-AC
<i>C. muris</i> 22 ²	CTCTG	ATCT	CTAAGGTATATATATATAT	TTCTAAATATATAGGAAACT	GG-AC
<i>C. muris</i> RN66 ³	CTTTG	ACCT	CTAAGGTATATATAATATA	TTCTAAATATATAGGAAAT	GG-AC
<i>C. andersoni</i> Kawatabi ⁴	CTCTG	ATCT	CCAAGGTATATATATATAT	T-CTAAATATATAGGAAAT	GGGAC
<i>C. andersoni</i> ⁵	CTCTG	ATTT	CCAAGGTAATATATATAT	T-CTAAATATATAGGAAAT	GG-AC
žirafa 78 (tato práce) ⁶	CTCTG	ATCT	CTAAGGTATATATATATAT	TTCTAAATATATAGGAAACT	GG-AC

¹ izolát z *Procavia capensis* (Xiao et al. 1999a); ² izolát z *Camelus bactrianus* (Morgan et al. 2000); ³ izolát z *Rattus norvegicus* (GenBank X64342); ⁴ izolát z *Bos taurus* (GenBank AY642591); ⁵ izolát z *Bos taurus* (Kváč nepublikovaná data); ⁶ izolát 78 z *Giraffa camelopardalis reticulata* (tato práce)

Námi získaný izolát nebyl infekční pro neonatální a adultní myši kmene BALB/c. Morfometrie oocyst byla provedena z nabarveného vzorku (anilin-carbol methyl violetí), pro srovnání je v tabulce 7 uvedeno měření v nativu a barvení u vybraných žaludečních kryptosporidií.

Tabulka 7. Srovnání velikosti oocyst kryptosporidií s izolátem ze žirafy síťované č. 78

Druh nebo genotyp	Velikost oocyst v μm (index velikosti)	
	Nativ	Barvení
<i>C. parvum</i> bovinní genotyp	5,5 \pm 0,4 \times 4,9 \pm 0,4 (1,12)	4,5 \pm 0,3 \times 4,2 \pm 0,3
<i>C. andersoni</i> Kawatabi	7,9 \pm 0,9 \times 5,2 \pm 1,1 (1,51)	ND
<i>C. andersoni</i>	7,7 \pm 0,4 \times 6,2 \pm 0,3 (1,24)	7,0 \pm 0,6 \times 5,7 \pm 0,3
<i>C. muris</i> RN 66	8,4 (7,5-9,8) \times 6,3 (5,5-7,0)	ND
žirafa 78	ND	4,7 \pm 0,7 \times 4,0 \pm 0,6

Nativ – zvětšení 1000 \times , DIC; Barvení – zvětšení 1000 \times , barveno anilin-carbol methyl violetí, ND – neměřeno *C. muris* RN 66 (Iseki 1986), *C. andersoni* Kawatabi (Koyama 2005), *C. andersoni* (Kváč et al. 2007)

5. Diskuze

Kryptosporidie se u kopytníků i hlodavců vyskytují v různě vysokých prevalencích, závislých na druhu kryptosporidie a hostitele, u hospodářských zvířat i na způsobu chovu. Nejvyšších hodnot prevalence (až 100 %) dosahují u bovinního genotypu *C. parvum* (*C. pestis*) infikující mláďata hospodářsky významných přežvýkavců ve velkochovech (Pavlásek et al. 1983). V podobných hodnotách se může pohybovat prevalence i u *C. andersoni*, druh infikující převážně dospělý skot (Anderson 1991b, Pena et al. 1997, Fayer et al. 2000b, Kváč et Vítovec 2003). Prevalence *C. bovis* bývá v desítkách procent (Santín et al. 2004, Fayer et al. 2006). Ostatní druhy kryptosporidií se u hospodářských zvířat nacházejí ojediněle (Bornay-Llinares et al. 1999, Smith et al. 2005). U volně žijících savců je prevalence kryptosporidiózy nižší než u hospodářských zvířat. Bajer et al. (1997), Miyaji et al. (1989) a Sturdee et al. (1999) uvádějí promořenost u hlodavců 21 %, 49 %, respektive 0-35 %. U volně žijících kopytníků byla zjištěna prevalence 6-10 % (*C. parvum*) (Sturdee et al. 1999), 28 % (druh neurčen) (Mtambo et al. 1997) a 2 % (*C. parvum*) (Korsholm et Henriksen 1984).

Pokud chceme vyšetřovat širokou škálu živočišných druhů, jeví se jako ideální zdroj zvířata chovaná v zoologických zahradách. I když se v některých případech hustota zvířat téměř blíží koncentraci zvířat v hospodářských chovech, prevalence kryptosporidiózy tam bývá výrazně nižší. Ve vzorcích trusu vyšetřených v této bakalářské práci jsem kryptosporidie našla pouze v jediném případě. Mnou zjištěná nízká prevalence u exotických zvířat chovaných v ZOO odpovídá publikovaným nálezům Delgado et al. (2003) 3,6 %, Nakai et al. (2004) bez nálezu, Alves et al. (2005) 2 % a Matsubayashi et al. (2005) 0,6 %. Naopak velký výskyt kryptosporidií byl zjištěn v barcelonské ZOO v rozmezí 18-45 % (Gómez et al. 1996, 2000, Gracenea et al. 2002), což se blíží prevalenci u volně žijících a hospodářských zvířat a je výrazně odlišný než v jiných ZOO.

Velmi často používaným testem k detekci kryptosporidií je přímá imunofluorescence (Gracenea et al. 2002, Delgado et al. 2003), která podle mého zjištění může vykazovat falešně pozitivní nálezy. Přestože v mém případě byly použity specifické monoklonální protilátky proti stěně oocyst kryptosporidií, prokázali jsme zkříženou reaktivitu s objekty neznámého původu, které měly podobný tvar i velikost. Lišily se vyšší intenzitou fluorescence a strukturou povrchu (obrázek 2). To, že se nejedná o kryptosporidie odhalily podrobné morfologické studie. Test IF tak nelze považovat za dostatečně spolehlivou metodu detekce a výsledky je vždy nutné konfrontovat s jinými metodami.

Molekulární analýza genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) prokázala 100% shodnost mého izolátu kryptosporidií získaného ze žirafy síťované (*Giraffa camelopardalis reticulata*) s izoláty pocházejících z damana skalního (*Procavia capensis*; izolát 34, Xiao et al. 1999a) a velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*; izolát 22, Morgan et al. 2000). Shodnost mého izolátu s *C. muris* kmene RN66 byla 99,4 %, s *C. andersoni* 99,3 % a s *C. andersoni* kmen Kawatabi 99,5 %.

Obecně se tvrdí, že oocysty žaludečních kryptosporidií savců jsou výrazně větší než oocysty střevních druhů (Lindsay et al. 2000). V rozporu s těmito údaji je mnou zjištěná velikost oocyst izolátu ze žirafy síťované, velikostí blíží se střevním druhům. Molekulární zařazení mého izolátu mezi žaludeční kryptosporidie má však větší váhu, neboť některé druhy kryptosporidií do obecného schématu dvou velikostních skupin nezapadají žaludeční *C. serpentis* ($6,2 \times 5,3$; Upton et al. 1989) se svou velikostí blíží některým izolátům střevního druhu *C. suis* ($6,2 \times 5,5$; Vítovec et al. 2006). V barcelonské Zoo (Gómez et al. 1996) pouze podle morfometrie oocyst určili druhy *C. parvum* a *C. muris*. K druhovému určení však nebyla použita žádná molekulární metoda, samotná velikost oocyst není dle současných poznatků k spolehlivému druhovému a genotypovému určení kryptosporidií dostačující (Xiao et al. 2004).

Do současné doby byly u savců popsány dva druhy žaludečních kryptosporidií *C. andersoni* a *C. muris* s řadou kmenů lišících se svou hostitelskou specifitou (Tyzzer 1910, Lindsay et al. 2000, Xiao et al. 2004, Morgan et al. 2000). Druh *C. andersoni*, jehož typickým hostitelem je skot, je všeobecně považován za neinfekční pro myši (Lindsay et al. 2000), přestože byly popsány přirozené i experimentální infekce u dalších druhů přežvýkavců a hlodavců (Anderson 1991a, Morgan et al. 2000, Kváč et al. 2007). Koyama et al. (2000) popsali v rámci druhu *C. andersoni* kmen Kawatabi získaný z přirozeně infikované krávy, který byl infekční pro laboratorní SCID myši. Naproti tomu je *C. muris* všeobecně považována za druh infikující hlodavce (Tyzzer 1910). V rámci tohoto druhu však byly popsány kmeny přirozeně infikující především přežvýkavce. Xiao et al. (1999b) a Morgan et al. (2000) charakterizovali kmeny získané z damana (*C. muris* 34), respektive z velblouda (*C. muris* 22). Mnou popsáný izolát, jak již bylo uvedeno, byl geneticky identický právě s kmeny *C. muris* 34 a 22. Infekční experiment prokázal neinfekčnost mého izolátu pro neonatální a adultní BALB/c myši. Anderson (1991b) úspěšně infikoval laboratorní myši izolátem *C. muris*-like získaným z velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*), současně tento izolát nebyl infekční pro telata (Fayer et al. 1991). I když bylo prokázáno, že velbloud může být také hostitelem *C. andersoni* dříve označovaného jako *C. muris*-like (Morgan et al.

2000), lze se na základě infektivit pro různé hostitele domnívat, že v případě studie Fayera et al. (1991) nešlo o *C. andersoni*. Pravděpodobně se jednalo o *C. muris* nebo nějaký dosud nepopsaný izolát žaludečních kryptosporidií, který je odlišný hostitelskou specifitou od mého izolátu. Výsledky této práce, v kontextu s výše napsaným, potvrzují, že hostitelská variabilita jednotlivých kmenů žaludečních kryptosporidií savců je značná. Žirafa síťovaná (*Giraffa camelopardalis reticulata*) byla popsána jako nový přirozený hostitel žaludečních kryptosporidií dříve popsaného genotypu druhu *C. muris* u damana skalního a velbouda dvouhrbého. Nález současně podporuje hypotézu, že žaludeční kryptosporidie mohou mít podobně bohatou genotypovou variabilitu, jakou mají kryptosporidie střevní, donedávna řazené převážně do druhu *C. parvum* (*C. pestis*).

V posledních letech byly popsány infekce imunokompetentních a imunodeficitních pacientů žaludečními kryptosporidiiemi (Katsumata et al. 2000, Guyot et al. 2001, Palmer et al. 2003). Protože jde o méně patogenní agens než střevní druhy kryptosporidií, lze je považovat za méně nebezpečné, zejména pro imunokompetentní jedince. I pro imunodeficitní pacienty je riziko nákazy ze zoologických zvířat velice malé. Dosud také nebyla popsána žádná epidemie způsobená žaludečními kryptosporidiiemi. Zoonotický potenciál žaludečních kryptosporidií je tedy relativně nízký. Vzhledem k tomu, že u střevních i žaludečních kryptosporidií jsou popisovány nové genotypy a od původních komplexních druhů (*C. parvum* a *C. muris*) oddělovány nové druhy s užší hostitelskou specificitou, jsou vhodným modelem pro studium koevoluce parazitů s jejich hostiteli.

6. Literatura

- ANDĚRA M., 1999: České názvy živočichů II. Savci (Mammalia). Národní muzeum Praha.
- ALVES M., XIAO L., LEMOS V., ZHOU L., CAMA V., BARAO DA CUNHA M., MATOS O., ANTUNES F., 2005: Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo. *Parasitol Res.* 97: 108-112.
- ALVES M., XIAO L., SULAIMAN I., LAL A. A., MAOS O., ANTUNES F., 2003: Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle and Zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2744-2747.
- ANDERSON B. C., 1987: Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.* 24: 235-238.
- ANDERSON B. C., 1991a: Experimental infection in mice of *Cryptosporidium muris* isolated from a camel. *J. Protozool.* 38: 16-17.
- ANDERSON B. C., 1991b: Prevalence of *Cryptosporidium muris*-like oocyst among cattle populations of the United States: Preliminary report. *J. Protozool.* 38: 14-15.
- APPLEBEE A., THOMPSON R. C. A., OLSON M. E., 2005: *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. *Trends Parasitol.* 21: 370-376.
- ARWOOD B. C., STERLING C. R., 1987: Isolation of *Cryptosporidium* oocyst and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.* 73: 314-319.
- BAJER A., BEDNARSKA M., SINSKI E., 1997: Wildlife rodents from different habitats as a reservoir for *Cryptosporidium parvum*. *Acta Parasitol.* 42: 192-194.
- BORNAY-LLINARES F. J., SILVA A. J., MOURA I. N. S., MYJAK P., PIETKIEWICZ H., KRUMINIS-LOZOWSKA W., GRACZYK T. K., PIENIAZEK N. J., 1999: Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Am. Society Microbiol.* 65: 1455-1458.
- BULL S., CHALMERS R., STURDEE A. P., CURRY A., KENNAUGH J., 1998: Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoklonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Vet. Parasitol.* 77: 195-197.
- CARRENO R. A., MARTIN D. S., BARTA J. R., 1999: *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85: 899-904.

- CHAPPELL C. L., OKHUYSEN P. C., WHITE A. C., 2003: *Cryptosporidium parvum*: Infectivity, pathogenesis and host-parasite relationship. In THOMPSON R. C. A., ARMSON A., RYAN U. M., (Eds.): *Cryptosporidium*: From molecules to disease. Elsevier. pp. 19-49.
- CORLISS J. O., 1994: An interim utilitarian ("user friendly") hierarchical classification and characterization of the protist. *Acta Protozool.* 33: 1-51.
- CRANFIELD M. R., BARKER I. K., MEHREN K. G., RAPLEY W. A., 1984: Canine distemper in wild raccoons (*Procyon lotor*) at the Metropolitan Toronto Zoo. *Can. Vet J.* 25: 63-66.
- CURRENT W. L., 1988: The biology of *Cryptosporidium*. *Am. Soc. Microbiol. News.* 54: 605-611.
- CURRENT W. L., BLAGBURN B. L., 1990: *Cryptosporidium*: infections in man and domesticated animals. In LONG P. L., (Ed.): *Coccidiosis of man and domestic animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 155-185.
- DELGADO E., FONSECA I. P., FAZENDEIRO I., MATOS O., ANTUNES F., CUNHA A. B., 2003: *Cryptosporidium* spp. in ruminants at the Lisbon Zoo. *J. Zoo Wildl. Med.* 34: 352-356.
- ELLIOT D. A., COLEMAN D. J., LANE M. A., MAY R. C., MACHESKY L. M., CLARK D. P., 2001: *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerisation. *Infection and Immunity.* 69: 5940-5942.
- FAYER R., 2003: *Cryptosporidium*: From molecules to disease. In THOMPSON R. C. A., ARMSON A., RYAN U. M., (Eds.): *Cryptosporidium*: From molecules to disease. Elsevier. pp. 11-18.
- FAYER R., MORGAN U., UPTON S. J., 2000a: Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30: 1305-1322.
- FAYER R., PHILLIPS L., ANDERSON B. C., BUSH M., 1991: Chronic cryptosporidiosis in a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 22: 228-232.
- FAYER R., SANTÍN M., XIAO L., 2005: *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91: 624-629.
- FAYER R., SANTÍN M., TROUT J. M., GREINER E., 2006: Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.* 135: 105-112.
- FAYER R., SPEER C. A., DUBEY J. P., 1997: The general biology of *Cryptosporidium*. In FAYER R. (Ed.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press. pp. 2-33.
- FAYER R., TROUT J. M., GRACZYK T. K., LEWIS E. J., 2000b: Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Vet. Parasitol.* 93:103-112.

- FLANIGAN T., WHALEN C., TURNER J., SOAVE R., TOERNER J., HAVLIR D., KOTLER D., 1992: *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Am. Intern. Med.* 116: 840-842.
- GÓMEZ M. S., GRACENEA M., GOSALBEZ P., FELIU C., ENSENAT C., HIDALGO R., 1992: Detection of oocyst of *Cryptosporidium* in several species of monkeys and in one prosimian species at the Barcelona Zoo. *Parasitol. Res.* 78: 619-620.
- GÓMEZ M. S., TORRES J., GRACENEA M., FERNANDEZ-MORÁN J., GONZALEZ-MORENO O., 2000: Further report on *Cryptosporidium* in Barcelona Zoo mammals. *Parasitol. Res.* 86: 318-323.
- GÓMEZ M. S., VILA T., FELIU C., MONTOLIU I., GRACENEA M., FERNANDEZ J., 1996: A survey for *Cryptosporidium* spp. in mammals at the Barcelona Zoo. *Inter. J. Parasitol.* 26: 1331-1333.
- GRACENEA M., GÓMEZ M. S., TORRES J., CARNE E., FERNANDEZ-MORAN J., 2002: Transmission dynamics of *Cryptosporidium* in primates and herbivores at the Barcelona Zoo: a long-term study. *Vet. Parasitol.* 104: 19-26.
- GUYOT K., FOLLET-DUMOULIN A., LELIEVRE E., SARFATI C., RABODONINA M., NEREZ G., CAILLIEZ J. C., CAMUS D., DEI-CAS E., 2001: Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3472-3480.
- HIJAWI N. S., MELONI B. P., MORGAN U. M., THOMPSON R. C. A., 2001: Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *J. Parasitol.* 31: 1048-1092.
- ISEKI M., 1986: Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Japn. J. Parasitol.* 35: 521-526.
- 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.
- KATSUMATA T., HOSEA D., RANUH I. G., UGA S., YANAGI T., KOHNO S., 2000: Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 70-72.
- KOYAMA Y., SATOH M., MAEKAWA K., HIKOSAKA K., NAKAI Y., 2005: Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan. *Vet. Parasitol.* 130: 323-326.
- KORSHOLM H., HENRIKSEN S. A., 1984: Infection with *Cryptosporidium* in Roe deer (*Capreolus capreolus* L.). A preliminary report. *Nordic Vet. Med.* 331: 161-167.

- KOŠTÁL F., HAJNYŠ T., HOLEČKOVÁ D., MOUCHA P., MYSLIVEČKOVÁ J., 2004: Výroční zpráva 2004, ZOO Dvůr Králové.
- 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.
- KVÁČ M., VÍTOVEC J., 2003: Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med.* 50: 451-457.
- LINSAY D. S., UPTON S. J., OWENS D. S., MORGAN U. M., MEAD J. R., BLAGBURN B. L., 2000: *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apikomlexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukar. Microbiol.* 47: 91-95.
- MAJEWSKA A.C., KASPRZAK W., WERNER A., 1997: Prevalence of *Cryptosporidium* in mammals housed in Poznan Zoological garden, Poland. *Acta Parasitol.* 42: 195-198.
- MATSUBAYASHI M., TAKAMI K., KIMATA I., NAKANISHI T., TANI H., SASAI K., BABA E., 2005: Survey of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infection in various animals at a Zoo in Japan. *J. Zoo. Wildl. Med.* 36: 331-335.
- MIYAJI S., TANIKAWA T., SHIKATA J., 1989: Prevalence of *Cryptosporidium* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus* in Japan. *Jpn. J. Parasitol.* 38: 365-372.
- MILÁČEK P., VÍTOVEC J., 1985: Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazin in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32: 50.
- MORGAN U. M., XIAO L., MONIS P., SULAIMAN I., PAVLÁSEK I., BLAGBURN B., OLSON M., UPTON S. J., KRAMTSOV N. V., LAL A. A., ELLIOT A., THOMPSON R. C. A., 2000: Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitol.* 120: 457-464.
- MTAMBO M. M. A., SEBATWALE J. B., KAMBARAGE D. M., MUHAIRWA A. P., MAEDA G. E., KUSILUKA L. J. M., KAZLAWA R. R., 1997: Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocyst in cattle and wildlife in Morogoro region, Tanzania. *Prev. Vet. Med.* 31: 185-190.
- NAKAI Y., HIKOSAKA K., SATI M., SASAKI T., KANETA Y., OKAZAKI N., 2004: Detection of *Cryptosporidium muris* type oocyst from beef cattle in a farm and from domestic and wild animals in and around the farm. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 983-984.
- O'DONOGHUE P. J., 1995: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Inter. J. Parasitol.* 25: 139-195.
- ORTEGA Y. R., NAGLE R., GILMAN R. H., WATANABE J., MIYAGUI J., QUISPE H., KANAGUSUKU P., ROXAS C., STERLING C. R., 1997: Pathologic and clinical findings in

- patients with cyclosporiasis and a description of intracellular parasite life-cycle. *J Infect. Dis.* 176: 1584-1589.
- PALMER C J., XIAO L., TERASHIMA A., GUERRA H., GOTUZZO E., SALDÍAS G., BONILLA J. A., ZHOU L., LINDQUIST A., UPTON S. J., 2003: *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Perú. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 1174-1176.
- PAVLÁSEK I., ZIKMUND B., KLÍMA F., 1983: Vliv různého způsobu ustájení telat po narození na výskyt *Cryptosporidium* sp. *Vet. Med.* 28: 31-36.
- PENA J. H. F., KASAI N., GENNARI S. M., 1997: *Cryptosporidium muris* in dairy cattle dairy cattle in Brasil. *Vet. Parasitol.* 73: 353-355.
- POSPISCHIL A., STIGLMAIR-HERB M. T., HEGEL G., WIENER H., 1987: Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazells. *Vet. Rec.* 112: 379-380.
- RYAN U., XIAO L., READ C., ZHOU L., LAL A. A., PAVLÁSEK I., 2003: Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 4302-4307.
- SANTÍN M., TROUT J. M., XIAO L., ZHOU L., GREINER E., FAYER R., 2004: Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* 122: 103-117.
- ŠLAPETA J., 2006: *Cryptosporidium* found in cattle: a proposal for a new species. *Trends Parasitol.* 22: 469-494.
- SMITH H. V., NICHOLS R. A. B., MALLON M., MACLEOD A., TAIT A., REILLY W. J., BROWNING L. M., GRAY D., REID S. W. J., WASTLING J. M., 2005: Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. *Vet. Rec.* 156: 710-711.
- STURDEE A. P., CHALMERS R. M., BULL S. A., 1999: Detection of *Cryptosporidium* oocyst in wild mammals of mainland Britain. *Vet. Parasitol.* 80: 273-280.
- THOMPSON R. C. A., OLSON M. E., ZHU G., ENOMOTO S., ABRAHAMSEN M. S., HIJAWI N. S., 2005: *Cryptosporidium* and cryptosporiosis. *Adv. Parasitol.* 59: 77-158.
- TORRES J., GRACENEA M., GOMEZ M. S., ARRIZABALAGA A., GONZALEZ-MORENO O., 2000: The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Vet. Parasitol.* 92: 253-260.
- TYZZER E. E., 1910: An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23: 394-414.
- TYZZER E. E., 1912: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394-412.

- UPTON S.J., MCALLISTER C.T., FREED P.S., BARNARD S.M., 1989: *Cryptosporidium* spp. in wild and captive reptiles. *J Wildl Dis.* 25: 20-30.
- VÍTOVEC J., HAMADEJOVÁ K., LANDOVÁ L., KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B., 2006: Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *J. Ved. Med.* 53: 239-243.
- XIAO L., ESCALANTE L., YANG C. F., SULAIMAN I., ESCALANTE A. A., MONTALI R. J., FAYER R., LAL A. A., 1999a: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1578-1583.
- XIAO L., FAYER R., RYAN U., UPTON S. J., 2004: *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent advances and implications for public health. *Clinical Mikrobiol. Reviews.* 17: 72-97.
- XIAO L., MORGAN U. M., LIMOR J., ESCALANTE A., ARROWOOD M., SHULAW W., THOMPSON R. C. A., FAYER R., LAL A. A., 1999b: Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3386-3391.
- ZHU G., MARCHEWKA M. J., KEITHLY J. S., 2000: *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Mikrobiol.* 146: 315-321.