

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
Zemědělská fakulta v Českých Budějovicích

Katedra biologických disciplín

Studijní program: Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Bakalářská práce:

Vnitrodruhová variabilita *Cryptosporidium parvum* u telat

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Vypracovala:

Nikola Hromadová

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: „**Vnitrodruhová variabilita *Cryptosporidium parvum* u telat**“ vypracovala na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích dne

.....

Podpis

Ráda bych tímto poděkovala doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady a trpělivost při zpracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Laboratoře veterinární a humánní protistologie a všem zemědělským družstvům, která mi umožnila odběr vzorků a dodala potřebné informace.

ABSTRAKT

Vzorky trusu pro parazitologická vyšetření byly odebírány v 10 chovech mléčného skotu. Byl sledován vliv technologie chovu a věku zvířat na výskyt kryptosporidií. Celkem bylo odebráno a mikroskopicky vyšetřeno 161 vzorků. 47 (29,2 %) vzorků bylo pozitivních na přítomnost oocyst kryptosporidií, konkrétně *C. parvum*. Největší výskyt *C. parvum* byl zjištěn u telat okolo 2 týdnů stáří, u starších jedinců byl výskyt také zaznamenán, ale ve slabší intenzitě infekce. Jako nejrizikovější způsob chovu byla vyhodnocena technologie skupinového ustájení a ustájení pomocí Staimanových bud, které byly v těsné blízkosti a nebyl nijak zamezen kontakt mezi sousedícími telaty. V jednotlivých chovech se vyskytoval vždy jen jeden subtyp druhu *C. parvum*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cryptosporidium; infekce; kryptosporidióza

SUMMARY

Faecal samples for parasitologic examination were obtained from ten farms. A total of 161 faecal specimens were fixed on a slide by methanol and stained with aniline-carbol-methyl violet. Of the 161 specimens, 47 (29,2 %) were positive for *Cryptosporidium* oocysts presence, namely *Cryptosporidium parvum*. The prevalence of *C. parvum* infection was highest in calves around 2 weeks of age, the older ones were also recorded to be positive but in a weaker intensity. As the most risky management system was evaluated to be technology group housing and housing in “Staimanové boudy”, which were in close proximity and contact between neighboring calves was not prevented. In each breeding, only one type of subtype was detected.

KEY WORDS

Cryptosporidium; infection; cryptosporidiosis

OBSAH

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Historie	2
2.2. Systematika	3
2.3. Vývojový cyklus kryptosporidií.....	3
2.4. Přenos kryptosporidií	5
2.5. Určení a diagnostika.....	5
2.6. Terapie kryptosporidiózy	5
2.6.1. Imunologická terapie	6
2.7. Druhy kryptosporidií infikující skot.....	6
2.7.1. <i>Cryptosporidium andersoni</i>	7
2.7.2. <i>Cryptosporidium parvum</i>	7
2.7.3. <i>Cryptosporidium ryanae</i>	8
2.7.4. <i>Cryptosporidium bovis</i>	9
2.7.5. Ostatní druhy a genotypy kryptosporidií	9
2.8. Vnitrodruhová variabilita rodu <i>Cryptosporidium</i>	10
2.8.1. Subtypy <i>Cryptosporidium parvum</i>	10
3. Cíle.....	14
4. Materiál a metodiky.....	15
4.1. Charakteristika sledovaných chovů.....	15
4.1.1. Popis jednotlivých chovů.....	15
4.1.2. Nomenklatura suptypů <i>Cryptosporidium parvum</i>	16
4.2. Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření	17
4.3. Metoda barvení oocyst	17
4.4. Izolace DNA.....	18
4.5. Genotypizace izolátů <i>Cryptosporidium parvum</i>	18
5. Výsledky	22
5.1. Výskyt kryptosporidií ve sledovaných chovech.....	22
5.2. Výskyt kryptosporidiiových infekcí v závislosti na stáří telat	23
5.3. Závislost výskytu kryptosporidií na technologii ustájení.....	23
5.4. Sezónní výskyt kryptosporidií.....	24
5.5. Genotypizace kryptosporidií	24
6. Diskuse	26
7. Závěr.....	28
8. Přehled použité literatury.....	29

1. ÚVOD

Chov skotu

Původní skot chovaný na území Čech, Moravy a Slezska byl jednobarevný červený skot, který patřil do skupiny středoevropského skotu krátkorohého typu. Byl to skot malého tělesného rámce pozdního vývinu, skromný, nenáročný. V průběhu 14. a 15. století byla spotřeba mléka velmi nízká, protože skot byl chován především pro tažnou sílu, produkci masa a výrobu hnoje. V současnosti je chov skotu jedním ze stěžejních odvětví živočišné výroby. Hlavními produkty jsou mléko, maso a chlévská mrva.

Chov skotu má v České republice dlouholetou tradici. Chovatelé se musí zaměřovat především na zdravotní stav zvířat, pokud chtějí obstát na trhu. Nemoci skotu snižují jak užitkovost, tak welfare zvířat a v neposlední řadě mohou být zdrojem infekce i pro člověka. Problematika nemocí u skotu je velmi široká. Největším problémem není úhyn zvířete, ale snižující se užitkovost při prodělávání nemoci.

Existuje velké množství jak neinfekčních, tak infekčních chorob. Vzhledem k zoonotickému potenciálu jsou kryptosporidie předmětem zvýšeného zájmu mnoha vědeckovýzkumných pracovišť u nás i v zahraničí, takže nových poznatků o těchto protozoích neustále enormně přibývá.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 HISTORIE

Popis kryptosporidií je spojován s E. E. Tyzzerem, který v roce 1907 našel a popsal parazita v buňkách žaludečního epitelu laboratorních myší a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris*. V roce 1910 popsal tohoto parazita ještě podrobněji a navrhl jméno *Cryptosporidium* jako nový rod a *Cryptosporidium muris* jako typový druh. V roce 1912 Tyzzer popsal další druh rodu *Cryptosporidium*. *Cryptosporidium parvum* parazitující v tenkém střevě s oocystami menšími než u *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1910).

Přestože jsou podle dnešních poznatků kryptosporidie přizpůsobeny parazitickému způsobu života u velkého množství hostitelů patřících do všech tříd obratlovců, až do počátku 70. let 20. století jim nebyla věnována výrazná pozornost.

Na začátku roku 1970 se kryptosporidie staly středem mnoha studií, když byly spojeny s těžkými vodnatými průjmy u telat a jehňat, které se nedařilo vyléčit žádnými chemoterapeutiky a často končily úhynem (Panciera et al. 1971; Meutin et al. 1974). V roce 1976 byly popsány první případy kryptosporidiózy u lidí, 3-leté dívky a 39-letého imunosuprimovaného pacienta. V obou případech jedinci trpěli těžkými vodnatými průjmy a vážnou gastroenteritidou trvající 2 týdny. Byla provedena diagnostika pomocí střevní biopsie a mikroskopické vyšetření (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976).

Silně vzrostl zájem v roce 1993 v souvislosti s masivní kontaminací vody oocystami kryptosporidií, kdy se nakazilo více než 400 000 osob v Milwaukee ve Wisconsinu (MacKenzie et al. 1994). V Československu byl výskyt kryptosporidií poprvé zaznamenán u dvou nuceně odporážených 14-ti denních býčků v jižních Čechách v roce 1979 (Pavlásek 1981).

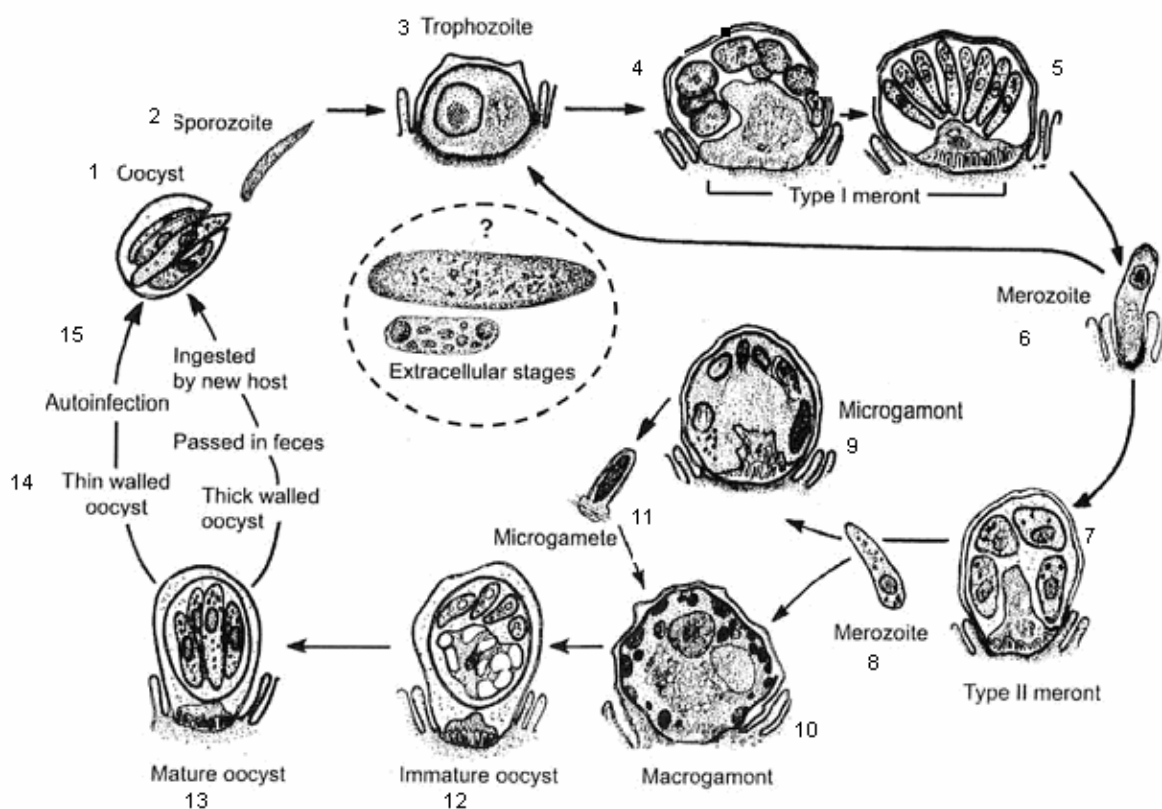
2.2 SYSTEMATIKA

Kryptosporidie jsou řazeny do kmene Apicomplexa, který je příbuzný obrněnkám a nálevníkům. Vzhledem k podobnosti vývojového cyklu s kokciemi, byly dříve kryptosporidie řazeny do příbuznosti rodu *Eimerie*, řád *Coccidia*. Na základě výsledků molekulární analýzy bylo prokázáno, že jsou více příbuzné gregarinám, jimž se podobá i jejich vývojový cyklus (Carreno et al. 1999; Hijjawi et al. 2002).

2.3 VÝVOJOVÝ CYKLUS KRYPTOSPORIDIÍ (obrázek 1)

Vývojový cyklus je nejlépe popsán u *Cryptosporidium parvum*, u ostatních druhů rodu se předpokládá velmi podobný průběh.

Obrázek 1: Schématické znázornění životního cyklu *C. parvum* (Fayer 1997):



Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní, tedy bez meziphostitele (Fayer et al 1997, Thomson et al 2005). K nakažení dochází fekálně-orální cestou, požitím oocyst. Cyklus je velmi podobný kokciím, liší se ale v tom, že se sporozoiti nezanořují do cytoplazmy, ale zůstávají uloženi intracelulárně mimo cytoplazmu, epiplazmaticky (Valigurová et al.1995).

Vývojový cyklus kryptosporidií probíhá v epitelální výstelce gastrointestinálního nebo respiračního traktu hostitele (Current and Blackburn 1990).

Průběh vývojové cyklu *C. parvum*:

1. Hostitel pozře oocysty, které následně excystují.
2. Z oocyst se posléze uvolní infekční stádia zvaná sporozoiti, kteří pronikají k hostitelským buňkám.
3. Sporozoiti se mění na trofozoity uzavřené v parazitoformní vakuole na enterocytech mikrokľů.
4. Jádru trofozoita se dělí a dochází k asexuálnímu množení – merogonii.
5. Vzniká meront typu I s 6-8 merozoity.
6. Merozoiti se uvolňují z buněk a opakují asexuální rozmnožování.
7. Vzniká meront typu II se 4 merozoity.
8. Merozoiti z meronta typu II vstupují do sexuální fáze – gametogonie.
Merozoiti typu II napadají hostitelské buňky, část se mění na samčí pohlavní stádia – mikrogamonty, část na samičí makrogamonty.
9. Z mikrogamontu se uvolní pohyblivé mikrogamety, které oplodní makrogamety vzniklé z makrogamontů.
10. Splynutím mikrogamety s makrogametou vznikne zygota.
11. Dochází k endogenní sporulaci a přeměně zygoty ve zralou oocystu.
12. Vznikají dva typy oocyst – silnostěnné a tenkostěnné.
13. Silnostěnné oocysty opouštějí tělo hostitele trusem a slouží k přenosu infekce na další vnímavé hostitele. Z hostitele odchází oocysty plně infekční, což je další rozdíl od většiny kokcií. Tenkostěnné oocysty excystují ještě v těle hostitele, sporozoiti se aktivně uvolní z oocyst a velmi rychle pronikají do zatím neinfikovaných mikrokľů střeva, čemuž se říká autoinfekce.

V rámci rodu *Cryptosporidium* rozlišujeme žaludeční (s většími oválnými oocystami) a střevní (s menšími kulatými oocystami) druhy kryptosporidií (Xiao et al. 2004). Střevní kryptosporidie jsou např. *C. parvum*, *C. suis*, *C. canis* a mají menší kulaté oocysty. Jediným žaludečním druhem parazitujícím u skotu je *C. andersoni* (Lindsay et al. 2000). Rozměry střevních druhů jsou $5,5 \times 5,0$ mikrometrů. Žaludeční druhy jsou např. *C. muris*, *C. andersoni*, *C. galli*, které mají oocysty větší a oválné. Rozměry žaludečních druhů jsou $7,0 \times 6,5$ mikrometrů (Iseki et al. 1986; Lindsay et al. 2000; Ryan et al. 2003).

2.4 PŘENOS KRYPTOSPORIDIÍ

Přenos kryptosporidií se děje fekálně-orální cestou, často z vody znečištěné výkaly hospodářských zvířat. Přenos může probíhat i kontaktem (ze zvířete na člověka a naopak, z člověka na člověka) (Pohloja et al. 1986; Reif et al. 1989; Preiser et al. 2003).

Oocysty kryptosporidií jsou vysoce odolné a patogeny mohou přežít různé filtrace pitné vody a chemické ošetření, jako je proces chlorování.

Ke kontaminaci surovin pro výrobu potravin může dojít při zavlažování kontaminovanou vodou (Thurston-Enriquez et al. 2002). Velký problém s hygienou při zpracování potravin je v rozvojových zemích (Sutthikornchai et al. 2005). Dalším ohniskem nákazy mohou být mléčné výrobky, které byly nedostatečně pasterované (Djuretic et al. 1997; Gelletlie et al. 1997).

2.5 URČENÍ A DIAGNOSTIKA

V době, kdy byly kryptosporidie identifikovány jako lidský patogen, bývala prováděna biopsie střevní tkáně (Keusch et al. 1995). Jelikož se tento postup příliš neosvědčil, byly vyvinuty metody pro detekci a identifikaci oocyst přímo ze vzorků stolice. Nejčastěji se používá jednoduché barvení nátěru stolice (methylviolet dle Miláčka a Vítovce nebo modifikované Ziehl-Nielsonovo barvení).

Po celá desetiletí byla mikroskopie jedinou metodou pro zjišťování přítomnosti oocyst s využitím flotace, nátěrů, barvení. Mikroskopická identifikace byla dosti zdoluhavá a vyžadovala trénované oko. Vzhledem k tomu, že se oocysty jednotlivých druhů od sebe morfologicky signifikantně neliší, byla identifikace druhů nemožná.

V současné době jsou k diagnostice kryptosporidií používány komerčně dostupné imunodiagnostické testy (IFAT nebo ELISA). Dále se využívají molekulárně-biologické metody jako je PCR (polymerázová řetězová reakce).

2.6 TERAPIE KRYPTOSPORIDIÓZY

Vzhledem k tomu, že kryptosporidie jsou jedním z mnoha parazitů, proti kterým není vyvinuta účinná léčba, je toto onemocnění zvláště nebezpečné pro jedince s oslabenou imunitou. Nebyla doposud vyvinuta žádná účinná chemoterapeutika. Perorální nebo intravenózní rehydratace a náhrada elektrolytů může zmírnit vodnaté průjmy (Flanigan and Soave 1993).

U imunodeficitních jedinců bylo testováno několik antimikrobiálních látek, např. spiramycin. Tato léčba přinesla pouze částečné snížení průjmu nebo částečné snížení počtu oocyst ve stolici (Flanigan and Soave 1993). Nicméně, u paromomycinu, bylo prokázáno, že se snížila intenzita infekce a zlepšila se střevní funkce (Goodgame 1996).

Oocysty kryptosporidií jsou velmi odolné vůči podmínkám vnějšího prostředí. Hlavním faktorem, který přežívání oocyst ovlivňuje je teplota. Vysoké teploty (65 °C po dobu 20 min. nebo vroucí voda po dobu 1 minuty) oocysty spolehlivě zničí (Fayer 2004) stejně jako teploty pod bodem mrazu (spolehlivě jsou oocysty zničeny při -70 °C) (Fayer et al. 1991; Fayer and Nerad 1996).

Výsledky studie, kterou publikovala Clancy et al. (1998) ukázaly, že UV záření eliminuje infektivitu oocyst při použitých dávkách záření (až 40 mJ/cm²). Později však bylo zjištěno, že středotlaké UV záření o dávce 19 mJ/cm² vedlo k inaktivaci oocyst (Bukhari et al. 1999), tzn., že UV záření může být účinnou a zároveň nákladově konkurenceschopnou metodou inaktivace kryptosporidií v upravovaných vodách (Dolejš 2004).

Z chemických dezinfekčních prostředků Tondou účinnými peroxid vodíku a chlordioxid (Quinn and Betts 1993). I ozonizace může být v některých případech částečně účinnou metodou při odstraňování kryptosporidií, její účinnost však záleží na použité resp. použitelné koncentraci ozónu (Singerr and Reckhow 1999).

Hlavním způsobem prevence zůstávají hygienická opatření jako je budování kanalizací, což má za cíl zamezit kontaminaci povrchové vody různými splašky, obsahujícími jak lidské, tak zvířecí výkaly.

2.6.1 IMUNOLOGICKÁ TERAPIE

I když sérové protilátky neposkytují ochranu před kryptosporidiovou infekcí, výsledky studií naznačují, že protilátky v lumen střeva mohou omezit nebo dokonce zabránit infekci. Podáváním hyperimunního kolostra skotu infikovaným lidem bylo dosaženo uvolnění IgA s následným zmírněním průběhu infekce (Heyworth 1992).

2.7 DRUHY KRYPTOSPORIDIÍ INFIKUJÍCÍCH SKOT

Kryptosporidióza skotu byla poprvé popsána v druhé polovině 20. století, kdy histologické vyšetření jejuna u 8 měsíční jalovice s chronickými průjmy odhalilo tohoto parazita (Panciera et al. 1971). Následně byly infekce identifikovány u

mladých telat trpících průjmy. Telata jsou často infikována nejen *C. parvum*, ale také *C. andersoni*, *C. bovis* a *C. ryanae*. Díky rozvoji molekulárních metod bylo zjištěno, že druhy *C. bovis* a *C. ryanae* jsou lokalizovány ve střevě hostitele, ale přímý průkaz nebyl dosud proveden (Feng et al. 2007).

2.7.1 CRYPTOSPORIDIUM ANDERSONI

Hostitel: Typickým hostitelem *C. andersoni* je skot, nicméně byly popsány jak přirozené, tak i experimentální infekce u dalších druhů polygastrů (bizon, zubr, velbloud dvouhrbý, gazela altská) a některých hlodavců (potkan, myš, mastomys) (Pospischil et al. 1987; Anderson 1989; Iseki et al. 1989; Koudela et al. 1998; Fayer et al. 2000, Ryan et al. 2003; Kváč et al. 2007). Druh *C. andersoni* byl popsán jako infekční pro člověka (Leoni et al. 2006).

Rozšíření: *Cryptosporidium andersoni* je infekční jak pro dospělé jedince, tak i pro zvířata v období mléčné výživy (Peng and Wilson 2003, Kváč et al. 2008, 2009).

Morfologie: Oocysty jsou elipsovitého tvaru bez sporocyst, morfologicky podobné *C. muris*. Stěna oocysty je bezbarvá, postrádá mikropyle a má podélný šev na jednom pólu tzv. suturu.

Velikost: $7,4 \times 5,6 \mu\text{m}$ až $8,4 \times 6,2 \mu\text{m}$

Lokalizace a vývoj: Tento druh kryptosporidie infikuje pouze žláznatý epitel žaludku svých hostitelů, u skotu pouze *abomasum* (Anderson et al. 1987, 1990).

Patogenita: Při pitvě je žaludeční sliznice bledá, zánět se dostává do *lamina propria*. Histopatologické změny v místě infekce v *abomasum* nemají zánětlivý charakter, ale jsou zjištěny výrazné dilatace a atrofie infikovaných částí žláz a metaplazie žláz epitelových buněk. Byla zjištěna zvýšená nadprodukce hlenu (Kváč and Vítovec 2003).

Klinické příznaky: Nejsou žádné viditelné klinické příznaky. Infekce probíhá chronicky a nezpůsobuje žádné průjmy (Kváč and Vítovec 2003). Doprovodným příznakem může být snížená užitkovost dojnic (Esteban and Anderson 1995).

2.7.2 CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

Hostitel: Tento druh je nejrozšířenější kryptosporidií s nejnižší hostitelskou specifitou. Předpokládá se, že je infekční pro většinu savců (de Graf et al. 1999; Fayer et al. 2000). Nejčastěji se vyskytuje právě u skotu, respektive u telat do věku 2 měsíců (Santín et al. 2004; Fayer et al. 2006; Santín and Trout 2007).

Rozšíření: *Cryptosporidium parvum* je infekční pro neonatální zvířata. Infekce se projevuje především u telat do věku 8 týdnů (Santín et al. 2004; Fayer et al. 2006, 2007; Langkjær et al. 2007). Není vyloučen výskyt i u starších jedinců.

Morfologie: Patří mezi střevní kryptosporidie s menšími a kulatými oocystami.

Velikost: $5,0 \times 4,5 \mu\text{m}$

Lokalizace a vývoj: Tento druh kryptosporidií je lokalizován ve střevě svého hostitele. Při experimentu u infikovaných telat byl průjem zjištěn již 3 dny po napadení parazitem a trval 4 až 16 dnů, kdy intenzita produkce oocyst se výrazně lišila mezi jedinci (Fayer et al. 1998). V přirozených podmínkách se příznaky projevují již krátce po narození, kdy se nejvíce nákaza projevuje u telat od 1 do 3 týdnů (Huetink et al. 2001; Nydam et al. 2001; Castro-Hermida et al. 2002; Santín et al. 2004). Vylučování oocyst trvá v průměru 12 dnů a průjem v průměru 8 dnů (Castro-Hermida et al. 2002).

Patogenita: Tento parazit je primárním patogenem tenkého střeva a způsobuje postupné vymizení mikroklků, submukózní edém a zánětlivé infiltrace v *lamina propria*. Přestože parazit nejvíce napadá jejunum a ileum, může být silně infikováno i tlusté střevo, aniž by probíhala infekce v tenkém střevě, kde parazit způsobuje enteritidy, atrofii klků a jejich postupné zkracování (Clayton et al. 1994; Lumadue et al. 1998). Sliznice postižených orgánů je infiltrovaná lymfocyty, monocyty, neutrofily a makrofágy (Heine et al. 1984; Rommel et al. 2000).

Klinické příznaky: *Cryptosporidium parvum* způsobuje u telat infekce spojené s vodnatým průjmem a akutním průběhem. S průjmem se do vnějšího prostředí dostává velké množství oocyst (až 10^7 oocyst na 1 gram výkalů) (Fayer et al. 1998). Infekci doplňují i další příznaky jako je deprese, slabost a anorexie (Howerth 1981; Tzipori et al. 1983).

2.7.3 CRYPTOSPORIDIUM RYANAE

Hostitel: Na základě morfologických, molekulárních a biologických údajů bylo *C. ryanae* nalezeno pouze u telat.

Rozšíření: U infikovaných zvířat jsou pozorovány věkové rozdíly. Věk telat se pohybuje v rozmezí 3-5 dnů až 2-3 měsíců (Santín et al. 2004). Výskyt byl také prokázán u jalovic ve věku 2 až 3 roky (Fayer et al. 2006). Oocysty nejsou infekční pro BALB/c myši a jehňata.

Morfologie: *Cryptosporidium ryanae* patří mezi střevní druhy. Jedná se o nejmenší oocysty kryptosporidií infikující savce.

Velikost: 2,9-4,4 × 2,9-3,7 μm. Bylo prokázáno, že jsou nejmenšími oocystami u savců (Fayer et al. 2008).

Lokalizace a vývoj: *Cryptosporidium ryanae* je lokalizováno ve střevě svého hostitele. Prepatentní doba je průměrně 11 dnů.

Patogenita: Gastrointestinální tkáň je bez poškození (Fayer et al. 2008).

Klinické příznaky: Onemocnění probíhá bez příznaků (de Graaf et al., 1999).

2.7.4 CRYPTOSPORIDIUM BOVIS

Hostitel: Byla zjištěna vnímavost skotu (Xiao et al. 2002; Santín et al. 2004) a dospělých ovcí v Západní Austrálii (Ryan et al. 2005).

Rozšíření: Telata od 2 měsíců do 11 měsíců stáří byla infikována *C. bovis* (Santín et al. 2004).

Morfologie: *Cryptosporidium bovis* je morfologicky k nerozeznání od *C. parvum* (Fayer et al. 2005). Oocysty jsou vylučovány zcela vysporulované se 4 sporozoity, ale chybí sporocysty.

Velikost: 4,6-5,4 × 4,2-4,8 μm

Lokalizace a vývoj: Prepatentní doba *C. bovis* je 10 dnů, patentní perioda je 18 dnů (Fayer et al. 2005).

Patogenita: Vzhledem k tomu, že nebyla přímo potvrzena lokalizace tohoto druhu v zažívacím traktu hostitelů, chybí relevantní informace o jeho patogenitě.

Klinické příznaky: Ve své studii zveřejnil de Graaf et al. (1999), že sledovaná telata nejevila žádné příznaky choroby.

2.7.5 OSTATNÍ DRUHY A GENOTYPY KRYPTOSPORIDIÍ

Vyjma výše uvedených druhů kryptosporidií byly popsány přirozené a experimentální infekce skotu i dalšími druhy a genotypy kryptosporidií (*C. suis*, *C. suis-like*, *C. hominis*, *C. felis*, *C. pig* genotyp II), nicméně vzhledem k jejich omezené infektivitě pro skot nepředstavují z epizootologického a epidemiologického hlediska výrazné nebezpečí (Xiao and Feng 2007). Experimentálně byl u telete zjištěn druh *C. canis* (Santín and Trout 2007).

2.8. VNITRODRUHOVÁ VARIABILITA RODU *CRYPTOSPORIDIUM*

Molekulární biologie nám umožňuje detekci a rozlišení rodu *Cryptosporidium* na určitý druh/genotyp a jejich subtypy. Nástroje molekulární biologie jsou stále více využívány k objasnění cest přenosu *Cryptosporidium* spp. mezi lidmi a zvířaty. Výsledky molekulární epidemiologické studie vedly k objasnění významu genotypů tohoto rodu pro veřejné zdraví a různé druhy zvířat. Genotypizace a subtypizace by měla vést k většímu a hlubšímu porozumění epidemiologie kryptosporidiózy jak u lidí tak u zvířat (Xiao et al. 2004; Xiao and Ryan 2004, 2008).

Analýza genu pro glykoprotein 60 (GP60) je široce používán v subtypizaci druhů *Cryptosporidium*, díky různorodosti sekvence a biologie parazitů. Je to jeden z nejvíce polymorfních markerů, který byl dosud identifikován v genomu *Cryptosporidium* (Gatei et al. 2006; Leoni et al. 2007; Wielinga et al. 2008). GP60 se nachází na povrchu apikální oblasti parazita ve fázi infekci a je jeden z dominantních cílů při odpovědi neutralizačních protilátek u člověka (O'Connor et al. 2007). Tím můžeme propojit biologickou charakteristiku a identitu rodiny. Některé z rodin *C. parvum*, Ila a IId, se vyskytují u lidí i přežvýkavců a oba jsou původci kryptosporidiózy.

Subtyp rodiny IId (dříve známý jako Ic), byl dosud nalezen jen u člověka (Alves et al., 2003; Xiao and Feng 2008).

2.8.1 SUBTYPY *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* (tabulka 1)

Rozsáhlé studium *C. parvum* u hospodářských zvířat, zejména telat, umožnilo pochopit mechanismus přenosu na člověka. Studie se zaměřila na sekvenční analýzu genu pro GP60. Výsledky těchto studií prokázaly, že telata jsou často infikovaná rodinou Ila, druhou nejvíce se vyskytující alelickou rodinou u lidí. Alela Ila je hlášena celosvětově (ve 26 zemích). Dalšími častými rodinami jsou IId a IId. Dále byly zaznamenány rodiny IId a IId-k, které se vyskytují vzácně.

Výskyt subtypů se liší v různých oblastech. Např. IlaA16G1R1 je hlavním subtypem Maďarska, Slovinska a Srbska. V Austrálii a ve Velké Británii byl nejčastěji nalezen subtyp IlaA18G3R1 (Xiao et al. 2007). Všechny subtypy genu pro GP60 popsané v Evropě a v Austrálii mají jednu opakující se kopii sekvence trinukleotidu ACATCA označovanou (R1). V Severní Americe mají tyto sekvence dvě kopie (Feltus et al. 2006; Trotz-Williams et al. 2006; Xiao et al. 2007). Sekvence

ACATCA subtypů rodiny IIa se opakuje po trinukleotidech a je zastoupena (R2) (R1 zastupuje většinu subtypů).

V Portugalsku, Španělsku, Německu a Srbsku byla nalezena rodina IId.

Subtypizace *C. parvum* byla provedena i u jiných hospodářských zvířat než u telat.

Subtypy rodiny IIa a IId byly nalezeny u ovcí v Belgii a Španělsku. Alela IId velmi převyšovala alelu IIa (Geurden et al. 2008).

Tabulka 1: Hlavní GP60 subtypy rodin a jejich sekvence (Xiao 2010)

druh	Alela	Dominantní opakující se trinukleotid	Číslo v GenBank
<i>C. parvum</i>	IIa	TCA, TCG	AY26034 (IIaA15G2R1), DQ192501 (IIaA15G2R2)
	IIb	TCA	AF402285 (IIbA14)
	IIc	TCA, TCG	AF164491 (IIcA5G3a), AF164501 (IIcA5G3b), EU095267 (IIcA5G3c), AF440636 (IIcA5G3d)
	IId	TCA, TCG	AY738194 (IIdA18G1)
	IIE	TCA, TCG	AY382675 (IIEA12G1)
	IIf	TCA	AY738188 (IIfA6)
	IIg	TCA	AY873780 (IIgA9)
	IIh	TCA, TCG	AY873781 (IIhA7G4)
	IIi	TCA	AY873782 (IIiA10)
	IIk	TCA	AB237137 (IIkA14)
	III	TCA	AM937006 (IIIA18)

SUBTYPY VYSKYTUJÍCÍ SE VE VELKÉ BRITÁNII

Výzkum probíhal v hrabství Chelshire ve Velké Británii. Cílem bylo zjistit přirozeně se vyskytující druhy/genotypy a prozkoumat způsoby přenosu. 54 vzorků bylo sekvenováno na lokusu 18S rRNA a 51 vzorků na části genu pro GP60. *Cryptosporidium parvum* bylo nalezeno v 50 vzorcích, *C. bovis* ve třech případech a jeden byl *Cryptosporidium deer-like*. Subtyp (IIaA15G2R1) byl rozšířen po celém sledovaném území. Další subtypy vyskytující se na farmách byly (IIa17G1R1, IIa16G3R1, IIa19G1R1, IIa14G2R1, IIa15G2R1, IIa18G1R1) (E. J. Brook et al. 2007).

SUBTYPY VYSKYTUJÍCÍ SE V NIZOZEMÍ

Parazit byl izolován z výkalů infikovaných lidí a dobytka. U lidí bylo zjištěno, že v 70 % se vyskytovalo *C. hominis*, z 19 % *C. parvum*, 10 % jak *C. hominis* tak *C. parvum* a 1 % *C. felis*. U skotu se ze 100 % vyskytovalo *C. parvum*. Pomocí části genu pro GP60 byly zjištěny čtyři varianty *C. hominis* (převážně subtyp IbA10G2) a čtyři varianty *C. parvum* (nejvíce subtyp IIaA15G2R1) (R. Wielinga et al. 2007).

SUBTYPY VYSKYTUJÍCÍ SE V MAĎARSKU

V rámci výzkumu bylo odebráno 79 vzorků z 52 zemědělských podniků z různých okresů Maďarska. Bylo zjištěno 21 vzorků *C. parvum*, 1 *Cryptosporidium* deer-like. Pomocí genu pro GP60 se nejčastěji vyskytoval subtyp *C. parvum* (IIaA18G1R1). Tyto výsledky potvrdily, že dobytek může být zdrojem nákazy pro člověka (Plutzer et al. 2007).

SUBTYPY VYSKYTUJÍCÍ SE VE ŠVÉDSKU

Proběhla molekulární analýza u 176 odstavených telat a krav ze 48 stád. Výsledky ukázaly výskyt *C. bovis* v 83 případech, 15 *C. parvum*, 10 *C. ryanae* a ve dvou vzorcích *C. andersoni*. *Cryptosporidium parvum* bylo dále analyzováno pomocí části genu pro GP60, bylo analyzováno 13 z 15 vzorků.

Subtypy byly pojmenovány podle klasifikace, kterou navrhl Sulaiman et al. (2005). Bylo identifikováno 8 z obou subtypů rodin IIa a IId. Vyskytly se čtyři subtypy v rodinách IIa a šest subtypů v rodině IId. Izoláty patřily k subtypům IIaA18G1R1, IIdA20G1 a IIdA22G1 (Silverlas et al. 2010).

SUBTYPY VYSKYTUJÍCÍ SE V ČESKÉ REPUBLICE

Bylo odebráno 995 vzorků z poraženého mléčného skotu (ve stáří 6 měsíců a více) v průběhu dvou let (2007 až 2008). Největší výskyt infekce se objevil u zvířat ve věkové skupině 12-18 měsíců. Byl prokázán výskyt *C. andersoni* (4,1%), *C. bovis* (0,2%) a *C. parvum* (0,1%). *Cryptosporidium bovis* bylo zjištěno pouze ve skupině zvířat starších 18 měsíců. Nebyla prokázána sezónní závislost. Sekvenční analýza GP60 ukázala, že *C. parvum* patřilo do subtypu IIaA16G1R1 (Kváč et al. 2009).

SUBTYPY VYSKYTUJÍCÍ SE V CHORVATSKU

V Chorvatsku nebyly vedeny žádné studie na epidemiologii rodu *Cryptosporidium* a jeho subtypizaci. V roce 2009 byla provedena analýza 29 izolátů na části genu pro GP60 a byly identifikovány tři *C. parvum*, dva *C. hominis* a jeden *C. meleagridis*. U *C. parvum* byly nalezeny 3 rodiny, Ila se dvěma subtypy, IId s jedním subtypem a IId se čtyřmi subtypy (Hijjawi et al. 2009).

V tabulce 2 je uveden přehled výskytu subtypů GP60 druhu *C. parvum* další státech světa.

Tabulka 2: Přehled subtypů *Cryptosporidium parvum* s GP60 v některých státech světa.

Země	Subtypy Ila		Jiné subtypy	Reference
	Hlavní subtypy	Ostatní subtypy		
Spojené státy	IlaA15G2R1 (135)	IlaA15G2R2 (11), IlaA11G2R1 (11), IlaA18G2R1 (10), IlaA17G2R1 (7), IlaA19G2R1 (4)		Xiao et al. (2007)
Kanada	IlaA15G2R1 (10)	IlaA16G2R1 (9), IlaA16G3R1 (8), IlaA16G1R1 (4), IlaA13G2R1 (2), IlaA17G2R1 (2), IlaA18G3R1 (1)		Trotz-Williams et al. (2006)
Slovinsko	IlaA15G2R1 (27)	IlaA16G1R1 (6), IlaA16R1 (3)	IIIA16 (2) IIIA18 (2)	Soba and Logar (2008)
Austrálie	IlaA18G3R1 (43)	IlaA16G3R1 (3), IlaA19G4R1 (2), IlaA17G2R1 (1), IlaA20G3R1 (1), IlaA121G3R1 (1)		Ng et al. (2008)
Německo	IlaA15G2R1 (106)	IlaA14G2R1 (2), IlaA17G2R1 (2), IlaA18G2R1 (2), IlaA21R1 (1), IlaA22G1R1 (1), IlaA16G1R1 (1)	IIdA22G1 (1)	Broglia et al. (2008)
Itálie	IlaA15G2R1 (106)	IlaA18G2R1 (10), IlaA17G2R1 (9), IlaA14 (5), IlaA13 (4)		Duranti et al. (2008)
Portugalsko	IlaA15G2R1 (61)	IlaA16G2R1 (7)	IIdA17G1 (4)	Alves et al. (2006)
Španělsko	IlaA15G2R1 (106)	IlaA16G3R1 (14), IlaA18G3R1 (8), IlaA16G2R1 (1), IlaA17G2R1 (4), IlaA19G3R1 (2)	IIdA23G1 (2)	Quilez et al. (2008)

Čísla v závorce značí počet subtypů.

3. CÍLE

Cílem této bakalářské práce je:

- Vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidiových infekcí ve vybraných chovech skotu v České republice u telat do dvou měsíců stáří.
- Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp kryptosporidií.
- Porovnat vnitrodruhovou variabilitu *Cryptosporidium parvum*.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH CHOVŮ

Parazitologické sledování probíhalo převážně v Jižních Čechách s výjimkou jednoho chovu nacházejícího se na Jižní Moravě v období roku 2009. Byla vyšetřována telata v průměru od jednoho do osmi týdnů stáří.

4.1.1 POPIS JEDNOTLIVÝCH CHOVŮ

CHOV č. 1 – AGRIPRO MUNICE, Hluboká nad Vltavou

Plemeno: HOLŠTÝNSKÝ SKOT

Technologie: Telata byla ustájena skupinově ve dvou velkých kotcích, které byly v uzavřeném prostoru. I přesto, že byla stáj ze všech stran chráněna, byl zde velký problém s průvanem a vlhkem.

Odebráno bylo celkem 30 vzorků ve dnech 16. 2. 2009 a 21. 4. 2009

CHOV č. 2 – ZD AGRA BŘEZNICE, Březnice u Bechyně

Plemeno: HOLŠTÝNSKÝ SKOT

Technologie: Telata byla ustájena ve velké kryté hale odděleně. Byla ustájena vedle sebe, oddělené dřevěnými přepážkami.

Bylo odebráno celkem 24 vzorků ve dnech 28. 2. 2009 a 1. 11. 2009

CHOV č. 3 – AGROPROFIT ORTVÍNOVICE

Plemeno: HOLŠTÝNSKÝ SKOT, ČERVENÝ STRAKATÝ SKOT

Technologie: Telata byla ustájena ve Staimanových boudách s plastovými přístřešky venku.

Bylo odebráno 18 vzorků ve dnech 31. 3. 2009 a 23. 7. 2009

CHOV č. 4 – ZD LEDENICE

Plemeno: HOLŠTÝNSKÝ SKOT

Technologie: Telata byla ustájena ve Staimanových boudách venku.

Bylo odebráno 13 vzorků dne 31. 3. 2009

CHOV č. 5 – ZD OLEŠNÍK

Plemeno: HOLŠTÝNSKÝ SKOT, ČERVENÝ STRAKATÝ SKOT

Technologie: Telata byla ustájena v boudách podobných Staimanovým boudám. Boudy byly kryty ze všech stran dřevem a přiléhala jedna na druhou.

Bylo odebráno 15 vzorků dne 21. 4. 2009

CHOV č. 6 – ZD BULHARY, Jižní Morava

Plemeno: HOLŠTÝNSKÝ SKOT, ČERVENÝ STRAKATÝ SKOT

Technologie: Telata byla ustájena ve Staimanových boudách s dřevěnou konstrukcí venku.

Bylo odebráno 12 vzorků dne 19. 6. 2009

CHOV č. 7 – ZD MŘÍČÍ

Plemeno: HOLŠTÝNSKÝ SKOT, ČERVENÝ STRAKATÝ SKOT

Technologie: Telata ustájena ve Staimanových boudách s železnou konstrukcí.

Bylo odebráno 11 vzorků dne 7. 7. 2009

CHOV č. 8 – ZD KOROSEKY

Plemeno: ČERVENÝ STRAKATÝ SKOT

Technologie: Telata ustájena ve Staimanových boudách s plastovými stěnami a železnou konstrukcí.

Bylo odebráno 5 vzorků dne 7. 7. 2009

CHOV č. 9 – ZD LIBÍN

Plemeno: HOLŠTÝNSKÝ SKOT, ČERVENÝ STRAKATÝ SKOT

Technologie: Telata byla ustájena ve Staimanových boudách s plastovými stěnami.

Bylo odebráno 12 vzorků dne 23. 7. 2009

CHOV č. 10 – ZD HAKLOVY DVORY

Plemeno: HOLŠTÝNSKÝ SKOT, ČERVENÝ STRAKATÝ SKOT

Technologie: Telata byla ustájena ve Staimanových boudách s plastovými stěnami a železnou konstrukcí. Rozmístění bud bylo maximálně 50 cm.

Bylo odebráno celkem 21 vzorků ve dnech 13. 8. 2009 a 1. 12. 2009

4.1.2. NOMENKALTURA SUBTYPŮ *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

Název subtypů genu pro GP60 začíná označení subtypu rodiny (alely) (IIa, IIb, IIc, IId atd. dle abecedního pořadí pro *C. parvum*), dále následuje počet TCA (označeno písmenem A), nebo TCG (zastoupeno písmenem G), nebo TCT (zastoupeno písmenem T) kódující aminokyselinu serin, a to se opakuje (Sulaiman et al. 2005). Například: název IIdA22G1 uvádí, že parazit je součástí druhu *C. parvum*, alela IId, s 22 opakujícími se kopiemi TCA a 1 kopií TCG v genu GP60.

Alela u *C. parvum* má buď jednu kopii sekvence ACATCA označovanou jako R1 nebo dvě kopie sekvence ACATCA, které se opakují po trinukleotidu s označením R2 (Sulamian et al. 2005; Xiao et al. 2010).

V případě alely IIC, mají všechny subtypy pět kopií TCA a tři kopie TCG, které se opakují: IICa5G3. Pro prvně popsanou alelu IIC bylo přiřazeno pojmenování IICa5G3a. Alelám, které se od této sekvence lišily, bylo přiřazeno další abecední pojmenování, například IICa5G3b.

4.2 ODBĚR VZORKŮ PRO PARAZITOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Odběry vzorků byly prováděny v nepravidelných intervalech v roce 2009. Vzorky byly odebírány přímo z rekta telete a vkládány do plastových kelímků. Kelímky byly označeny číslem a poté uchovány v chladu a do 24 hodin po odběru vyšetřeny metodou dle Miláčka a Vítovců (1985).

4.3 METODA BARVENÍ OOCYST

BARVENÍ OOCYST KRYPTOSPORIDIÍ ANILIN-KARBOL-METHYL-VIOLETÍ DLE MILÁČKA A VÍTOVCE (1985)

ZÁSOBNÍ ROZTOKY:

Roztok anilin-karbol-methyl-violetí

0,6 g methyl violeti

1 ml anilinu

1 g fenolu

30 ml 96% alkoholu

70 ml deionizované vody

Roztok tartrazinu

1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

Kyselina sírová

2% kyselina sírová

PRACOVNÍ POSTUP:

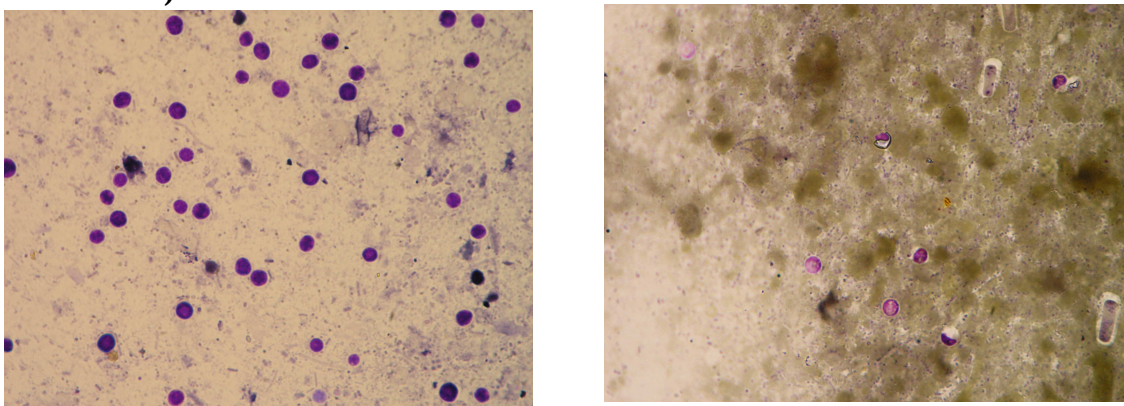
- 1) Vzorky výkalů natřít na podložní sklíčko, fixovat methanolem v plameni
- 2) Barvit anilin-karbolmethyl-violetí po dobu 30 minut.
- 3) Omýt pod tekoucí vodou.
- 4) Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 2 minut.
- 5) Omýt pod tekoucí vodou.

- 6) Dobarvit tartrazinem po dobu 1-2 minut.
- 7) Omýt tekoucí vodou.
- 8) Osušit, následně vyšetřit ve světelném mikroskopu při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

VÝSLEDKY BARVENÍ:

Oocysty se barví modrofialově na žlutooranžovém pozadí (**obrázek 2**). Preparáty byly vyšetřeny mikroskopem OLYMPUS BX51 při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Obrázek 2 – výsledky pozorování pod mikroskopem (foceno fotoaparátem OLYMPUS)



4.4 IZOLACE DNA

Celková DNA byla extrahována přímo z trusu pozitivního na oocysty kryptosporidií pomocí komerčního kitu QIAMP® DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

K 200 mg trusu bylo do mikrozkuřavky přidáno 200 µl ASL pufru a 100 mg skleněných kuliček (Ø 0,5 mm). Dále následovalo rozbíjení oocyst pomocí homogenizátoru (FASTPREP® - 24 Instrument MP Biomedicals, USA) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s. Dále bylo postupováno dle návodu, který je součástí kitu. Získaná DNA byla skladována při teplotě -20 °C.

4.5 GENOTYPIZACE IZOLÁTŮ *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Byl použit nested PCR protokol pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) a glykoprotein 60 (GP60) (Jiang et al. 2005). Objem reakční směsi pro jednotlivé polymerázové reakce byl 20 µl (tabulka č. 3).

Primery pro amplifikaci SSU

Primární primery:

F 5' - TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG -3

R 5' - CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA -3'

Sekundární primery:

F5' - GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG -3'

R5' - CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A -3'

Primery pro amplifikaci GP60

Primární primery:

F 5' - ATA GTC TCC GCT GTA TTC -3

R 5' - GGA AGG AAC GAT GTA TCT -3'

Sekundární primery:

F5' - TCC GCT GTA TTC TCA GCC -3'

R5' - GCA GAG GAA CCA GCA TC -3'

Tabulka č. 3: REAKČNÍ SMĚS PRO PCR PROTOKOL PRO AMPLIFIKACI ČÁSTI GENU PRO MALOU RIBOZOMÁNI PODJEDNOTKU

	<i>Primární reakce</i>		<i>Sekundární reakce</i>	
	koncentrace	Objem (μl)	koncentrace	Objem (μl)
H ₂ O	-	11,3	-	13,1
MgCl ₂	25 mM	1,2	25 mM	1,2
10×buffer	-	2,0	-	2,0
dNTP	10 mM	0,4	10 mM	0,4
Primer forward	10 μM	0,4	10 μM	0,4
Primer reverse	10 μM	0,4	10 μM	0,4
BSA	10 mg/ml	0,8	-	-
Taq	1U/μl	0,5	1U/μl	0,5
DNA	-	3,0	-	2,0
CELKEM	-	20	-	20

AMPLIFIKAČNÍ PROGRAM PRO TERMOCYCLER (Bioer, Krd) PRO DVOJICI PRIMERŮ (celkem 35 cyklů)

Počáteční denaturace	94°C	3 min.
Denaturace	94°C	45 s
Nasedání primerů SSU	55°C	45 s
Nasedání primerů GP60	50°C	45 s
Dosyntetizování nového řetězce	72°C	60 s
Finální extenze	72°C	7 min.

GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Velikost PCR fragmentů byla ověřována gelovou elektroforézou. Výsledný produkt PCR byl určen na 1,5% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (302 nm).

POUŽITÉ CHEMIKÁLIE:

TAE pufr

Agaróza

Ethidium-bromid

100 bp DNA Ladder

PRACOVNÍ POSTUP:

- 1) Smíchat agarózu s TAE pufrem, nechat rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou na teplotu přibližně 50 °C.
- 2) Přidat ethidium-bromid.
- 3) Gel nalít do předem připravené formy, vložit hřeben a nechat ztuhnout.
- 4) Gel vložit do elektroforetického tanku naplněného TAE pufrem a do vzniklých jamek nanést 10 µl PCR sekundárního produktu a 2×10 µl ladderu.
- 5) Nastavit napětí na 70 V a spustit do doby separace fragmentů DNA.
- 6) Pro vizualizaci DNA fragmentů použít UV transiluminátor.

PCR-RFLP ANALÝZA KRYPTOSPORIDIÍ

Pro restrikční analýzu bylo použito 10 µl sekundárního PCR produktu do 30 µl reakce obsahující 5 U SspI restrikčního enzymu a 3 µl restrikčního pufru. Inkubace trvala 8 hodin při 37 °C.

SEKVENACE VZORKŮ

Byla provedena přímá sekvenace PCR produktů (GP60) pomocí sekundárních primerů v Laboratoři genomiky – BC AV ČR, v.v.i.

Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank.

5. VÝSLEDKY

5.1. VÝSKYT KRYPTOSPORIDIÍ VE SLEDOVANÝCH CHOVECH

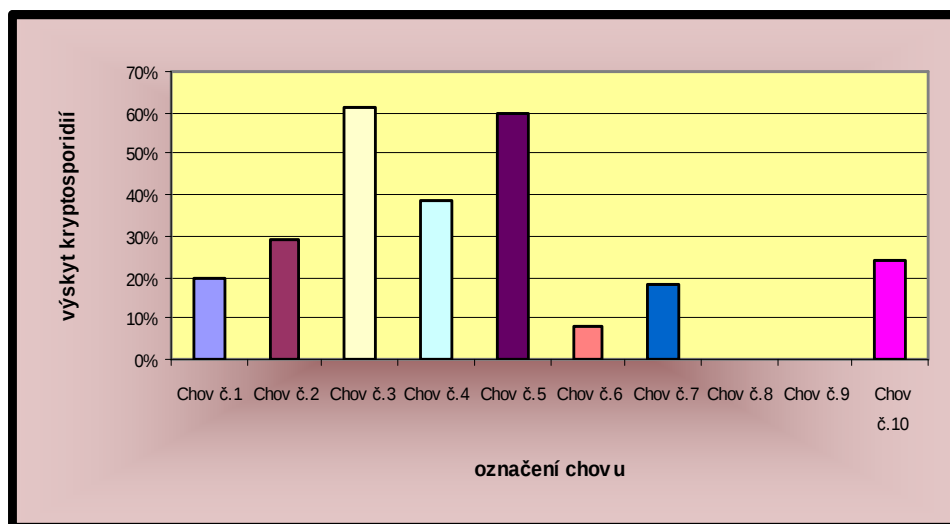
V průběhu sledování bylo vyšetřeno 161 vzorků trusu z 10 chovů. Bylo odebráno 49 vzorků trusu od býčků a 112 vzorků od jaloviček. Všechny chovy byly zaměřené na mléčnou užitkovost.

Celkem bylo zjištěno 47 vzorků pozitivních na kryptosporidie, tedy 29,2 % z celkového počtu odebraných vzorků. Na základě mikroskopického vyšetření byly kryptosporidiové infekce nalezeny v 8 z 10 sledovaných chovů.

Přehled procentuálního zastoupení pozitivních nálezů kryptosporidií je znázorněn v grafu 1.

Nevyšší výskyt kryptosporidií (60 %) byl zaznamenán v chovech č. 3 a 5, naopak žádná infekce nebyla nalezena v chovech č. 8 a 9.

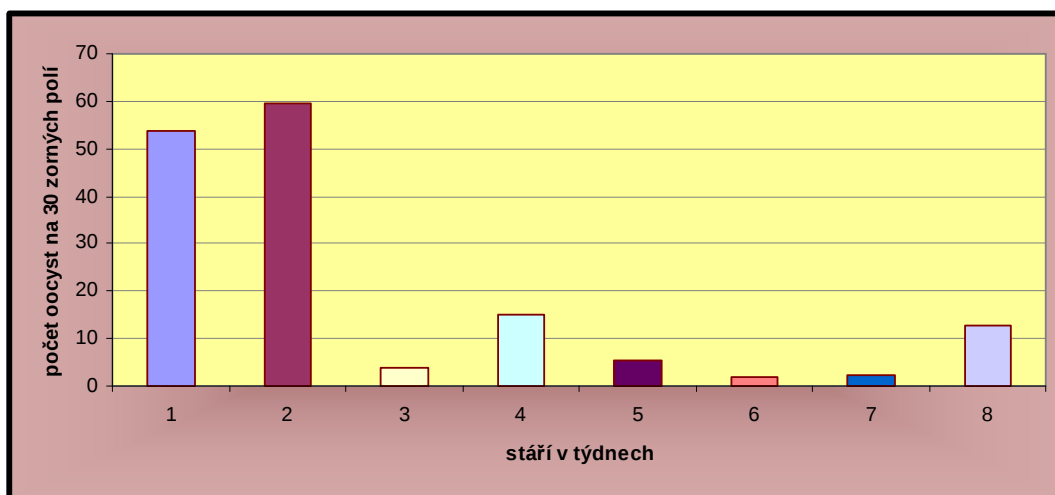
Graf 1. Procentuelní výskyt kryptosporidií ve sledovaných chovech



5.2. VÝSKYT KRYPTOSPORIDIOVÝCH INFEKČÍ V ZÁVISLOSTI NA STÁŘÍ TELAT

Nejmladší telata, u kterých byla nalezena infekce kryptosporidii byla stará jeden týden. Nejvyšší intenzita infekce charakterizovaná počtem oocyst na 30 zorných polí byla zaznamenána u telat ve věku 2 týdnů. U starších zvířat byla intenzita infekce velmi nízká. Nejslabší intenzita infekce byla u telat ve věku 6 týdnů. Celkový přehled intenzity infekce v závislosti na stáří telete je znázorněn v grafu 2.

Graf 2. Přehled průměrných intenzit infekce v závislosti na věku telat



5.3. ZÁVISLOST VÝSKYTU KRYPTOSPORIDIÍ NA TECHNOLOGII USTÁJENÍ

Na základě výsledků výskytu kryptosporidiových infekcí v jednotlivých chovech s odlišnými technologiemi ustání bylo zjištěno, že nejnižší promořenost byla v chovech, kde byla telata umístěna ve Staimanových boudách se zamezeným přímým kontaktem zvířat mezi sebou. Naopak v chovech, kde byl umožněn zvýšený kontakt (Staimanovy boudy umístěné v těsné blízkosti) byl zaznamenán vyšší výskyt kryptosporidií (tabulka 4).

Tabulka 4. Výskyt kryptosporidií v závislosti na technologii ustájení

	<i>Staimanovy boudy (možný kontakt)</i>	<i>Staimanovy boudy (kontakt zamezen)</i>	<i>Skupinové ustájení</i>
<i>počet chovů</i>	5	3	2
<i>n vzorků</i>	76	51	34
<i>n pozitivních vzorků</i>	24	13	10
<i>% výskytu</i>	31,5 %	25,3 %	29,4 %

n = počet vzorků

Staimanovy boudy (možný kontakt) = telata měla přímý nebo alespoň částečný kontakt mezi sebou

Staimanovy boudy (kontakt zamezen) = telata neměla žádnou možnost kontaktu se sousedícími telaty

5.4 SEZÓNŇÍ VÝSKYT KRYPTOSPORIDIÍ

Největší nález oocyst kryptosporidií byl zaznamenán na jaře, čemuž mohlo přispívat kolísání teplot, což pravděpodobně parazitům prospívalo. Na podzim byl výskyt kryptosporidiových infekcí nejnižší (tabulka 5).

Tabulka 5: Vliv sezóny na výskyt kryptosporidiových infekcí u telat do věku 2 měsíců

	<i>Jaro</i>	<i>Léto</i>	<i>Podzim</i>	<i>Zima</i>
<i>n chovů</i>	5	4	2	3
<i>n vzorků</i>	68	37	25	31
<i>n pozitivních vzorků</i>	28	11	2	6
<i>% výskytu</i>	41,2 %	29,7 %	8 %	19,4 %

n = počet vzorků

5.5. GENOTYPIZACE KRYPTOSPORIDIÍ

Z celkového počtu 47 vzorků pozitivních na kryptosporidie bylo 22 vzorků genotypizováno na části genu pro glykoprotein 60 a malou podjednotku rRNA. Bylo zjištěno, že se ve všech pozitivních chovech vyskytovalo pouze *Cryptosporidium parvum*. V jednotlivých chovech se vyskytoval vždy jen jeden subtyp druhu *C. parvum*, nikdy nebyly nalezeny dva odlišné subtypy. Ve sledovaných chovech byly zjištěny 3 různé subtypy patřící do rodiny IIa. Nejčastěji se vyskytoval subtyp

IIaA15G2R1 a to v 10 případech, následoval subtyp IIaA20R1 v 6 případech a IIaA18G1R1 ve 4 případech. Nejčastější subtyp IIaA15G2R1 byl nalezen ve 3 chovech a ostatní subtypy vždy v jednom z chovů (tabulka 6.)

Tabulka 6: Přehled subtypů v jednotlivých chovech.

	<i>Farma</i>	<i>n</i>	<i>C. parvum</i>	<i>No. of subtypes</i>	<i>C. parvum subtype</i>
<i>Stámanovy boudy</i>	OL	15	5	1	IIaA18G1R1[4]
	LB	12	1	1	IIaA15G2R1 [1]
	OR	18	6	1	IIaA20R1 [6]
	BU	12	0	0	-
	MR	11	3	1	IIaA15G2R1 [3]
	LE	13	0	0	-
	HD	21	3	1	IIaA15G2R1 [2]
	KO	5	0	0	-
<i>Kravín</i>	MU	30	4	1	IIaA15G2R1 [4]
	BR	24	0	0	-

n = počet odebraných vzorků

OL = Olešník

LB = Libín

OR = Ortvínovice

BU = Bulhary

MR = Mříčí

LE = Ledenice

HD = Haklovy Dvory

KO = Koroseky

MU = Munice

BR = Březnice

6. DISKUZE

V této práci bylo zjištěno, že z celkového počtu 161 vyšetřených zvířat bylo 41 telat pozitivních na kryptosporidie, tedy 29,2 % z celkového počtu. Na základě molekulární analýzy bylo zjištěno, že telata byla nakažena pouze druhem *C. parvum*. Naše výsledky se výrazně liší od ostatních publikovaných prací, v kterých byl zjištěn výskyt i dalších druhů kryptosporidií (*C. andersoni*, *C. bovis*, *C. ryanae*) u zmíněné věkové kategorie telat (Santín et al. 2008; Silverlas et al. 2010).

Cryptosporidium parvum se vyskytovalo v chovech mléčného skotu v rozsahu od 0 do 60 %, což odpovídá výsledkům publikovaným v USA (Santín et al. 2008), kdy byl popsán výskyt *C. parvum* v rozsahu 4,4 až 61,5 %.

Nejmladší infikovaná telata byla stará jeden týden. Tyto výsledky jsou v souladu s údaji Fayer et al. (1998) a O'Handley et al. (1999), kteří zjistili, že telata se obvykle nakazí druhem *C. parvum* v 1 až 4 týdnech věku. U telat do 4 dnů stáří nebyla prokázána infekce *C. parvum* (Sturdee et al. 2003). V naší práci byla zjištěna nejvyšší prevalence kryptosporidiových infekcí u telat ve věku 2 týdnů. Obdobné výsledky publikovali Castro-Hermida et al. (2002), Huetink et al. (2001), Kváč et al. (2006), Nydam et al. (2001), Santín et al. (2004).

Způsob chovu a zvolená technologie ustájení se v některých chovech liší a tím může značně ovlivnit dynamiku výskytu *C. parvum*. V této práci jsme prokázali, že pokud byla telata ustájena společně v boxech, infekce způsobené *C. parvum* se vyskytovaly poměrně často. To je pravděpodobně zapříčiněno přímým kontaktem zvířat, pokud se ve skupině objeví jen jedno nakažené tele, je téměř 100% jistota, že se nakazí zbytek skupiny. V chovech, kde byl zaveden systém Staimanových bud a byly dodržovány předepsané technologické parametry, snížil se výskyt *C. parvum*. K zabránění přímého styku mezi telaty je postačující vzdálenost cca. 0,5 až 1 metr mezi boudami. K obdobným výsledkům dospěli i Kváč et al. (2006) kteří zjistili, že pokud byla telata ustájena v individuálních boxech a měla kontakt s ostatními telaty byl výskyt kryptosporidií vyšší než u telat ustájených ve stáji spolu s matkami do 2 – 5 dnů po narození a až poté přemístěna do kotců po 3 – 5 kusech na farmách mléčného skotu. Pokud měla telata omezený vzájemný kontakt mezi sebou, byla prevalence *C. parvum* statisticky nižší oproti jiným technologiím. K rychlému rozšíření kryptosporidiové infekce vyvolané *C. parvum* v chovech s nevhodnou technologií výrazně přispívá vysoká odolnost oocyst rodu *Cryptosporidium* vůči podmínkám vnějšího prostředí (Kváč et al. 2006) a neustálé zařazování nových a vnímavých telat

do chovu. Z těchto důvodů je mnohem nižší prevalence výskytu *C. parvum* v chovech zaměřených na masná plemena skotu (Fayer et al. 1997; Mohammed et al. 1998; Atwill et al. 1999; Kváč et al. 2006).

Nejen u telat, ale i u dalších hospodářských zvířat je diskutován sezónní výskyt kryptosporidiových infekcí. Celkově se názory na tuto problematiku výrazně liší. V této práci bylo zjištěno, že největší výskyt kryptosporidiových infekcí byl na jaře, kdy bylo 41,2 % pozitivních telat a nejméně se infekce vyskytovaly na podzim, kdy bylo nakaženo pouze 8 % zvířat. Jedním z důvodů, proč je největší výskyt na jaře může být vysoká vlhkost a střídání chladnějších dnů s teplejšími. Naopak Kváč et al. (2009) ve své práci publikovali, že nejvyšší prevalence kryptosporidiózy byla oproti našim zjištěným výsledkům v zimě (5,6 %) a nejméně se kryptosporidie vyskytovaly v průběhu jara (2,3 %).

Molekulární analýzou vybraných vzorků byla zjištěna příslušnost všech subtypů *C. parvum* do rodiny IIa. Tato alela patří mezi celosvětově nejrozšířenější rodiny infikující telata (Alves et al. 2003, 2006; Peng et al. 2003; Stantic-Pavlinic et al. 2003; Xiao et al. 2003; Chalmers et al. 2005; Trotz-Williams et al. 2006). V námi sledovaných chovech se vyskytoval vždy jen jeden subtyp patřící k alelické rodině IIa. Celkem byly prokázány tři různé subtypy *C. parvum*. Nejčastěji se vyskytoval subtyp IIaA15G2R1. Tyto výsledky jsou v souladu s daty zjištěnými ve Velké Británii (Brook et al. 2007) nebo v Nizozemí (Weling et al. 2007), kde byl tento subtyp také dominantní. Obdobné výsledky byly zjištěny v Portugalsku, kde byly u telat nalezeny rodiny IIa a IIc, přičemž alela IIc byla zjištěna pouze v jednom případě (Alves et al. 2006). V Německu se také vyskytovala nejčastěji rodina IIa, subtypu IIa15G2R1, který má zastoupení po celém světě v chovu s mléčnou produkcí (Stantic-Pavlinic et al. 2003). Druhým nejčastějším subtypem vyskytujícím se ve sledovaných chovech byl subtyp IIa18G1R1. Oproti našim výsledkům je tento subtyp nejčastější u telat v Maďarsku (Plutzer et al. 2007) a ve Švédsku (Silverlas et al. 2010). V jiných studiích provedených v letech 2007 a 2008 v České republice, byl zjištěn výskyt subtypu IIaA16G1R1 u dospělého skotu a prasat (Kváč et al. 2007, 2008). Tento subtyp nebyl u telat sledovaných v naší studii prokázán.

7. ZÁVĚR

Na základě výsledků bylo zjištěno, že ve sledovaných chovech se vyskytovalo pouze *Cryptosporidium parvum*, ostatní druhy nebyly prokázány. Byly zjištěny celkem 3 subtypy *C. parvum*, kdy nejčastěji se vyskytoval subtyp IIaA15G2R1 celkem v 10 případech.

Nejsilnější infekce *C. parvum* byla na základě studií prokázána u telat ve stáří dvou týdnů. Oproti tomu nejslabší invaze byla u telat ve věku 6 až 7 týdnů.

Výskyt *C. parvum* byl největší u telat, která byla ustájena ve Staimanových boudách, kde nebyly dodrženy správné technologické parametry. Byly rozestavěny těsně vedle sebe a tím byl zapříčiněn blízký kontakt mezi sousedícími telaty. Volné skupinové ustájení se také neprokázalo jako nejvhodnější.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- ALVES M., XIAO L., ANTUNES F., MATOS O., 2006: Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol. Res.*, 99;287–292.
- ALVES M., XIAO L., SULAIMAN I., LAL A. A., MATOS 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.
- ATWILL E. R., JOHNSON E., KLINGBORN D. J., 1999: Age, geographic and temporal distribution of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow calf herds. *Am. J. Vet. Res.*, 60;420–425.
- BROOK E. J., HART C. A., FRENCH N. P., CHRISTLEY R. M., 2007: Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Vet. J.*, 179;378–382.
- BUKHARI Z., HARGY T. M., BOLTON J. R., DUSSERT B., CLANCY J. L., 1999: Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium-pressure ultraviolet light. *J. Am. Water Works Assoc.*, 91;86–94.
- CARRENO R. A., SCHINITZLER B. E., JEFFRIES A. C., TENTER A. M., JOHNSON A. M., BARTA J. R., 1999: *Cryptosporidium* is more closely related to gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res.*, 85;899–904.
- CASTRO-HERMIDA J. A., GONZALEZ-LOSADA Y. A., MEZO-MENENDEZ M., ARES-MAZAS E., 2002: A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Vet. Parasitol.*, 106;11–17.
- CLANCY R. T., SANDOR J., 1998: CO₂ ice clouds in the upper atmosphere of Mars, *Geophys. Res. Lett.*, 25;489–492.
- CURRENT W. L., BLACKBURN B. L., 1990: *Cryptosporidium*: infections in man and domesticated animals. In: *Coccidiosis of man and domestic animals*. Long P. L. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 155–185.
- DE GRAAF D. C., VANOPDENBOSCH E., ORTEGA-MORA L. M., ABBASSI H., PEETERS J. E., 1999: A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.*, 29;1269–1287.

- DJURETIC T., WALL P. G., NICHOLLS G., 1997: General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992-1996. *Acta Paediatr Suppl.*, 88 (426):38-41.
- DOLEJŠ P., 2004: *Cryptosporidium* a *Giardia* –přehled vodárenské problematiky za první desetiletí po událostech v Milwaukee (USA). Sborník konference s mezinárodní účastí Pitná voda, SvF STU Bratislava 2004. s. 89-94.
- ESTEBAN E., ANDERSON B. C., 1995: *Cryptosporidium muris*: Prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *J. Dairy Science*, 78;1068–1072.
- FAYER R., 2004: *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.*, 126;37–56.
- FAYER R., 2010: Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.*, 124;90–97.
- 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., SANTIN M., TROUT J. M., 2008: *Cryptosporidium raynae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae in cattle (*Bos taurus*)). *Vet. Parasitol.*, 156;191–198.
- FAYER R., SANTIN M., XIAO L., 2005: *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae in cattle (*Bos taurus*)). *Am. Soc. Parasitol.*, 91; 624–629.
- FAYER, R., TROUT J. M., NERAD T., 1996: Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Fucar. Microbiol.*, 43;64.
- FAYER R., TROUT J. M., GRACZYK T. K., LEWIS E. J., 2000: Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on 3 Maryland farms. *Vet. Parasitol.*, 93;103–112.
- FAYER, R., Xiao L 1997: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis -- 2nd ed. CRC Press, Boston, MA. 564 pp.
- FELTUS D. C., GIDDINGS C. W., SCHNECK B. L., MONSON T., WARSHAUER D., MCEVOY J. M., 2006: Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in Wisconsin. *J. Clin. Mikrobiol.*, 44;4303–4308.

FENG Y., ORTEGA Y., HE G., DAS P., XU M., ZHANG X., FAYER R., GATEI W., CAMA V., XIAO L., 2007: Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Parasitol.*, 144;1–9.

FLANIGAN T. P. SOAVE R., 1993: "Cryptosporidiosis." *Prog Clin Parasitol*, 1–20.

GATEI W., HART C. A., GILMAN R. H., DAS P., CAMA V., XIAO L., 2006: Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*. *J. Eukar. Mikrobiol.*, 53;43–48.

GELLETLIE R, START J., SOLTANPOOR N., ARMSTRONG R., NOCHOLS G., 1997: Cryptosporidiosis associated with school milk. *The Lancet*, 350;1005–1006.

GOODGAME R. W., 1996: "Understanding intestinal spore-forming protozoa: cryptosporidia, microsporidia, isospora, and cyclospora." *Ann. Intern. Med.*, 124; 429-441.

HANZLÍKOVÁ D., 2008: Kryptosporidiové a mikrosporidiové infekce v chovech prasat. Diplomová práce, 64.

HEINE J., POHLENZ J. F. L., MOON H. W., WOODE G. N., 1984: Enteric lesions and diarrhoea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *J. Infect. Dis.*, 150;768–775.

HEYWORTH, M. F., 1992: "Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections." *J. Infect. Dis.*, 166;465–472.

HIJJAWI N., MELONI B., P., RYAN U. M., OLSON M. E., THOMPSON R. C. A., 2002: Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the classification of *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.*, 32;1719–1726.

HIJJAWI N., NG J., YANG RATOUM., MANAR F.M., RYAN U., 2010: Identification of rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in human isolates from Jordan. *Vet. Parasitol.*, *impress.*

HUETINK R. E., VAN DER GIESSEN J. W., NOORDHUIZEN J. P., PLOEGER H. W., 2001: Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet. Parasitol.*, 102;53–67.

CHALMERS, R. M., FERGUSON, C., CACCIO` S., GASSER, R. B., ABS EL-OSTA, Y. G., HEIJNEN, L., XIAO, L., ELWIN, K., HADFIELD, S., SINCLAIR, M., STEVENS, M., 2005: Direct comparison of selected methods for genetic categorization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *Int. J. Parasitol.*, 35;397–410.

- ISEKI M., 1986: Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. Jap. J. Parasitol., 35;521–526.
- ISEKI M., MAEAKAWA T., MORIYA K., UNI S., TAKADA S., 1989: Infectivity of *Cryptosporidium muris* in various laboratory animals. Parasitol. Res., 75;218–222.
- JEX A. R., GASSER R. B., 2010: Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies - Research review. Biotechnology Advances, 28;17–26.
- KEUSCH G. T., HAMER D., JOE A., KELLEY M., GRIFFITHS J., WARD H., 1995: "Cryptosporidia--who is at risk?" Schweiz. Med. Wochenschr., 125;899–908.
- KOUDELA B., MODRÝ D., VÍTOVEC J., 1998: Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolates from cattle. Vet. Parasitol., 76;181–188.
- KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., 2005: Druhy a genotypy parazitující u skotu. Veterinářství, 55;356–358.
- KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., SALÁT J., DITRICH O., 2007: Viability staining and animal infectivity of *Cryptosporidium andersoni* oocysts after long-term storage. Vet. Parasitol., 100;213–217.
- KVÁČ M., KOUBA M., VÍTOVEC J., 2006: Výskyt *Cryptosporidium parvum* a *C. andersoni* v chovech skotu v ČR. Veterinářství 56;438–442
- KVÁČ M., SAK B., HANZLIKOVÁ D., KOTILOVÁ J., KVĚTOŇOVÁ D., 2009: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. Parasitol. Res. 104;425–428.
- KVÁČ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., DITRICH O., HOFMANNOVÁ L., MODRÝ D., VÍTOVEC J., XIAO L., 2008: Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. Vet. Parasitol., 153;363–367.
- KVÁČ M., VÍTOVEC J., 2003: Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one Herd of Beef Cattle. Vet. Parasitol., 50;451–457.
- LANGKJAER R. B., VIGRE H., ENEMARK H. L., MADDOX-HYTTEL C., 2007: Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. Parasitology, 134;339–350.
- LEONI F., AMAR C., NICHOLS G., PEDRAZA-DÍAZ S., MCLAUCHLIN J., 2006: Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. J. Med. Microbiol., 55;703–707.

- LEONI F., MALLON M. E., SMITH H. V., TAIT A., MCLAUCHLIN J., 2007: Multilocus analysis of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from sporadic and outbreak-related human cases and *C. parvum* from sporadic cases in livestock in the UK. *J. Clin. Mikrobiol.*, 45;3286–3294.
- LINDSAY D. S., UPTON S. J., OWENS D. S., MORGAN U. M., MEAD R. J., BLACKBURN B., L., 2000: *Cryptosporidium andersoni* sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Euk. Microbiol.*, 47;91–95.
- MACKENZIE W. R., HOXIE N. J., PROSTOR M. E., GRADUS M. S., BLAIR K. A., PETERSON D. E., KAZMIERCZAK J. J., WEISS D. G., FOX K. R., ROSE J. B., DAVIS J. P., 1994: A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infections transmitted through the public water supply. *n. Eng. J. Med.*, 331;161–167.
- MEISEL J. L., PERERA D. R., MELIGRO C., RUBIN C. E., 1976: Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in a immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70;1156–1160.
- MEUTIN D. J., VAN KRUININGEN H. J., KEIN D. H., 1974: Cryptosporidiosis in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 165;914–917.
- MILÁČEK P., VÍTOVEC J., 1985: Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.*, 32;50.
- MOHAMMED H. O., WADE S. E., SCHAAF S., 1998: Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet. Parasitol.*, 83;1–13.
- NIME F. A., BUREK J. D., PAGE D. L., HOLSCHER M. A., YARDERLY J. H., 1976: Acute enterocolitis in human being infected with protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70;592–598.
- ONDRÁČKOVÁ Z., KVÁČ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., ROST M., 2009: Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South Bohemia, the Czech Republic. *Vet. Parasitol.*, 165;141–144.
- O'CONNOR R. M., WANYIRI J. W., CEVALLOS A. M., PRIEST J. W., WARD H. D., 2007: *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 156;80–83.
- PANCIERA R. J., THOMASSEN R. W., GARNER F. M., 1971: Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.*, 8;479–584.

- PAVLÁSEK I., 1981: First record of *Cryptosporidium* sp. in calves in Czechoslovakia. Folia Parasitol., 28;187–199.
- PENG M. M., WILSON M. L., HOLLAND R. E. MESHNICK S. R., LAL A. A., XIAO L., 2003: Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. Parasitol. Res., 90;175–180.
- PLUTZER J., KARANIS P., 2007: Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. Vet. Parasitol., 146;357–362.
- POHJOLA S., OKSANEN H., JOKIPII L., JOKIPII A. M., 1986: Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. Scand. J. Infect. Dis., 18;173–178.
- POSPISCHIL A., STIGLMAIR-HERB M. T., VON HEGEL G., WISNER H. 1987: Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. Vet. Rec., 17;379–380.
- PREISER F., WANG J., STEMMERMANN G. N., NOFFSINGER A., 2003: TP53 and gastric carcinoma: a review. Hum. Mutat., 21;258–270.
- QUINN C. M., BETTS W. B., 1993: Longer term viability status of chlorine-treated *Cryptosporidium* oocysts in tap water. Biomed. Lett., 48;315–318.
- ROMMEL M., EEKERT J., KUTZER E., KORTING W., SCHNIEDER T., 2000: Veterinarmedizinische Parasitologie. 5. Auflage, Parey Buchverlag, Berlín, 914 pp.
- RYAN U., XIAO L., READ C., ZHOU L., LAL A. A., PAVLÁSEK I., 2003: Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol., 69;4302–4307.
- SANTÍN M., TROUT J. M., 2008: A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. Vet. Parasitol., 155;15–23.
- SANTÍN M., TROUT J. M., FAYER R., 2004: Prevalence *Enterocytozoon bienusi* in postweaned dairy calves in the eastern United States. Parasitol. Res., 93;287–289.
- SILVERLAS CH., NASLUND K., BJÖRKMAN C., MATTSSON JENS G., 2010: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. Vet. Parasitol., 169;289–95.
- SINGER P. C., RECKHOW D. A., 1999: Chemical oxydation. Water duality and treatment, 5th edition. Letterman R. D. technical editor, American water works association, McGraw-Hill, New York, NY.
- STURDEE A. P., BODLEY-TICKELL A. T., ARCHER A., CHALMERS R. M., 2003: Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. Vet. Parasitol., 116;97–113.

SULAIMAN I. M., HIRA P. R., ZHOU L., AL-ALI F. M., AL-SHELAHI F. A., SHWEIKI H. M., IQBAL J., KHALID N., XIAO L., 2005: Unique Endemicity of Cryptosporidiosis in Children in Kuwait. *J. Clin. Mikrobiol.*, 43;2805–2809.

SUTTHIKORNCHAI C., JANTANAVIVAT C., THONGRUNGKIAT S., HAMROONGROJ T., SUTHANA Y., 2005: Protozoal contamination of water used in Thai frozen food industry. *SE Asian J. Trop. Med. Pub. Health*, 36;41–45.

THOMPSON R. C. A., OLSON M. E., ZHU G., ENOMOTO S., ABRAHAMSEN M. S., 2005: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.*, 59;77–158.

THURSTON-ENRIQUEZ J. A., WATT P., DOWD S. E., ENRIQUEZ R., PEPPER I. L., GERBA C. P., 2002: Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J. Food Prot.*, 65;378–382.

TROTZ-WILLIAMS L. A., MARTIN D. S., GATEI W., CAMA V., PEREGRINE A. S., MARTIN S. W., NYDAM D. V., JAMIESON F., XIAO L., 2006: Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitol. Res.*, 96;346–352.

TYZZER E. E., 1907: A sporozoon found in the peptic flanda of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 5;12–13.

TYZZER, E. E., 1910: An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. & sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.*, 18;487–509.

TYZZER E. E., 1912: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.*, 26;394–414.

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

WIELINGA P. R., VRIES A., GOOT VAN DER TJEERD H., MANK T., MARS M. H., L. M. KORTBEEK, GIESSEN VAN DER J. W.B., 2008: Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Vet. Parasitol.*, 38;809–817.

XIAO L., 2010: Molecular epidemiology of cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.*, 124;80–89.

XIAO L., FAYER R., RAYEN U., UPTON S. J., 2004: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and amplications for publish health. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17;72–97.

XIAO L., SULAIMAN I., RYAN U. M., 2002: Host adaption and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. Int. J. Parasitol., 32;1773–1785.

XIAO L., ZHOU L., SANTÍN M., YANG W., FAYEER R., 2007: Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. Parasitol. Res., 100;701–706.