

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Katedra: Zootechnických věd
Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Mléko jako potenciální zdroj *Encephalitozoon cuniculi*

Autor diplomové práce: Vendula Tomanová

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

Konzultanti diplomové práce: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

České Budějovice, 2015

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 15. 4. 2015

.....
Vendula Tomanová

Na tomto místě bych ráda poděkovala především mému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost. Dále pak všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za pomoc při práci v laboratoři, přátelské jednání a cenné rady. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také všem, kteří mi pomáhali s odběrem vzorků.

Tato práce byla finančně podpořena z projektu GAČR 15-01090S (řešitel doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

Abstrakt

Cílem této práce bylo zjistit výskyt a prevalenci mikrosporidiových infekcí v syrovém kravském mléce. Bylo vyšetřeno 147 dojnic ze vzorku mléka, trusu či moči, z nichž jedna byla pozitivní na *Encephalitozoon cuniculi* a to opakovaně ve vzorku mléka i trusu. Teoretická část práce zahrnuje informace o mikrosporidiích, jako je například jejich vývojový cyklus, přenos a průběh onemocnění nebo terapie a prevence. V této části je popsáno i tepelné ošetření mléka. V praktické části je popsán metodický postup detekce mikrosporidiové DNA ze vzorků mléka, trusu či moči. Tato práce byla zaměřena na experimentální ověření devitalizační schopnosti různých pasterizačních metod. Mléko bylo inokulované spórami *Encephalitozoon cuniculi* a následně tepelně ošetřeno podle metod používaných v praxi. Toto mléko bylo perorálně vpraveno laboratorním SCID myším. Pro zjištění zda bylo tepelné ošetření účinné nebo zda propukla infekce, byly myši po třech týdnech usmrceny a jejich orgány vyšetřeny na přítomnost mikrosporidiové DNA v orgánech pomocí molekulárních metod.

Klíčová slova: Mikrosporidie; *Encephalitozoon cuniculi*; infekce; prevalence; mléko; tepelné ošetření mléka

Summary

The object of this thesis is to find out an incidence and prevalence of Microsporidia infection in uncooked cow's milk. Samples of milk, faeces and urine from 147 milk cows were screened. One of them was positive for presence of *Encephalitozoon cuniculi* in sample of milk and stool repeatedly. Theoretic part includes information about Microsporidia, e.g. developmental cycle, transfer and course of disease, treatment and prevention. There is a description of heat treatment of milk as well. A methodical procedure of microsporidia DNA detection from samples of milk, faeces or urine is described in the practical part. The thesis is focused on experimental verification of sterilizing capabilities of various pasteurization methods. Milk was contaminated by *Encephalitozoon cuniculi* and then heat treatment according to the methods used in practice followed. Contaminated milk was offered to laboratory immunodeficient SCID mice. After three weeks mice were put to death and their organs were examined for the presence of Microsporidia DNA using molecular methods. Finding out of Microsporidia in examined organs was the evidence of insufficient heat treatment.

Key words: Microsporidia; *Encephalitozoon cuniculi*; infection; prevalence; milk; heat treatment of milk

Obsah

1. Cíl práce	7
2. Úvod.....	8
3. Literární přehled.....	9
3.1. Taxonomie mikrosporidií.....	9
3.2. Vývojový cyklus	10
3.3. Přenos a průběh infekce	12
3.4. Terapie a prevence	12
3.5. Mikrosporidie skotu	13
3.6. Mléko	13
3.6.1. Tepelné ošetření mléka	15
4. Materiál a metodika	17
4.1. Materiál	17
4.1.1. Charakteristika sledovaných chovů.....	17
4.1.2. Odběr materiálu v chovech skotu.....	17
4.1.3. Spory mikrosporidií pro experiment	17
4.1.4. Experimentální zvířata	17
4.2. Metody	18
4.2.1. Izolace DNA.....	18
4.2.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	20
4.2.3. Gelová elektroforéza	21
4.2.4. Sekvenování a genotypizace	22
4.3. Ověření účinnosti různých metod tepelného ošetření mléka na viabilitu a infektivitu <i>Encephalitozoon cuniculi</i> genotype II	22
4.3.1. Příprava infekční dávky	22
4.3.2. Design experimentu	23
5. Výsledky	24
5.1. Prevalence mikrosporidií rodu <i>Encephalitozoon</i> u skotu.....	24
5.2. Ověření účinnosti různých metod tepelného ošetření mléka na viabilitu a infektivitu <i>Encephalitozoon cuniculi</i> genotype II	25
6. Diskuse	26
7. Závěry.....	29
8. Citovaná literatura.....	30

1. Cíl práce

- Popsat výskyt a prevalenci mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* v syrovém kravském mléce
- Molekulárními metodami určit druh a genotyp
- Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených mikrosporidií
- Experimentálně ověřit devitalizační schopnost různých pasterizačních metod pro *Encephalitozoon cuniculi*

2. Úvod

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární sporulující paraziti, kteří napadají obratlovce i bezobratlé živočichy, převládají zejména u ryb a hmyzu (Fedorko et al. 1995; Didier et Weis 2006). Způsobují oportunní infekce a vedou k závažným, někdy i smrtelným chorobám především u osob s poruchou imunitního systému. V současné době jsou tyto patogeny hlášeny také jako původci latentní infekce u imunokompetentních jedinců (Kotková et al. 2013).

Infekčním stádiem je spóra, v průměru měřící $1 - 2,5 \times 1,5 - 4,0$ μm oválného tvaru, vybavená dlouhým pólovým vláknem (injekční trubice) (Didier et Weiss 2008). Spóry se uvolňují do prostředí z infikovaného hostitele, jsou všudypřítomné (Kotler et Orenstein 1998) a vysoce odolné díky proteinové a chitinové vrstvě v buněčné stěně (Mo et Drancourt 2004). Spóry mikrosporidií byly zjištěny v povrchových vodách, půdě i potravinách. Přírozená cesta vstupu parazita do hostitele je požití nebo vdechnutí infekčních spór, také prostřednictvím ran, oční nebo transplacentární cestou (Kotková et al. 2013).

Historicky jsou mikrosporidie zodpovědné za značné ekonomické ztráty v rybolovu, včelařství a hedvábnickém průmyslu (Didier et al. 1998). První případ mikrosporidiózy u savců byl popsán roku 1922 u králíků (Wright et Craighead 1922; Markell et al. 1999).

Rod *Encephalitozoon* je typický tím, že se množí v parazitoforní vakuole (Franzen et Müller 2011) a v rámci rodu je druh *Encephalitozoon cuniculi* nejvíce studovanou savčí mikrosporidií, která infikuje celou řadu obratlovců, včetně člověka. V rámci druhu *E. cuniculi* rozeznáváme 4 genotypy (I, II, III a IV), jež nejsou hostitelsky specifické a způsobují systémové infekce (Didier 1995).

Vzhledem k velmi rychlému šíření patogena tělem infikovaného hostitele (Kotková et al. 2013), mohou představovat živočišné produkty jako maso či mléko potenciální zdroj infekcí. Tato práce by měla odpovědět na základní otázky, zda se mikrosporidie *E. cuniculi* dostává do mléka dojeného skotu a jestli mléko představuje potenciální zdroj infekce pro člověka.

3. Literární přehled

3.1. Taxonomie mikrosporidií

Mikrosporidie jsou jednobuněční paraziti, původně řazení mezi prvoky a dokonce po určitý čas považováni za jedny z nejstarších organismů, relikty z doby, než eukaryotní buňka získala mitochondrie. Molekulárně-fylogenetické studie však ukázaly, že mikrosporidie náleží do říše hub nebo jsou s nimi v úzkém příbuzenském vztahu (Volf et al. 2007; Katinka et al. 2001). Patří do kmene Microsporidia, třídy Microsporea a řádu Microsporida (Vivarés et al. 2002). Mají více než 1 300 uznaných druhů v asi 160 rodech (Ardila-Garcia et Fast 2012) a 14 z nich může infikovat člověka (tabulka 1; Sak et al. 2011).

Evolučně jsou mikrosporidie považovány za primitivní eukaryotické organismy. Mají sice pravé jádro, ale postrádají mitochondrie, peroxisomy, golgiho aparát i další organely typické pro eukaryotické buňky. Mikrosporidie však mají organelu odvozenou od mitochondrií, tzv. mitozom, což podporuje pravděpodobnost, že se mikrosporidie vyvinuly z předků, které obsahovali mitochondrie. Navíc mají tito paraziti podobné ribozomy jako prokaryotická buňka (Weber et al. 1994; Didier 1998).

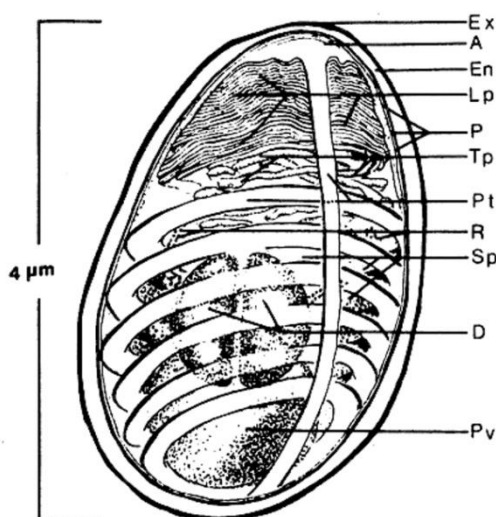
Tabulka 1. Přehled druhů mikrosporidií infikující člověka (Didier et Weiss 2008).

Druh	Lokalizace
<i>Anncaliia</i> (syns. <i>Nosema</i> and <i>Brachiola</i>) <i>algerae</i>	Oko, sval
<i>Anncaliia</i> (syns. <i>Nosema</i> and <i>Brachiola</i>) <i>connori</i>	Systémové onemocnění
<i>Anncaliia</i> (syns. <i>Nosema</i> -like and <i>Brachiola</i>) <i>vesicularum</i>	Sval
<i>Encephalitozoon</i> (syn. <i>Nosema</i>) <i>cuniculi</i>	Systémové onemocnění, oko, dýchací a močový trakt, játra, peritoneum, mozek
<i>Encephalitozoon</i> <i>hellem</i>	Oko, dýchací a močový trakt, systémové onemocnění
<i>Encephalitozoon</i> (syn. <i>Septata</i>) <i>intestinalis</i>	Žlučový a dýchací trakt, střeva, Kostí, kůže, systémové onemocnění
<i>Enterocytozoon</i> <i>bieneusi</i>	Střeva, žlučový a dýchací trakt
<i>Microsporidium</i> <i>africanum</i> (syn. <i>Nosema</i> sp.)	Oko
<i>Microsporidium</i> <i>ceylonensis</i> (syn. <i>Nosema</i> sp.)	Oko
<i>Nosema</i> <i>ocularum</i>	Oko
<i>Pleistophora</i> <i>ronneafiei</i> (syn. <i>Pleistophora</i> sp.)	Sval
<i>Trachipleistophora</i> <i>anthropoptera</i>	Systémové onemocnění, oko
<i>Trachipleistophora</i> <i>hominis</i>	Sval, oko
<i>Vittaforma</i> <i>corneae</i> (syn. <i>Nosema</i> <i>corneum</i>)	Oko, močový trakt

3.2. Vývojový cyklus

Struktura odlišující mikrosporidie od všech ostatních organismů je dutá spirálovitě stočená pólová trubice, pomocí které infikuje hostitelskou buňku (obrázek 1; Weber et al. 1994). Zralá spóra je obklopena glykoproteinovou vnější a chitinovou vnitřní vrstvou, díky které je velmi odolná vůči nepříznivým podmínkám životního prostředí (Didier et al. 2004). Za vhodných podmínek je trubice vystřelena, proniká cytoplazmatickou membránou a infekční obsah spóry je vstříknut do hostitelské buňky. Prázdňá spóra zůstává extracelulárně (Weber et al. 1994).

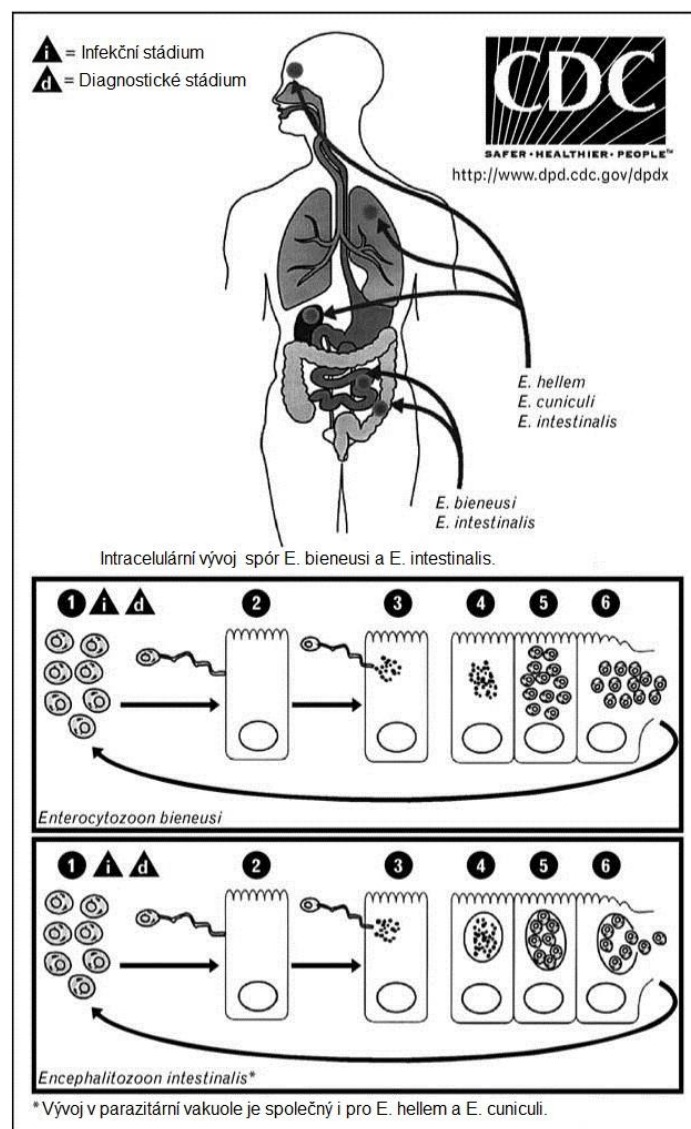
Obrázek 1. Schéma mikrosporidiové infekční spóry – Stěna spóry se skládá z elektrodenzní exospory (Ex), chitinové endospory (En) a membrány (P). Vytlačovací zařízení obsahuje kotevní disk (A), pólovou trubici (Pt), která tvoří 4 – 7 závitů, lamelový polaroplast (Lp) a trubicovitý polaroplast (Tp). Dále spóra obsahuje zadní vakuolu (Pv), ribozomy (R), sporoplasmu (Sp) a jádro (D) (Weber et al. 1994).



Vývojové cykly mikrosporidií se značně liší u různých druhů, ale pro všechny druhy je společná extracelulární a intracelulární fáze (Ardila-Garcia et Fast 2012). Například *Enterocytozoon bieneusi* se množí přímo v cytoplasmě buňky narozdíl od rodu *Encephalitozoon*, který se množí ve zvláštní parazitoformní vakuole (obrázek 2; Markell et al. 1999). Zárodek mikrosporidie, tzv. sporoplasma je injikován přímo do cytoplasmy buňky hostitele. Následně mikrosporidie prochází dvěma vývojovými fázemi, merogonií a sporogonií (Weber et al. 1994). Během merogonie se meronti rozmnožují binárním dělením nebo rozpadem plasmodií na dceřiné buňky, které mohou cyklus opakovat. V této části jsou buňky mikrosporidií ohraničeny

jednoduchou plasmatickou membránou (Didier et al. 2004), která bezprostředně komunikuje s cytoplasmou hostitelské buňky. Ve stádiu merogonie není hostitelská buňka poškozována. Když je buňka vyplněna stádiem mikrosporidií, začnou na svém povrchu vytvářet elektrodenzní stěnu, která definuje stadium sporontu. Jednotlivé, stěnou pokryté buňky parazita se osamostatňují (tzv. sporoblasty) a vznikají z nich složitě stavěné spóry. Spóra je funkčně adaptovaná pro infekci další buňky ve stejném hostitelském nebo novém organismu (Volf et al. 2007).

Obrázek 2. Schématické znázornění životního cyklu u vybraných druhů mikrosporidií (upraveno, zdroj CDC).



3.3. Přenos a průběh infekce

Infekce začíná proniknutím spóry do organismu. Nejčastější způsob je požití nebo vdechnutí infekční spóry, méně častá je infekce ranná, oční či transplacentární, nejméně častou je pak transplantace infikovaného orgánu. Primárními místy infekce jsou tedy nejčastěji epitelové buňky gastrointestinálního a respiračního traktu. *Enterocytozoon bieneusi* zůstává především v tenkém střevě a jeho spóry jsou vylučovány stolicí. Může ale také způsobit infekci žlučových cest. Mimo enterocyty tenkého střeva mohou druhy rodu *Encephalitozoon* infikovat makrofágy a šířit se do celého organismu hostitele, kde způsobují diseminovanou infekci (Didier et al. 1998). Sekundárně mikrosporidie způsobují jaterní, ledvinovou a respirační infekci, mohou napadnout také mozek a paranazální dutiny (Didier 1998; Kotková et al. 2013). Oční, svalová či diseminovaná infekce může být primární i sekundární (Markell et al. 1999). Infekční spóry jsou nepravidelně vylučovány v tělních sekretech podle postiženého orgánu, například močí. (Didier et Weiss 2006; Kotková et al. 2013). U mikrosporidiózy se klinické příznaky objevují především u jedinců s poruchou imunity, například u pacientů s AIDS, kteří mají hladinu CD4 + T – lymfocytů pod 100 buněk v μ l krve (Sak et al. 2011). Rizikovou skupinou jsou také jedinci po transplantaci orgánů či mláďata s nezralým imunitním systémem (Didier 2006). Nejčastějším klinickým projevem mikrosporidiózy je chronický průjem, který může být spojený s horečkou, ztrátou chuti k jídlu a tím pádem úbytkem hmotnosti a celkovým chřadnutím (Kotler et Orenstein 1998). Variabilita klinických příznaků u osob nakažených mikrosporidiózou záleží na imunitním stavu jedince a tedy jeho schopnosti vytvářet imunitní odpověď (Didier 1998; Fasshauer et al. 2005).

3.4. Terapie a prevence

Díky velikosti a lokalizaci parazita je diagnostika obtížná (Markell et al. 1999). Studie ukazují, že funkční T lymfocyty jsou nezbytné k zabránění infekce (Fray et al. 1983; Moretto et al. 2004). Předcházet nákaze lze především dodržováním hygienických návyků (Didier et al. 2004). Léčba je možná perorálním podáním albendazolu nebo jemu podobných benzimidazolových preparátů. Albendazol, podávaný 2 – 3 krát denně po dobu jednoho měsíce by měl být účinný k léčbě střevní a diseminované infekce způsobené *Encephalitozoon intestinalis* a *E. cuniculi*. Stejně dávkování snižuje klinické příznaky střevní infekce *Enterocytozoon bieneusi*, ale neeliminuje zcela infekci (Markell et al. 1999). Fumagillin byl úspěšně použit

v léčbě oční infekce *Encephalitozoon hellem*, může ovšem způsobit nežádoucí účinky jako je neutropenie nebo trombocytopenie (Didier et al. 2004). Podle studie Kotkové et al. (2013), která byla prováděna na SCID a BALB/c myších infikovaných *Encephalitozoon cuniculi*, však při léčbě albendazolem k úplnému vymizení mikrosporidií z organismu nedošlo. U imunodeficitních SCID myších došlo pouze k dočasnému snížení počtu postižených orgánů. Ačkoliv u imunokompetentních BALB/c myši po léčbě nebyl *E. cuniculi* v orgánech nalezen, při následném podání imunosupresiv byla infekce znovu aktivována. Tato studie tedy ukazuje, že mikrosporidie mohou přežít v orgánech imunokompetentních jedinců a vyčkávat zda jedinec nebude postižen narušenou imunitou.

3.5. Mikrosporidie skotu

Přestože jsou mikrosporidie rodů *Enterocytozoon* a *Encephalitozoon* ubikvitární a většina genotypů těchto druhů není hostitelsky specifická, existuje relativně málo záznamů o mikrosporidiových infekcích skotu. U skotu byly identifikovány dva druhy mikrosporidií a to *Enterocytozoon bieneusi* (Del Coco et al. 2014; Juránková et al. 2013) a *Encephalitozoon cuniculi* (Halánová et al. 1999), které mají zoonotický potenciál.

3.6. Mléko

Mléko je hlavním zdrojem výživy mláďat savců. Obsahuje všechny důležité živiny pro růst mláďat. Mléko se však stalo jednou z hlavních složek jídelníčku pro lidskou populaci v každém věku. U lidí tvorba mléka klesá, a proto se nahrazuje nejčastěji mlékem kravským (Jabed et al. 2012).

Složení mléka (Islam et al. 2014):

- Voda: 87,5 %
- Sušina: 12,5 %
 - Bílkoviny: 3,3 – 3,5 %
 - Mléčný tuk: 3,6 – 4,2 %
 - Laktoza: 4,7 – 5,0 %
 - Minerální látky, vitamíny

3.6.1. Tvorba mléka

Mléko je tvořeno v mléčné žláze. Hlavní místem sekrece mléka jsou alveolární buňky, které jsou vyplněny sekrečním epitelem. Mléčná žláza přijme z krve na vytvoření 1 kg mléka asi 145 g anorganických živin a v mléce jich je potom přibližně 120 g, to znamená, že na vlastní tvorbu mléka se spotřebuje pouze asi 17 – 18 %. V sekrečních buňkách dochází k přeměně živin krmiva, přinášených krví nebo lymfou, na složky mléka. Tvoří se zde mléčný tuk, bílkoviny, laktoza a uskutečňuje se zde přestavba minerálních látek. Krev je do mléčné žlázy přiváděna zevní mléčnou tepnou a k výrobě 1 l mléka je potřeba, aby mléčnou žlázou proteklo 500 – 550 l krve. Mléko je z alveol vylučováno následkem mechanického stlačení, které vzniká stažením buněk hladkého svalstva (Jelínek et al. 2003).

Zánět mléčné žlázy neboli mastitida, je častý problém v chovu skotu, snižuje kvalitu a produkci mléka. Zánět mléčné žlázy může být klinický a subklinický. Subklinická mastitida je téměř bezpříznaková a je tedy těžko detekovatelná. Toto onemocnění má širokou škálu původců. Mléčná žláza může být infikována patogeny z vnějšího prostředí, které se do mléčné žlázy dostanou přes strukový kanálek. Zánět mohou způsobit i oportunní patogeny (Pilla et al. 2013). Somatické buňky se v mléce objevují v důsledku imunitní odpovědi na danou infekci. Většina buněk přítomných v mléce jsou tvořeny leukocyty, zejména lymfocyty (13 – 72 %), makrofágy (10 – 78 %) a granulocyty (6 – 37 %). Epitelové buňky mléčné žlázy jsou zastoupeny pouze 2 – 45 % (tabulka 2). Počet somatických buněk by neměl přesáhnout 100 000 na ml mléka.

Z hlediska prevence zánětů mléčné žlázy je důležité dbát na hygienu prostředí a po každém dojení provést desinfekci struku, čímž se strukový kanálek uzavře (Schwarz et al. 2010).

Tabulka 2. Typy a procentuální podíl somatických buněk v mléce.

Reference	Lymfocyty	Makrofágy	Granulocyty	Epitelové buňky
	(%)			
Lee et al. 1980	19	78	6	4
Paape et al. 1981	28	60	10	2
Miller et al. 1991	24	31	26	19
Leitner et al. 2000	13	13	29	45
Rivas et al. 2001	72	10	18	-
Boutet et al. 2003	18	36	34	12
Dosogne et al. 2003	60	10	30	-
Schröder et Hamann 2005	46	17	37	-
Merle et al. 2007	27	50	23	-
Koess et Hamann 2008	26	43	31	-
Schwarz et al. 2011a	75	16	8	1
Schwarz et al. 2011b	70	21	9	-
Pilla et al. 2012	35	25	40	-

3.6.1. Tepelné ošetření mléka

Tepelné ošetření mléka je technologický proces, který se řídí právním předpisem (Vyhláška č. 203/2003 Sb., o veterinárních požadavcích na mléko a mléčné výrobky), při kterém se použitím rozdílných kombinací teploty a doby působení tepelného záhřevu, jež vykazují rovnocenný účinek, omezuje počet nežádoucích mikroorganismů a zajišťuje zdravotní nezávadnost a prodloužení trvanlivosti mléka a konečného mléčného výrobku. Tepelné ošetření mléka neboli pasterizaci zajišťují v praxi různé technologické systémy, od nejjednodušších kotlů a vodních lázní až po dnes nejpoužívanější deskový průtočný pastér. Tento proces však mohou přežít sporotvorné mikroorganismy a některé termorezistentní bakterie. Tepelné ošetření mléka se rozděluje na několik typů dle kombinace teploty a doby působení tepelného záhřevu, což je dáno technologií pro výrobu různých mléčných výrobků (tabulka 3; www.eagri.cz).

Tabulka 3. Typy tepelného ošetření mléka používané v praxi.

Typ tepelného ošetření mléka	Výrobky	Teplota	Čas
Dlouhodobě nízká	Mléko pro přímý konzum	63 °C	30 min
Šetrná pasterizace	Sýry	72 – 74 °C	20 – 25 s
Vysoká pasterizace	Konzumní mléko, jogurty, tvarohy	84 – 85 °C	5 s
Smetana	Smetana, máslo	95 – 96 °C	5 s
Termizace	Čerstvé sýry	65 – 68 °C	20 – 25 s
Vysokotepelné ošetření (UHT)	Krabicové mléko	135 – 155 °C	2 s

4. Materiál a metodika

4.1. Materiál

Byly odebírány vzorky mléka, trusu a moči na 4 farmách skotu – Březnice u Bechyně, Čihovice, Hlavatce a Haklovy Dvory v roce 2014.

4.1.1. Charakteristika sledovaných chovů

Přibližný počet chovaných dojníc v chovu Březnice u Bechyně je 490, v Haklových Dvorech 180, v Čihovicích 100 a Hlavatcích 60 kusů dojníc. Všechny chovy mají skupinové volné ustajení s lehacími boxy se slamněnou podestýlkou, kromě zemědělského družstva Březnice u Bechyně, kde mají vodní matrace. Zvířata jsou krmená dvakrát denně krmnou směsí. Odklizení hnoje probíhá dvakrát denně v Haklových Dvorech a Hlavatcích a průběžně po celý den pomocí robotického odklízeče ve Březnici u Bechyně a šípovou lopatou v Čihovicích. Dojnice jsou dojeny dvakrát denně v poloautomatizovaných dojírnách.

4.1.2. Odběr materiálu v chovech skotu

Odběry mléka a trusu byly prováděny vždy 2 – 5 dní po sobě jdoucích. Vzorky mléka byly získány z prvních odstříků ještě před tím, než bylo nasazeno dojící zařízení, a to jak při raním, tak večerním dojení. Vzorky trusu byly odebírány při defekaci zvířete nebo odběrem z rekta. Vzorek moči byl zachycen při močení zvířete. Pro diagnostiku bylo odebíráno 50 ml mléka, 50 ml moči a 3 g trusu. Materiál byl uložen do plastových sterilních odběrových kelímků, následně označen a skladován při 4 °C do doby než byl vyšetřen.

4.1.3. Spóry mikrosporidií pro experiment

Pro experiment byly použity spóry mikrosporidií druhu *Encephalitozoon cuniculi* kmene ECII, které byly izolovány z myši domácí (*Mus musculus*). Spóry byly izolovány a vyčištěny z buněk centrifugací při 1 100 g po dobu 30 minut. Následně byly třikrát promyty ve sterilizované destilované vodě a použity.

4.1.4. Experimentální zvířata

Pro testování infekivity a viability spor po ošetření různými typy pasterizace (tabulka 4) byly použity 8-týdenní SCID myši (Vlastní chovy - Parazitologický ústav, Biologické centrum Akademie věd, v.v.i.).

Tabulka 4. Typy použitých pasterizačních metod v této práci.

Typ pasterizace	Teplota	Čas
Dlouhodobě nízká	63,0 °C	30 min
Šetrná	71,2 °C	15 s
Vysoká	85,0 °C	5 s
Smetana	95,0 °C	5 s
Termizace	67,0 °C	25 s

4.2. Metody

4.2.1. Izolace DNA

Izolace DNA z trusu, moči i mléka byla prováděna pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex).

Postup:

1. Do mikrozkušavek (Safe Lock Tube, 2,5 ml) bylo vloženo 200 mg trusu nebo sedimentu mléka popřípadě sedimentu moči, skleněné kuličky o průměru 0,5 mm a přidáno 0,8 – 1,2 ml Lysis Buffer P.
2. Dále bylo provedeno rozbíjení buněk pomocí homogenizátoru (Fast Prep 24 Instrument, MP Bio) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
3. Všechny vzorky byly inkubovány v termobloku 10 minut při teplotě 95 °C a pravidelně během inkubace protřepávány.
4. Poté byly centrifugovány 1 minutu při 11 000 g.
5. Veškerý supernatant byl přenesen do InviAdsorb zkumavek, 15 s vortexován a inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě, následně byl centrifugován 3 minuty při 13 400 g.
6. Supernatant byl přepipetován do čistých 1,5 ml mikrozkušavek a znovu centrifugován 3 minuty při 13 400 g.
7. Do čistých 1,5 ml zkumavek bylo napipetováno 25 µl Proteinase K a přidáno 400 µl supernatantu, obsah zkumavek byl krátce zvortexován a inkubován v termobloku 10 minut při 70 °C.
8. Do mikrozkušavky bylo připipetováno 400 µl Binding Buffer P a zvortexováno.
9. Veškerý objem byl přenesen na kolony se sběrnými mikrozkušavkami a inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě. Centrifugován 1 minutu při 11 000 g.

10. Odpad ze sběrných mikrozkušavek byl vylit a na kolonu bylo napipetováno 500 µl Wash I a centrifugováno 1 minutu při 11 000 g.
11. Znovu byl vylit odpad ze sběrných mikrozkušavek a přidáno 700 µl Wash II, centrifugováno 1 minutu při 11 000 g.
12. Naposledy byl vylit odpad ze sběrných mikrozkušavek a centrifugováno 4 minuty při 13 400 g.
13. Kolona byla dána na čistou 1,5 ml mikrozkušavku a na ni bylo napipetováno 200 µl předehřátého roztoku Elution Buffer D. Inkubováno 3 minuty při laboratorní teplotě a centrifugováno 1 minutu při 11 000 g.

Izolace DNA z tkání byla prováděna pomocí komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit.

Postup:

1. Do mikrozkušavky bylo nastříháno 10 mg tkáně a byly přidány skleněné kuličky o průměr 0,5 mm.
2. K obsahu ve zkumavce bylo přidáno 180 µl ATL Buffer, zvortexováno.
3. Dále bylo provedeno rozbíjení buněk pomocí homogenizátoru (Fast Prep 24 Instrument, MP Bio) po dobu 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
4. Mikrozkušavka s obsahem byla centrifugována 10 sekund při 6 000 g a bylo přidáno 20 µl proteinase K.
5. Vše bylo inkubováno 1 hodinu při 56 °C, během inkubace byl obsah pravidelně protřepáván.
6. Vzorek byl znovu centrifugován přibližně 10 sekund při 6 000 g a bylo připipetováno 200 µl AL Buffer, zvortexováno.
7. Bylo připipetováno 200 µl 96 % EtOH, zvortexováno a centrifugováno 10 sekund při 6 000 g.
8. Veškerý supernatant byl přepipetován na kolonu se sběrnou zkumavkou a centrifugován 1 minutu při 8 000 g.
9. Odpad ze sběrné zkumavky byl vylit a na kolonu bylo napipetováno 500 µl AW I Buffer, centrifugováno 1 minutu při 8 000 g.
10. Znovu byl vylit odpad ze sběrných mikrozkušavek a přidáno 500 µl AW II Buffer, centrifugováno 1 minutu při 13 400 g.

11. Sběrné zkumavky byly nahrazeny novými mikrozukmavkami a přímo na kolonu bylo napipetováno 200 μ l AE Buffer. Inkubováno 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugováno 1 minutu při 8 000 g.

Vyizolovaná DNA byla skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Detekce přítomnosti specifické DNA mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* byla provedena pomocí nested PCR amplifikující ITS ribozomální podjednotky (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996). Celkový objem reakčních směsí byl pro primární i sekundární PCR reakci 25 μ l. Ke každé sadě vyšetřovaných vzorků byla zařazena pozitivní (vzorek pozitivní na *Encephalitozoon hellem*) a negativní kontrola.

Chemikálie:

- Deoxyribonukleosid trifosfáty (200 μ M dNTP's, 10 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- 10 \times koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- Taq purple DNA polymeráza (1 U/ μ l, Top-Bio, ČR)
- PCR H₂O (Top-Bio, ČR)
- MgCl₂ (25 mM, Top-Bio, ČR)
- Bovinní sérový albumin (BSA 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, ČR)
- Primery (10 μ M, Generi Biotech, ČR)

Sekvence použitých pimerů:

Primární PCR

- INT580F: 5' - TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT - 3'
- INT580R: 5' - TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG - 3'

Sekundární PCR

- MSP-3: 5'- GGA ATT CAC ACC GCC CGT C (A,G) (C,T)TAT - 3'
- MSP-4A: 5'- CCA AGC TTA TGC TTA AGT (C,T) (A,C) A A (A,G) G GGT - 3'

DNA byla amplifikována v termocykleru (Bioer, Krd). Počáteční denaturace trvala 3 minuty při 95 °C. Po té se opakovalo 35 cyklů, složených z

1. Denaturace při 95 °C, 45 sekund.
2. Nasedání primerů při 55 °C, 45 sekund.
3. Syntáza nového řetězce při 72 °C, 60 sekund.

Finální dosyntetizování nového řetězce při 72 °C, 10 minut. Pro amplifikaci sekundární PCR produktu byly použity 2 µl primárního PCR produktu (tabulka 5).

Tabulka 5. Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu.

Primární reakce			Sekundární reakce		
H₂O	-----	14,87 µl	H₂O	-----	16,87 µl
MgCl₂	3 mM	2,5 µl	MgCl₂	3 mM	2,5 µl
10× buffer	-----	1,5 µl	10× buffer	-----	1,5 µl
dNTP	200 nM	0,5 µl	dNTP	200 nM	0,5 µl
forward	200 mM	0,5 µl	Forward	200 mM	0,5 µl
Reverse	200 mM	0,5 µl	Reverse	200 mM	0,5 µl
BSA	10 mg/ml	1 µl	-----	-----	-----
Taq	1 U/	0,63 µl	Taq	1 U	0,63 µl
DNA	-----	3,00 µl	PCR	-----	2,00 µl
			produkt		
CELKEM	-----	25,00 µl	CELKEM	-----	25,00 µl

4.2.3. Gelová elektroforéza

Konečný PCR produkt byl detekován na 1 % agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (vlnová délka 302 nm) transiluminátorem (Ultra-Lum Inc, USA) a zdokumentován (High Performance UV Transilluminator, Biotech, ČR).

Chemikálie:

1. 50× TAE pufr (242 g tris báze; 457,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,00).
2. Agaróza (Serva Electrophoresis, Germany)
3. Ethidium-bromid (10 mg.ml⁻¹; Sigma-Aldrich, ČR)
4. 100 bp DNA Ladder (10 mg.ml⁻¹; Sigma-Aldrich, USA)

Postup:

1. V prvním kroku byla smíchána agaróza s 1× TAE pufrem (80 ml TAE pufre + 0,8 g agarózy).
2. Agaróza byla rozpuštěna v mikrovlné troubě a následně zchlazena pod tekoucí vodou přibližně na teplotu 50 °C.
3. Bylo přidáno 2 µl ethidium-bromidu a promícháno.
4. Gel byl nalit do předem připravené formy, následně vloženy hřebeny (dle počtu vzorků) a necháno ztuhnout cca 20 minut.
5. Po ztuhnutí byly vyjmuty hřebeny a gel byl vložen do elektroforetické vany naplněné TAE pufrem.
6. Do první jamky bylo napipetováno 10 µl 100 bp Ladder a do dalších veškerý produkt sekundární PCR.
7. Elektroforéza byla spuštěna (napětí bylo nastaveno 90 V na dobu, která je potřebná pro separaci fragmentů DNA).
8. K vizualizaci DNA fragmentů byl použit UV transiluminátor.

4.2.4. Sekvenování a genotypizace

PCR produkty byly přímo sekvenovány pomocí sekundárních primerů v komerčních laboratořích za použití sekvenačního kitu BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Získané nukleotidové sekvence byly analyzovány v Chromas Pro 1.7.5. a porovnány s referenčními sekvencemi uloženými v GenBank.

4.3. Ověření účinnosti různých metod tepelného ošetření mléka na viabilitu a infektivitu *Encephalitozoon cuniculi* genotype II

4.3.1. Příprava infekční dávky

Nepřítomnost mikrosporidií v syrovém kravském mléce byla ověřena pomocí PCR metod. Do 200 µl ověřeného mléka bylo přidáno 10^7 infekčních spór *E. cuniculi*. Jednotlivé vzorky mléka byly tepelně ošetřeny v termocykleru, kde byl nastaven potřebný čas a teplota podle druhu pasterizace (tabulka 4).

4.3.2. Design experimentu

Vždy tři 8 týdnů staré SCID myši byly perorálně inokulovány dávkou mléka se spórami po tepelném ošetření (tabulka 4). Jako negativní kontrola byly použity tři SCID myši, které byly inokulovány dávkou 200 μ l mléka prostého mikrosporidií. Jako pozitivní kontrola byly použity SCID myši, které byly perorálně infikovány dávkou 10^7 spór *E. cuniculi* v 200 μ l syrového mléka. Každá myš byla umístěna v samostatné chovné nádobě. Zvířata byla chována v izolátoru (BEM, Znojmo, ČR) s HEPA filtry a ad libitně krmena a napájena sterilním krměním a vodou. Podestýlány byly sterilní podestýlkou. Experimentální myši byly usmrceny po 3 týdnech po inokulaci. Pro ověření přítomnosti *E. cuniculi* v těle byly vyšetřeny orgány: ledviny, játra, slezina, mozek a byl proveden výplach peritonea na přítomnost specifické DNA pomocí nested PCR.

5. Výsledky

5.1. Prevalence mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* u skotu

Během sledování v roce 2014 bylo vyšetřeno celkem 367 vzorků trusu, 105 vzorků mléka a 23 vzorků moči od 147 dojnic (tabulka 6).

Tabulka 4. Prevalence *Encephalitozoon cuniculi* ve vyšetřovaných dojnicích a vzorcích.

Chov	Počet dojnic/ pozitivní	Počet vyšetřených vzorků / pozitivní		
		Trus	Mléko	Moč
Březnice u Bechyně	98/1	233/5	45/3	23/0
Haklovy Dvory	12/0	60/0	60/0	0/0
Čihovice	21/0	42/0	0/0	0/0
Hlavatce	16/0	32/0	0/0	0/0
CELKEM	147	367/5	105/3	23/0

Ze všech testovaných dojnic bylo *E. cuniculi* detekováno pouze u jedné dojnice z chovu Březnice u Bechyně. Spóry mikrosporidie byly opakovaně nalezeny v odebraném vzorku mléka i trusu.

U sledované dojnice byly vzorky mléka odebírány po dobu 20 dní. Parazit byl nalezen 1., 2., 6., 8., a 10. den od prvního nálezu. Od 10. do 20. dne už výskyt *E. cuniculi* nebyl zachycen. Průměrný počet somatických buněk v mléce u tohoto zvířete byl po celou laktaci v normě a nebyly zjištěny žádné příznaky zánětu mléčné žlázy. V období sledování dojnice (3 – 4 měsíc laktace) byl zjištěn celkový počet somatických buněk na ml mléka v rozmezí od 69 000 do 97 000. Pouze v 2. měsíci laktace, kdy byl počet somatických buněk zvýšený (230 000) nad 100 000.

5.2. Ověření účinnosti různých metod tepelného ošetření mléka na viabilitu a infektivitu *Encephalitozoon cuniculi* genotype II

Z 5 testovaných metod tepelného ošetření byly 3 účinné. To znamená, že u infikovaných myši usmrčených po 3 týdnech, nebyla nalezena žádná mikrosporidiová DNA a tento typ tepelného ošetření byl zcela účinný a devitalizoval spóry *Encephalitozoon cuniculi* v mléce (tabulka 7). Šetrná a vysoká pasterizace nebyla účinná. U zvířat inokulovaných dávkou *E. cuniculi* vystavenou šetrné a vysoké pasterizaci byl parazit nalezen ve všech vyšetřovaných orgánech. Žádný z vyšetřovaných orgánů myši inokulovaných pouze mlékem nebyl pozitivní na přítomnost specifické DNA *E. cuniculi*, naopak všechny orgány kontrolní myši infikované neošetřenými spory byl pozitivní na přítomnost parazita.

Tabulka 7. Účinnost metod tepelného ošetření mléka na infektivitu *Encephalitozoon cuniculi* genotype II.

Typ pasterizace	Teplota	Čas	Infektivita pro SCID myši
Dlohodobě nízká	63,0 °C	30 min	NE
Šetrná	71,2 °C	15 s	ANO
Vysoká	85,0 °C	5 s	ANO
Smetana	95,0 °C	5 s	NE
Termizace	67,0 °C	25 s	NE

6. Diskuse

Mikrosporidíóza je oportunní infekce spojená s celou řadou klinických příznaků. Je řazena jako zoonóza, což znamená, že se jedná o onemocnění přenosné na lidi a projevuje se zejména u osob s oslabenou imunitou (např. osoby s HIV infekcí, osoby po transplantaci orgánů, kteří užívají imunosupresiva). Rizikovou skupinou jsou také starší osoby nebo cestující do tropických oblastí (Moretto et al. 2004). První případ případ mikrosporidíózy u člověka byl popsán roku 1959 (Markell et al. 1999). Imunitní stav hostitele hraje velkou roli v expresi klinických příznaků v průběhu infekce. Tato parazitóza si získala velkou pozornost při pandemii AIDS, kdy postižení jedinci trpěli chronickými průjmy, které byly připisovány mikrosporidiím (Didier 1998). Klinické studie využívající moderních diagnostických metod ale ukazují, že mikrosporidíóza je častější než se dříve myslelo (Sak et al. 2011). Vylučování mikrosporidiových spór bylo zjištěno i u zjevně zdravých lidí, kteří nevykazovali žádné z příznaků (Sak et al. 2011). Způsob přenosu na člověka je jednak při kontaktu s postiženým zvířetem, ale také na veřejných místech od dalších infikovaných lidí, například plavecké bazény, vířivky nebo lázně. K přenosu může dojít také pohlavním stykem. Zdrojem infekce může být i infikovaný bodavý hmyz. Nemalým rizikem je také infekce z infikované vody a potravy (Izquierdo et al. 2011). Identifikace mikrosporidií ve vodních zdrojích vedlo k jejich zařazení do National Institutes of Health (NIH, www.niaid.nih.gov) a institutu pro ochranu životního prostředí (EPA, www.water.epa.gov) (Didier et Weiss 2006). Prevencí je důležité dodržování základních hygienických návyků, dostatečně tepelná úprava potravin živočišného původu a mýtí ovoce či zeleniny před konzumací (Didier et al. 2004). Dle studie Jedrzejewski et al. (2007) byl prokázán výskyt rodu *Encephalitozoon* na čerstvé zelenině a ovoci.

Z této studie vyplývá, že prevalence *Encephalitozoon cuniculi* u dojného skotu ve sledovaných chovech je nízká. Ze 147 vyšetřovaných dojnic byl tento druh mikrosporidie nalezen pouze u 1 dojnice (1,47 %). Naopak ve studii Halánové et al. (1999), byl *E. cuniculi* na Slovensku detekován u 20 dojnic z 55 (36,4 %) vyšetřovaných.

Kromě *E. cuniculi* byl u skotu nalezen ještě jeden druh mikrosporidie, a to *Enterocytozoon bieneusi*. Tato mikrosporidie byla v České republice nalezena z 240 vyšetřovaných kusů skotu u 37 (Juránková et al. 2013) a v Argentině u 10 telat ze 70

vyšetřovaných (Del Coco et al. 2014). Přestože byla u této mikrosporidie zaznamenána i extraintestinální lokalizace (Didier 1998), je predilekčním místem infekce *E. bienersi* zažívací trakt. Je tedy velmi málo pravděpodobné, že by se spory *E. bienersi* dostaly do mléka a z tohoto důvodu nebyl screenig na tento patogen zařazen do této práce.

Charakteristickým znakem mikrosporidiových infekcí vyvolaných *E. cuniculi* je vyšší frekvence vylučování spór trusem infikovaného jedince na počátku infekce. Naopak v chronické fázi, kdy parazit infikuje vnitřní orgány hostitele je vylučování spór trusem velmi nepravidelné (Kotková et al. 2013). V této studii byla detekována specifická DNA *E. cuniculi* v trusu zvířat jen v ojedinělých případech, což by mohlo naznačovat, že vyšetřované dojnice se mohly nacházet v chronické fázi infekce. Z těchto důvodů je odebrání vzorků více dní po sobě důležité k odhalení mikrosporidií, i když ne 100 % spolehlivé (Kotková et al. 2013). U jedinců s poruchou imunity je zachycení oocyst snazší než u nakažených imunokompetentních jedinců, jelikož k vylučování spór dochází častěji (Gool et al. 2004).

Jak bylo řečeno, *E. cuniculi* způsobuje systémové infekce a tělem hostitele se šíří buď pomocí přímé infekce tkáň pólovou trubicí, nebo je transportován prostřednictvím makrofágů (Didier et Weiss 2008). Vzhledem k tomu, že makrofágy tvoří 10 – 78 % všech somatických buněk v mléce (například Pilla et al. 2013; Lee et al. 1980; Rivas et al. 2001; Boutet et al. 2003; tabulka 2), je velmi pravděpodobné, že *E. cuniculi* detekovaný v mléce v této studii byl do mléčné žlázy zanesen právě makrofágy.

Díky elektrodenzní proteinové a silné chitinové vrstvě je infekční spóra mikrosporidií velmi odolná proti nepříznivým podmínkám (Didier et al. 2004) jako je například dehydratace, vysoká vlhkost, nízké nebo vysoké pH i nízké teploty. Tímto způsobem jsou schopny odolávat i některým metodám tepleného ošetření mléka. (Lee 2008). Tato práce bezpochyby prokázala, že šetrná a vysoká pasterizace mléka, které se používá na výrobu sýrů, tvarohů, jogurtů a konzumního mléka je z hlediska devitalizace *Encephalitozoon cuniculi* neúčinná a parazit je schopen k další infekci v novém hostiteli. Vzhledem k velmi ojedinělému výskytu *E. cuniculi* v testovaných vzorcích mléka je otázkou, jaké nejmenší množství je potřebné k tomu, aby u daného jedince propukla infekce. Dle studie Didier et al. (1998) je pouze 100 spór dostatečných pro vyvolání smrtelné infekce u imunodeficitní myši.

Tato práce je vůbec první prací, která se touto problematikou zabývá jak v teroretické, tak experimentální úrovni. Na základě výsledků této studie lze říci, že mléko může být potencionálním zdrojem mikrosporidií pro člověka.

7. Závěry

- Byla zjištěna nízká prevalence *Encephalitozoon cuniculi* u dojeného skotu.
- Byla prokázána přítomnost *Encephalitozoon cuniculi* v mléce i trusu skotu.
- Šetrná a vysoká pasterizace používaná na výrobu sýrů, jogurtů, tvarohů a konzumního mléka nedeaktivizuje spóry *Encephalitozoon cuniculi*.
- Mléko ošetřené šetrnou a vysokou pasterizací představuje potenciální zdroj mikrosporidií pro člověka.

8. Citovaná literatura

Ardila-Garcia A. M., Fast N. M. 2012: Microsporidian infection in a free-living marine Nematode. American Society for Mikrobiology. 11:1544–1551.

Boutet P., Bureau F., Degang G., Lekeux P. 2003: Imbalance between lipoxin A4 and leukotriene B4 in chronic mastitis-affected cows. Journal Dairy Science. 86:3430–3439.

Del Coco V. F., Córdoba M. A., Bilbao G., Castro P. A., Basualdo J. A., Santín M. 2014: First report of *Enterocytozoon bieneusi* from dairy cattle in Argentina. Veterinary Parasitology. 199:112–115.

Didier E. S., Snowden K. F., Shadduck J. A. 1998: Biology of microsporidian species infecting mammals. Advence Parasitology. 40:283–320.

Didier E. S., Vossbrinck C. R., Baker M. D., Rogers L. B., Bertucci D. C., Shadduck J. A. 1995: Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology. 111:411–21.

Didier E. S., Vossbrinck C. R., Stovall M. E., Green L. C., Bowers L., Fredenburg A., Didier P. J. 2004: Diagnosis and epidemiology of microsporidia infections in humans. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 35:65–81.

Didier E. S., Weiss L. M. 2006: Microsporidiosis: current status. Current Opinion Infectious Diseases. 19:485–492.

Didier E. S., Weiss L. M. 2008: Overview of microsporidia and microsporidiosis. Protistology. 5:243–255.

Dosogne H., Vangroenweghe F., Mehrzad J., Massart-Leen A. M., Burvenich C. 2003: Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. Journal Dairy Science. 86:828–834.

Fasshauer V., Gross U., Bohne W. 2005: The Parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* lack host cell membrane proteins immediately after invasion. American Society for Microbiology. 4:221–224.

Fedorko D. P., Nelson N. A., Cartwright C. P. 1995: Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:1739–1741.

Franzen C., Müller A. 2001: Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection*. 3:389–400.

Gool T., Biderre C., Delbac F., Wentink-Bonnema E., Peek R., Vivares Ch. P. 2004: Serodiagnostic studies in an immunocompetent individual infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *The Journal of Infectious Diseases*. 189:2243–2249.

Halánová M., Letková V., Macák V., Štefkovič M., Halán M. 1999: The first finding of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cows in Slovakia. *Veterinary Parasitology*. 82:167–171.

<http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/100112113.html> - staženo dne 10.3.2015

<http://www.szu.cz/tema/prevence/antropozoonozy> - staženo dne 8.4.2015

Islam M. A., Alam M. K., Islam M. N., Khan M. A. S., Ekeberg D., Rukke E. O., Vegarud G. E. 2014: Principal milk components in buffalo, holstein cross, indigenous cattle and red chittagong cattle from Bangladesh. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 27:886–897.

Izquierdo F., Castro Hermida J. A., Fenoy S., Mezo M., González-Warleta M., del Aquila C. 2011: Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water Research*. 45:4837–4843.

Jabed A., Wagner S., McCracken J., Wells D. N., Laible G. 2012: Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of β -lactoglobulin-free, high-casein milk. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*. 109:16811–16816 .

Jedrzejewski S., Graczyk T. K., Ślodka-Kowalska A., Tamang L., Majewska A. 2007: Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:4071–4073.

Jelínek P., Koudela K., Doskočil J., Illek J., Kotrbáček V., Kovářů F., Kroupová V., Kučera M., Kudláč E., Trávníček J., Valent M. 2003: Fyziologie hospodářských zvířat. Brno: Grafos. 343–348. ISBN 80-7157-644-1.

Juránková J., Kamler M., Kovařík K., Koudela B. 2013: *Enterocytozoon bieneusi* in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infected and noninfected cattle herds. Research in Veterinary Science. 94:100–104.

Katinka M. D., Duprat S., Cornillot E., Méténier G., Thomarat F., Prensier G., Barbe V., Peyretailade E., Brottier P., Wincker P., Delbac F., Alaoui H. E., Peyret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivarés Ch. P. 2001: Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. International Weekly Journal of Science. 414:450–453.

Katzwinkel-Wladarsch S., Lieb M., Heise W., Löscher T., Rinder H. 1996: Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. Tropical Medicine and International Health. 1:373–378.

Koess C., Hamann J. 2008: Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. Journal Dairy Research. 75:225–232.

Kotková M., Sak B., Květoňová D., Kváč M. 2013: Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. PLoS ONE. 8:e60941.

Kotler D. P., Orenstein J. M. 1998: Clinical syndromes associated with microsporidiosis. Advances Parasitology. 40:321–49.

Lee J. H. 2007: Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. Applied and Environmental Microbiology. 74:1664–1666.

Lee C. S., Wooding F. B. P., Kemp P. 1980: Identification properties and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cow

secretions, colostrums and milk from normal cows. *Journal Dairy Research*. 47:39–50.

Leitner G., Shoshani E., Krifucks O., Chaffer M., Saran A. 2000: Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *Journal Veterinary Medicine B Infectious Diseases Veterinary Public Health*. 47:581–589.

Markell E. K., John D. T., Krotoski W. A. 1999: *Markell and Voge's Medical Parasitology*. United States of America: W.B. Saunders Company. 84–88. ISBN 0-7216-7634-0.

Merle R., Schroder A. C., Hamann J. 2007: Cell function in the bovine mammary gland: a preliminary study on interdependence of healthy and infected udder quarters. *Journal Dairy Research*. 74:174–179.

Miller R. H., Paape M. J., Fulton L. A. 1991: Variation in milk somatic cells of heifers at first calving. *Journal Dairy Science*. 74:3782–3790.

Mo L., Drancourt M. 2004: Monoclonal antibodies for specific detection of *Encephalitozoon cuniculi*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 11:1060–1063.

Moretto M., Weiss L. M., Khan I. A. 2004: Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral *Encephalitozoon cuniculi* infection. *The Journal of Immunology*. 172: 4402 – 4409.

Paape M. J., Wergin W. P., Guidry A. J., Schultze W. D. 1981: Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Advence Experimental Medicine Biology* 137:555–578.

Pilla R., Malvisi M., Snel G. G. M., Schwarz D., König S., Czerny C.-P., Piccinini R. 2013: Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *Journal of Dairy Science*. 96:1653–1660.

Pilla R., Schwarz D., König S., Piccinini R. 2012: Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *Journal Dairy Science*. 95:4410–4420.

Rivas A. L., Quimby F. W., Blue J., Coksaygan O. 2001: Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 13:399–407.

Sak B., Kváč M., Kučerová Z., Květoňová D., Saková K. 2011: Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals – A longitudinal study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 5:e1162.

Schröder A. C., Hamann J. 2005: The influence of technical factors on differential cell count in milk. *Journal Dairy Research*. 72:153–158.

Schwarz D., Diesterbeck U. S., Failing K., Köning S., Brügemann K., Zschöck M., Wolter W., Czerny C. P. 2010: Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk sample of cows in Hesse, Germany – A longitudinal study. *Journal of Dairy Science*. 93:5716–5728.

Schwarz D., Diesterbeck U. S., Koenig S., Bruegemann K., Schlez K., Zschoeck M., Wolter W., Czerny C. P. 2011a: Microscopic differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal Dairy Research*. 78:448–455.

Schwarz D., Diesterbeck U. S., Koenig S., Bruegemann K., Schlez K., Zschoeck M., Wolter W., Czerny C. P. 2011b: Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal Dairy Science*. 94:5033–5044.

Vivarès, C. P., Gouy, M., Thomarat, F. 2002: Functional and evolutionary analysis of eukaryotic genome. *Current Opinion Microbiology* 5: 499-505.

Volf P., Horák P. 2007: *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton. 132–135. ISBN 978-80-7387-008-9.

Weber R., Bryan R. T., Schwartz D. A., Owen R. L. 1994: Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 7:426–461.

Wright J. H., Craighead E. M. 1922: Infectious motor paralysis in young rabbits. *Journal Experimental Medicine*. 36:135–140.