



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra zootechnických věd

Bakalářská práce

Vliv managementu a technologie odchovu telat na výskyt
parazitárních onemocnění

Autorka práce: Petra Pařízková

Vedoucí práce: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

České Budějovice
2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Vzorky trusu byly odebírány ve vybraném zemědělském podniku na dvou farmách mléčného skotu. Byl sledován vliv managementu a technologie na výskyt kryptosporidiových a eimeriových infekcí. Celkem bylo sledováno 20 telat z každé farmy od narození do 16. týdne stáří a vzorky trusu každého zvířete byly vyšetřovány každý týden. Celkem bylo odebráno a vyšetřeno 680 vzorků trusu. Detekce parazitů byla provedena kombinací standardních parazitologicko-mikroskopických a molekulárních metod. Byly zjištěny infekce *C. parvum* subtyp IIaA13G1R1 a IIaA17G1R1, *C. ryanae* subtyp XXIc, *E. zuernii*, *E. cylindrica*, *E. elipsoidalis*, *E. bovis*, *E. auburnensis* a *E. subsferica*.

Kumulativní prevalence *C. parvum* ve sledovaných chovech dosáhla 85 % a výskyt infekce byl zjištěn od jednoho týdne do čtyř týdnů stáří zvířat. Kumulativní prevalence *Eimeria* spp. dosáhla hodnoty 100 % v 16. týdnu stáří telat z obou sledovaných farem. Byly zjištěny nedostatky ve způsobu odchovu telat (absence dezinfekce, nesystémové umístění zvířat do volných venkovních individuálních boxů). Napájení kvalitním mlezivem s vyšším obsahem imunoglobulinů vedlo ke snížení intenzity infekce způsobené *C. parvum*.

S prodlužující se dobou pobytu telete v prostředí porodny a umístování nově narozených zvířat do kontaktu se staršími telaty vedlo k zvýšenému riziku infekce eimeriemi. Nevyhovující technologie společného odchovu telat po odstavu vedlo k zvýšenému výskytu průjmů.

Klíčová slova: skot; paraziti; *Eimeria*; *Cryptosporidium*; technologie; infekce; PCR

Abstract

Faecal samples were collected from two dairy farms. The influence of management and technology on the incidence of *Cryptosporidium* and *Eimeria* infections was investigated. A total of 20 calves from each farm were observed from birth to 16 weeks of age, and faecal samples from each animal were examined weekly. A total of 680 faecal samples were collected and examined. Parasite detection was performed by a combination of standard parasitological microscopic and molecular methods. Infections with *C. parvum* subtypes IIaA13G1R1 and IIaA17G1R1, *C. ryanae* subtype XX1c, *E. zuernii*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. bovis*, *E. auburnensis*, and *E. subsferica* were detected.

The cumulative prevalence of *C. parvum* on the sampled farms was 85 %, and the prevalence of infection was detected at one to four weeks of age. The cumulative prevalence of *Eimeria* spp. reached 100 % in calves from both monitored farms at 16 weeks of age. Feeding high-quality colostrum with a higher immunoglobulin content reduced the intensity of infections caused by *C. parvum*.

The risk of *Eimeria* infection increased with the length of time calves remained in the farrowing room when the newborn animals were in contact with older calves. Inadequate technique for raising calves together after weaning resulted in an increased incidence of diarrheal disease.

Keywords: cattle; parasites; *Eimeria*; *Cryptosporidium*; technology; infection; PCR

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu práce prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za vedení, odbornou pomoc a cenné rady při tvorbě této práce. Dále děkuji všem pracovníkům Laboratoře veterinární a humánní protistologie, Parazitického ústavu BC AV ČR za pomoc a trpělivost při práci v laboratoři. Mé poděkování také patří zemědělskému družstvu, které umožnilo realizovat tuto práci.

Obsah

Úvod.....	9
1 Literární přehled.....	10
1.1 Odchov telat.....	10
1.1.1 Odchov telat s matkou.....	10
1.1.2 Ustájení telat s kojnými krávami.....	10
1.1.3 Venkovní odchov telat v individuálních boudách.....	10
1.1.4 Kotcové ustájení s mléčným krmným automatem	11
1.1.5 Kotcová stlaná ustájení s fixací při napájení.....	11
1.2 Příčiny průjmových onemocnění telat.....	11
1.3 Parazitární původci průjmových onemocnění telat	12
1.4 Giardie	12
1.5 Kryptosporidie.....	14
1.6 Kryptosporidióza	15
1.7 Kryptosporidie infikující skot.....	16
1.7.1 <i>Cryptosporidium parvum</i>	16
1.7.2 <i>Cryptosporidium ryanae</i>	17
1.7.3 <i>Cryptosporidium bovis</i>	18
1.7.4 <i>Cryptosporidium andersoni</i>	18
1.8 Kokcidie	18
1.9 Kokcidióza.....	21
1.10 Nejpatogennější eimerie u skotu.....	22
1.10.1 <i>Eimeria bovis</i>	22
1.10.2 <i>Eimeria ellipsoidalis</i>	22
1.10.3 <i>Eimeria zuernii</i>	22
2 Cíle.....	23

3	Materiál a metodika.....	24
3.1	Materiál.....	24
3.1.1	Farma Pořín.....	24
3.1.2	Farma Kloužovice.....	25
3.1.3	Farma Chotčiny.....	25
3.2	Metodika.....	25
3.2.1	Barvení anilin-karbol-methyl violetí dle Miláčka a Vítovce.....	25
3.2.2	Flotace.....	26
3.2.3	Izolace gDNA.....	27
3.2.4	Polymerázová řetězová reakce.....	28
3.2.5	Elektroforéza na agarozovém gelu.....	31
3.2.6	Extrakce z gelu.....	32
3.2.7	Sekvenace vzorků.....	32
3.2.8	Statistická analýza.....	32
4	Výsledky.....	33
4.1	Technologie chovu.....	33
4.2	Mikroskopické vyšetření.....	33
4.3	Délka infekce.....	34
4.4	Genotypizace kryptosporidií.....	34
4.5	Genotypizace eimerií.....	35
4.6	Vliv věku na přítomnost <i>Cryptosporidium parvum</i>	36
4.7	Vliv věku na přítomnost <i>Eimeria</i> spp.....	37
4.8	Vliv sledovaných parazitů na výskyt průjmových onemocnění.....	40
5	Diskuse.....	43
	Závěry a doporučení.....	48
	Seznam použité literatury.....	49
	Seznam grafů.....	62

Seznam obrázků	63
Seznam tabulek	64
Seznam použitých zkratk.....	65

Úvod

Hlavním cílem chovatele skotu je odchovat zdravá telata. Vysoká nemocnost a nízká intenzita růstu v průběhu období mléčné výživy předurčuje jejich budoucí užitkovost. Ke správnému a úspěšnému odchovu telat je nezbytný dobrý zdravotní stav, ke kterému přispívá vytvoření správných životních podmínek nebo-li welfare, a zabezpečení kvalitní výživy. Špatný zdravotní stav zvířat zhoršuje ekonomickou situaci a náklady na odchov. Tele, které je často sužováno nemocemi, ať neinfekčními či infekčními (bakteriální, virové, parazitární), již nikdy v budoucnu nevykáže požadovanou užitkovost, ke které má genetické předpoklady. U mnohých zvířat se v důsledku častého používání léčiv, zejména antibiotických preparátů, vyskytne nulová reakce na podané účinné látky a projeví se rezistence k původcům těchto onemocnění. Kvalita chovatelského prostředí již u telat, je určující a rozhodující faktor pro zdárný odchov nových plemenic. Z důvodu časté neodbornosti a nedostatečné péče ošetřovatelů není dosaženo požadovaných výsledků. Rozvoj znalostí a odbornosti zaměstnanců, by měl být cílem každého chovatele skotu. Investice do této činnosti se vrátí ve zdraví telat a jejich vývoji a budoucí užitkovosti.

I přes velmi dobře zvládnuté odborné poradenství a konzultace představují parazitární onemocnění nejen dojeného skotu problém mnohých chovů. Z tohoto důvodu je velice důležité provádět i prevenci proti jejich výskytu. Ta spočívá zejména v udržování čistoty chovatelského prostředí, řádné dezinfekci individuálních boxů, důkladném vymývání nádob po podávání nativního a sušeného mléka. Dále pak vyhodnocení faktorů, které mohou přispívat k šíření původců těchto onemocnění v chovech. Paraziti rodu *Cryptosporidium* a *Eimeria* patří dosud i přes veškeré pokroky v chovu skotu k častějším původcům průjmových onemocnění telat. Tato práce se zabývá vlivem technologie odchovu skotu na výskyt těchto parazitů, včetně druhové determinace ve vybraných chovech.

1 Literární přehled

1.1 Odchov telat

1.1.1 Odchov telat s matkou

Tele je odchováváno společně s matkou. Tento typ odchovu je typický v chovech krav bez tržní produkce mléka. Je to nejpřirozenější způsob a odpovídá fyziologickým potřebám telat (Brouček, 2008). V rámci tohoto typu odchovu nejsou zvířata přikrmována mléčnými krmnými náhražkami a výživa telete je v prvních týdnech a měsících života plně saturována mlezivem, respektive mlékem matky.

1.1.2 Ustájení telat s kojnými krávami

Ustájení je realizováno ve stlaných kotcích, kde se nacházejí maximálně 3 kojné krávy. Počet telat v kotci je určován podle produkce krav, aby na jedno tele připadalo 5–6 kg mléka denně. Telata se přesouvají ke kojným krávám po skončení mlezivové výživy a během odchovu se nepřikrmují mléčnou krmnou směsí. Tento druh odchovu pozitivně působí na růst telat, jejich zdravotní stav a dřívější návyk na objemná krmiva. Pro kojné krávy se využívají dojnice, které jsou vyřazeny z plemnitby nebo jejich vemenem neodpovídá požadavkům pro strojní dojení (Brouček, 2008).

1.1.3 Venkovní odchov telat v individuálních boudách

Slouží k odchovu telat na mléčné výživě. Výhody použití venkovních individuálních boxů (VIB) jsou eliminace přenosu nemocí mezi telaty a jednoduchá kontrola příjmu potravy (Staněk et al., 2014).

Boudy by od sebe měly být rozmístěny tak, aby na sebe zvířata viděla, ale zamezilo se kontaktu mezi telaty (Brouček, 2008). V případě, že jsou VIB umístěny tak, že dochází k fyzickému kontaktu, může docházet k přenosu infekčních agens (Geden et al., 1990). VIB by měly splňovat základní hygienické podmínky (omyvatelnost, dezinfikovatelnost), měly by být odolné vůči povětrnostním podmínkám a umožňovat snadnou manipulaci (Doležal et al., 2015).

Rozměry boudy mají být: délka 2 m, šířka 1,2 m, výška vepředu 1,2 m a vzadu 1,1 m. Výběh odpovídá rozměrům 1,8 × 1,2 m (Brouček, 2008).

1.1.4 Kotcové ustájení s mléčným krmným automatem

Telata jsou ustájena v kotcích, která jsou stlaná. Jejich další součástí je napáječka a žlab na startovací krmnou směs. Na kotec s jedním mléčným automatem řízeným počítačem, připadá okolo 30, maximálně 50 telat. Každé tele má individuálně nastavenou dávku krmné náhražky a časový interval podle věku, živé hmotnosti a chovatelského záměru (Brouček, 2008).

Nevýhodou tohoto ustájení je riziko přenosu infekčních agens, a tudíž nutná častá kontrola zdravotního stavu (Strapák et al., 2013).

1.1.5 Kotcová stlaná ustájení s fixací při napájení

Telata jsou odchovávaná ve skupině. Kotec disponuje krmným žlabem s fixací telat při napájení a možností uzavřít přístup zvířat ke žlabu v době zakládání krmné směsi (Brouček, 2008). Stejně jako v předchozím typu ustájení, dochází k riziku přenosu infekčních agens mezi jedinci.

1.2 Příčiny průjmových onemocnění telat

Průjmová onemocnění jsou u telat velmi častá a patří k hospodářsky nejvýznamnějším onemocněním. Jsou hlavní příčinou úhynu novorozených telat. Jejich nebezpečí spočívá v zastavení růstu a zvýšení mortality především u telat na mléčné výživě a v období odstavu (Smith, 2012).

Příčiny průjmů můžeme rozdělit do dvou kategorií dle příčiny, a to na infekční a neinfekční. Mezi neinfekční příčiny patří karence mikroprvků, hypovitaminóza, nízká hygienická úroveň chovu a nedodržování zásad správné chovatelské praxe (Jarolímková, 2020). Další neinfekční příčinou propuknutí onemocnění jsou stresové faktory. Řadíme do nich znečištěný porodní kotec, pozdní podání mleziva, špatně připravená mléčná náhražka (rozmíchání, změna složení, nízká teplota nápoje), podřadná kvalita krmiva, nedostatečná hygiena napájecích nádob, více jak jedno tele na jedno krmné místo (Weerda et al., 2021).

Mezi příčiny infekčních průjmů řadíme viry (coronaviry, rotaviry, adenoviry, BVD), bakterie (*Clostridium*, *Salmonella*, *Escherichia coli*) a parazity (kryptosporidie, kokcidie) (Jarolímková, 2020). Za syndrom novorozeneckého průjmu u telat jsou ve většině případů zodpovědné rotaviry společně s koronaviry (Cruvinel et al., 2020).

Ponechání telete příliš dlouho s matkou může mít významný vliv na přenos infekce z matky na tele (Weerda et al., 2021).

1.3 Parazitární původci průjmových onemocnění telat

U telat se setkáváme nejčastěji se třemi parazitárními původci, kteří způsobují závažná průjmová onemocnění. Konkrétně se jedná o *Giardia intestinalis* původce giardiózy, *Cryptosporidium* spp. původce kryptosporidiózy a *Eimeria* spp. původce eimerií. Jednotlivá parazitární agens jsou podrobně popsána v následujících kapitolách.

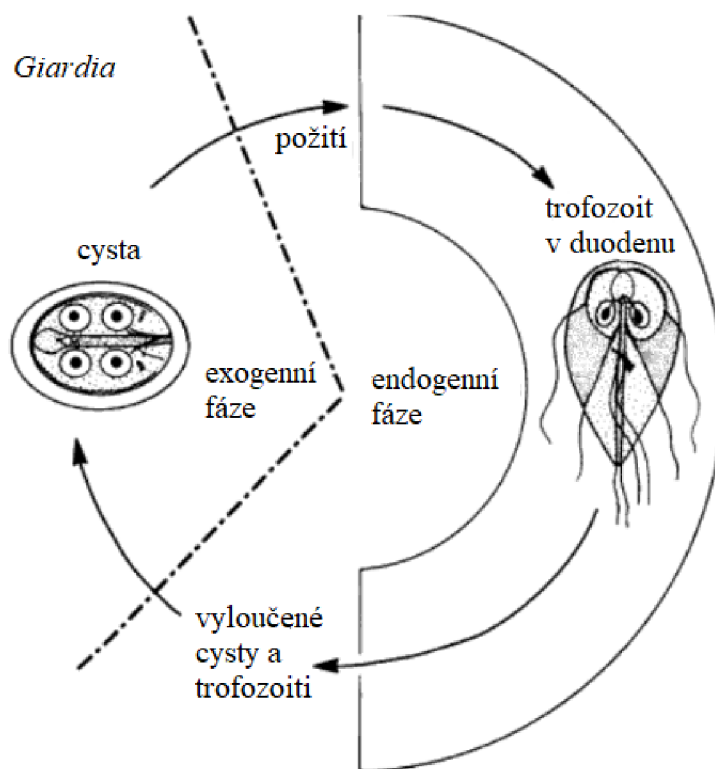
1.4 Giardie

V rámci rodu *Giardia* rozlišujeme několik hostitelsky specifických druhů. Druhy *Giardia agilis*, *Giardia ardeae*, *Giardia muris* parazitující u obojživelníků, ptáků nebo hlodavců nejsou pro své hostitele téměř patogenní. U savců, včetně skotu a člověka, se setkáváme s *Giardia intestinalis*, která se dělí do osmi asambláží (genotypů). Zatímco asambláže A a B jsou charakteristické svou širokou hostitelskou specifičností, ostatní asambláže C–H jsou infekční pouze pro omezený počet hostitelů. U skotu, respektive u telat jsou nejčastěji detekovány asambláže A a B (Abdel-Moein et Saeed, 2016).

Giardia intestinalis, starší název *Lambliia intestinalis*, je kosmopolitní, patogenní, pohyblivý a anaerobní prvok. První popis *G. intestinalis* učinil v roce 1859 český lékař, profesor Vilém Dušan Lambl (Čermáková et al., 2008).

Biologický cyklus *G. intestinalis* je přímý (obrázek 1.1), ke svému vývoji nepotřebuje mezihostitele (Čermáková et al., 2008). Cysty giardií (odolné, mají čtyři jádra) jsou vylučovány trusem. Velikost cyst je 8–12 × 7–10 μm. Cysty po pasáži žaludkem v duodenu excystují a dochází k uvolnění trofozoitů, o velikosti 1–20 × 6–16 μm, kteří se šíří do jejunu (Volf et Horák, 2007). Vegetativní stádia giardií (trofozoiti) jsou pohyblivá, hruškovitého tvaru a mají 2 jádra, 8 bičíků a přísavný disk, který slouží k přichycení k povrchu enterocytů (Čermáková et al., 2008; Volf et Horák, 2007).

Obrázek 1.1: Životní cyklus *Giardia* sp. podle Gardiner, 1988.



Parazit neproniká do buněk epitelu. Po adhezci giardií vznikají na střevním epitelu mikroskopické léze, na které reaguje epitel zkrácením a zesílením střevních mikrokloků (Čermáková et al., 2008). Hlavním příznakem onemocnění je nekrvavý průjem s hlenem bez hnisavé příměsi, který je doprovázen bolestmi břicha, nechutenstvím až zvracením. Při nákaze dochází k poruše štěpení a vstřebávání tuků a sacharidů (průjmová stolice bývá světlá a mastná) (Volf et Horák, 2007). Giardióza u telat je poprvé pozorována u jedinců ve stáří čtyř týdnů a vylučování cyst pokračuje i déle než šest měsíců (Thompson et al., 2003).

Nejčastější zdroj nákazy je voda kontaminovaná cystami giardií (Čermáková et al., 2008). Nicméně zdrojem mohou být i infikovaní jedinci v rámci stáda, respektive odchovu. Cysty giardií jsou velmi odolné vůči podmínkám vnějšího prostředí. Běžné chlorové preparáty využívané k dezinfekci nebo chlórování vody nejsou pro giardie devitalizující (Volf et Horák, 2007). Cysty giardií jsou velmi citlivé na zvýšenou teplotu, 10-minutový var je spolehlivě devitalizuje (Čermáková et al., 2008). Inkubační doba giardiózy je od jednoho do tří týdnů (Volf et Horák, 2007).

1.5 Kryptosporidie

Cryptosporidium je obligátní, gastrointestinální, protozoární parazit patřící do kmene Apicomplexa, jednoho z největších kmenů parazitických prvoků. Většina zástupců tohoto kmene jsou veterinárně závažní paraziti. Všichni zástupci kmene Apicomplexa jsou adaptováni na život uvnitř nebo na povrchu hostitelských buněk (Volf et Horák, 2007).

Prvoci rodu *Cryptosporidium* byly původně řazeny mezi kokcidie, ale fylogenetickými analýzami bylo prokázáno, že kryptosporidie jsou příbuzné s gregarinami (Volf et Horák, 2007).

Paraziti rodu *Cryptosporidium* byly poprvé popsány v roce 1907, když byl detekován nový druh parazita, *Cryptosporidium muris*, v žaludečních žlázách laboratorních myši (Tyzzer, 1907). O několik let později byl publikován kompletní morfologický popis a životní cyklus parazita *C. muris* (Tyzzer, 1910). O dva roky později popsal Tyzzer nový druh z laboratorních myší, *Cryptosporidium parvum*, který se lišil jak místem infekce, tak oocystami (Tyzzer 1912; Thompson et al., 2003).

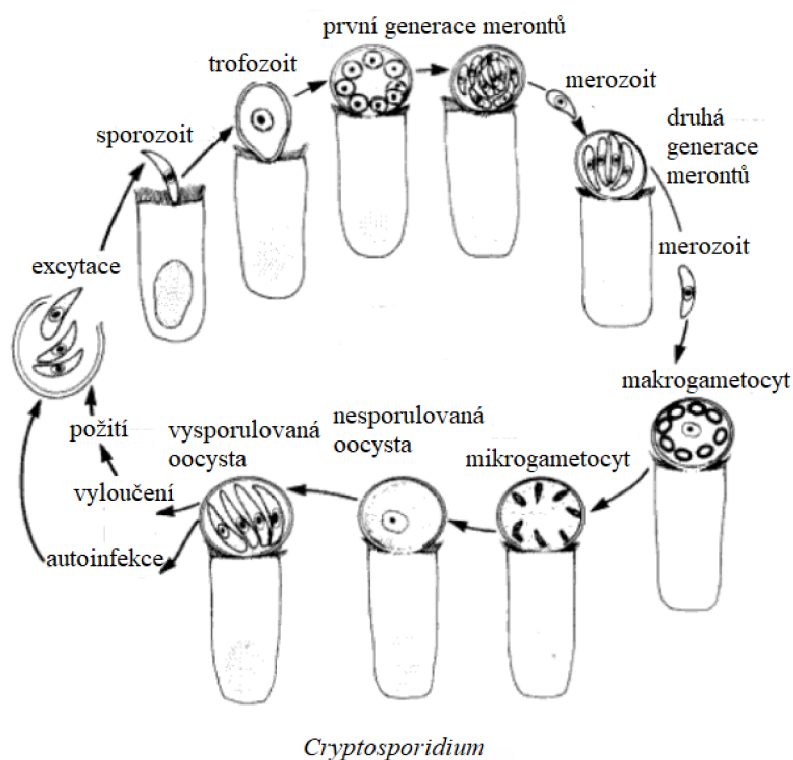
Infekce vyvolané kryptosporidii jsou jednou z nejčastějších příčin průjmu u hospodářských zvířat a lidí na celém světě (Santín et al., 2004). Kryptosporidie parazitují u mnoha druhů hospodářských zvířat, domácích zvířat, laboratorních zvířat a volně žijících zvířat. Druh *C. parvum* je mezi všemi druhy kryptosporidií výjimečný svou širokou hostitelskou specifikou, jeho infektivita byla prokázána u velkého množství savců a předpokládá se, že je infekční pro všechny savce (Thompson et al., 2003). Tento druh je infekční i pro některé ptáky (Holubová et al., 2016).

Rozšíření kryptosporidií je kosmopolitní (Thompson et al., 2003). Infekční stádia, sporozoiti, jsou uloženy v oocystách, které jsou velmi malé a velikost se pohybuje okolo 5 až 7 μm (Volf et Horák, 2007). Kryptosporidie mají specifickou tkáňovou lokalizaci, a to v zóně mikrokloků střev, epitelu vystylajícím žaludeční stěnu nebo v epitelu dýchacích cest (Volf et Horák, 2007).

Vývojový cyklus kryptosporidií je jednohostitelský. Po požití oocysty se v místě infekce z oocysty uvolňují sporozoiti, kteří pronikají k enterocytům. Excystování paraziti se rozmnožují nejprve nepohlavně (meront typu I a II) a pohlavně. Z merozoitů I a II typu se vytvářejí makrogametocyty a mikrogametocyty. Po oplození makrogametocytů mikrogametami se vyvíjejí zygoty, které sporulují v hostiteli a

vznikají oocysty odcházející ven z hostitele (Cho et Yoon, 2014). Životní cyklus rodu *Cryptosporidium* je uveden na obrázek 1.2.

Obrázek 1.2: Vývojový cyklus rodu *Cryptosporidium*, upraveno podle Gardiner, 1988.



1.6 Kryptosporidióza

Onemocnění může propuknout sporadicky nebo v rozsáhlé epidemie. Kryptosporidie se přenáší přímou fekálně-orální cestou, kontaktem s nakaženými jedinci nebo nepřímo, kontaminovanou vodou nebo potravou (Zahedi et Ryan, 2020). K přenosu může dojít z člověka na člověka, ze zvířete na člověka nebo ze zvířete na zvíře (Glberman et al., 2002). K přenosu nákazy může dojít také při kontaktu s kontaminovaným materiálem, jako jsou například znečištěné oděvy, obuv nebo pracovní pomůcky (Bouzid et al., 2013).

Kryptosporidie mohou za příznivých podmínek (teplota a vlhkost s nízkým UV zářením) přežít v prostředí déle než měsíc a jsou odolné k většině dezinfekčních prostředků (Cho et Yoon, 2014). Účinná léčba kryptosporidiózy je dosud neznámá (Volf et Horák, 2007). Pro léčbu kryptosporidiózy schválil Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv přípravek nitazoxanid, který může v mírné míře pomoci k odstranění parazita a zkrátit dobu klinických příznaků (Gargala, 2008). Ovšem

výzkum ukázal, že tento lék není účinný u pacientů s oslabenou imunitou (Amadi et al., 2009). U skotu je používán lék Halocur, který však pouze snižuje intenzitu infekce (Weerda et al., 2021).

1.7 Kryptosporidie infikující skot

Dosud bylo popsáno 49 druhů kryptosporidií, z nichž čtyři se běžně vyskytují u skotu (Yang et al., 2020). Kryptosporidíóza skotu byla poprvé detekována jalovice trpící chronickým průjemem, anorexií a dehydratací. Histologické vyšetření prokázalo infekci jejunu a jako příčina byly označeni paraziti rodu *Cryptosporidium* (Pancieri et al., 1971).

Mezi druhy infikující skot patří *C. parvum* (Tyzzer, 1910), *Cryptosporidium ryanae* (Fayer et al., 2008), *Cryptosporidium bovis* (Fayer et al., 2005) a *Cryptosporidium andersoni* (Lindsay et al., 2000).

Zatímco infekce *C. parvum* je spojena s klinickými příznaky onemocnění, infekce ostatními druhy probíhá většinou asymptomaticky (Thompson et al., 2003).

1.7.1 *Cryptosporidium parvum*

Hostitel: *Cryptosporidium parvum* má nejnižší hostitelskou specifitu, může být infekční pro všechny savce. Je to nejrozšířenější kryptosporidie (Fayer et al., 2000a).

Lokalizace: *Cryptosporidium parvum* kolonizuje tenké střevo mladých zvířat a lidí (Santín et al., 2004).

Morfologie: Pro toho parazita jsou typické kulaté oocysty o velikosti $5,0 \times 4,5 \mu\text{m}$ (Fayer et al., 2008; Upton et Current, 1985).

Patogenita a patogeneze: Telata se obvykle nakazí ve stáří jednoho až čtyř týdnů a trvání infekce je krátké, trvá asi dva týdny. Telata začínají vylučovat oocysty ve čtyřech dnech věku s maximálním vylučováním ve dvou týdnech. Vylučování oocyst trvá přibližně 10 dní (Thompson et al., 2003).

Telata infikovaná *C. parvum* mohou být asymptomatická nebo se u nich může rozvinout těžký průjem s dehydratací (Cho et Yoon, 2014). Patogeneze průjmu je důsledkem invaze parazitů a destrukce epitelu vedoucí k atrofii klků a destrukci mikrokloků. Klinické příznaky u telat jsou obvykle pozorovány ve věku 7–30 dnů. Telata jsou obvykle letargická, anorektická a může se projevit dehydratace spojená s průjmem (Thompson et al., 2003). Kontinuální telení v chovech dojeného skotu

poskytuje příležitost k celoročnímu přenosu kryptosporidií na novou vnímavou populaci. U masného skotu je tento cyklus přerušen díky sezónnímu telení (telata se rodí během jednoho až dvou měsíců na jaře) (Thompson et al., 2003).

Subtypy: Pro určení subtypů se používá analýza sekvenace genu kódujícího 60 kDa glykoprotein (*gp60*) (Xiao, 2010). Podtypy *C. parvum* jsou uvedeny v tabulce 1.1.

Tabulka 1.1: Přehled *gp60* subtypových rodin *Cryptosporidium parvum* a jejich ozančení (Xiao, 2010).

Alela	Trinukleotid	GenBank číslo
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)

1.7.2 *Cryptosporidium ryanae*

Hostitel: *Cryptosporidium ryanae* se vyskytuje většinou u telat po odstavu (Yang et al., 2020). Infekce touto kryptosporidií byly popsány u různých věkových kategorií skotu (Santín et al., 2004).

Lokalizace: Parazit se vyskytuje ve střevě hostitele (Fayer et al., 2008).

Morfologie: Oocysty jsou podobné oocystám *C. parvum* a *C. bovis*, ale jsou menší.

Měří $3,16 \times 3,73 \mu\text{m}$ (Fayer et al., 2008).

Patogenita: Prepatentní perioda trvá 11 dní a patentní období 15–17 dní. Průběh onemocnění je bez klinických příznaků (Fayer et al., 2008; Åberg et al., 2020).

Subtypy: *Cryptosporidium ryanae* se na základě sekvencí genu *gp60* dělí do 8 subtypových rodin, které jsou označeny XXIa, XXIb, XXIc, XXIId, XXIe, XXIIf, XXIg a XXIh (Yang et al., 2020).

1.7.3 *Cryptosporidium bovis*

Hostitel: *Cryptosporidium bovis* se vyskytuje u skotu (Santín et al., 2004). Dříve byl tento druh označován jako *Cryptosporidium* genotype Bovine B (Fayer et al., 2005).

Lokalizace: *Cryptosporidium bovis* bylo detekováno v tenkém střevě experimentálně infikovaných telat (Fayer et al., 2005).

Morfologie: *Cryptosporidium bovis* má morfologicky nerozeznatelné oocysty od oocyst *C. parvum*. Oocysty jsou vylučovány plně sporulované, obsahující čtyři sporozoity. Jejich velikost je $4,9 \times 4,3 \mu\text{m}$ (Fayer et al., 2005).

Patogenita: Prepatentní perioda *C. bovis* je 10 dní a patentní perioda trvá 18 dní (Fayer et al., 2005).

Fayer et al. (2005) a Åberg et al. (2020) uvádějí ve svých studiích, že telata nevykazují příznaky onemocnění.

1.7.4 *Cryptosporidium andersoni*

Hostitel: *Cryptosporidium andersoni* infikuje především mladý, ale i dospělý skot (Santín et al., 2004). Jsou zaznamenány i případy, kdy došlo k infekci u lidí, velbloudů, dalších přežvýkavců a hlodavců (Feng et al., 2011; Kváč et al., 2016).

Lokalizace: *Cryptosporidium andersoni* je přítomné ve slezu skotu od pátého měsíce stáří (Thompson et al., 2003).

Morfologie: Oocysty měří v rozmezí $6,0\text{--}8,1 \times 5,0\text{--}6,5 \mu\text{m}$ a jsou elipsoidního tvaru. Bezbarvá stěna je silná $<1 \mu\text{m}$, mikropyle není zřetelné a na jednom pólu je podélný šev (Lindsay et al., 2000).

Patogenita: Žaludeční sliznice při infekci *C. andersoni* je bledá. V místě infekce jsou přítomny výrazné dilatace a atrofie žláz, metaplazie žláz buněk epitelu a hyperprodukce hlenu (Kváč et Vítovec, 2003).

Klinické příznaky nejsou viditelné. Průběh onemocnění je chronický bez přítomnosti průjmu. Onemocnění může mít vliv na mléčnou produkci (Kváč et Vítovec, 2003).

1.8 Kokcidie

Kokcidie jsou malé, typicky intracelulární, jednobuněční paraziti. Vývojový cyklus zahrnuje tři fáze, tj. merogonie, gametogonie a sporogonie. Životní cyklus se může uskutečňovat v jednom hostiteli (monoxenní) nebo ve více hostitelích (heteroxenní)

(Ryšavý, 1989; Volf et Horák, 2007). Mezi kokcidie dále řadíme kromě rodu *Eimeria* např. rod *Isoospora*, *Toxoplasma*, *Cyclospora* nebo *Sarcocystis* (Volf et Horák, 2007). Kokcidie rodu *Eimeria* se převážně vyvíjí v různých částech střevní tkáně, ale setkáváme se i s mimo střevní reprodukcí, například u *Eimerie stiedai* v játrech králíků nebo *Eimerie truncata* v ledvinách hus (Ryšavý, 1989).

V této práci se budeme věnovat pouze rodu *Eimeria* vyskytujícím se u skotu.

Většina eimerií je striktně hostitelsky specifická a zároveň mají i výraznou tkáňovou specifitu (Ryšavý, 1989). Nejčastěji jsou infikovaná telata ve věku tři týdnů až 12 měsíců (Lassen et al., 2009).

Eimerie patří mezi nejčastější parazity skotu na světě (Lassen et al., 2009). Celosvětově bylo u skotu popsáno více než 20 druhů eimerií, z nichž bylo 13 druhů zjištěno v Evropě (Enemark et al., 2013). Morfologie jednotlivých druhů oocyst je uvedena v tabulce 1.2.

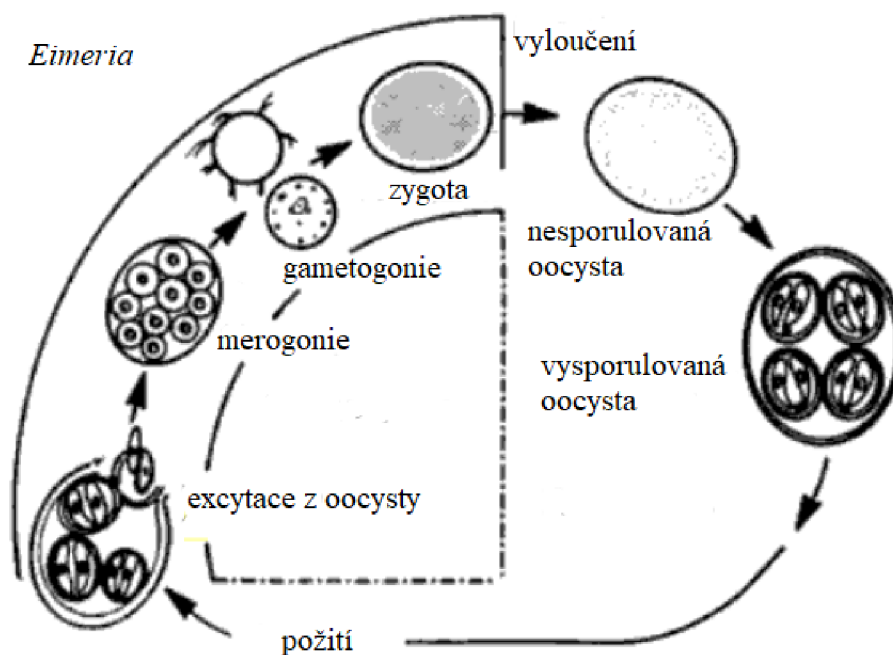
Tabulka 1.2: Morfologie oocyst druhů *Eimeria* vyskytujících se u skotu v Evropě (Dauguschies et Najdrowski, 2005).

Druhy	Velikost (µm)	Tvar
<i>E. alabamensis</i>	13–24 × 11–16	Vejščitý
<i>E. auburnensis</i>	32–46 × 20–25	Podlouhlý vejčitý
<i>E. bovis</i>	23–34 × 17–23	Vejščitý, asymetrický
<i>E. brasiliensis</i>	34–43 × 24–30	Elipsoidní
<i>E. bukidnonensis</i>	47–50 × 33–38	Hruškovitý tvar
<i>E. canadensis</i>	28–37 × 20–27	Vejščitý nebo elipsoidní
<i>E. cylindrica</i>	16–27 × 12–15	Podlouhlý elipsoidní
<i>E. ellipsoidalis</i>	20–26 × 13–17	Elipsoidní, mírně vejčitá
<i>E. illinoisensis</i>	24–29 × 19–22	Elipsoidní nebo vejčitý
<i>E. pellita</i>	36–41 × 26–30	Oválný
<i>E. subspherica</i>	9–14 × 8–13	Kulatý nebo subkulatý
<i>E. wyomingensis</i>	37–45 × 26–34	Vejščitý nebo hruškovitý
<i>E. zuernii</i>	15–22 × 13–18	Subkulatý

Životní cyklus rodu *Eimeria* (obrázek 1.3) je monoxenní s parazitickou (vnitřní) a environmentální (vnější) fází (Dauguschies et Najdrowski, 2005). Infekčním stádiem eimerií jsou sporozoiti, kteří se nacházejí ve vysporulovaných oocystách. Po požití

oocyst hostilem se vlivem trávicích enzymů a mechanického narušení ve střevech uvolní sporozoiti rozpuštěním Steidova tělíska. Sporozoiti infikují střevní buňky. Vznikne parazitoformní vakuola, ve které se vyvíjí trofozoit, který se stává merontem. Následuje první merogonie. Meront se dělí na řadu merozoitů, kteří opakují merogonii, nebo se po vniknutí do dalších buněk mění na makrogametocyt (jednojaderný) nebo mikrogametocyt (mnohojaderný). Poté mikrogamety oplodní makrogamety a vytvoří zygoty. Zygota se mění v oocystu. Oocysty se uvolní z prasklých epitelových buněk a jsou vylučovány trusem do prostředí. Oocysta vyloučená z hostitele je nesporulovaná a ve vnějším prostředí (anaerobní proces) dochází ke sporulaci (meióze). V oocystě vznikají čtyři sporocysty se dvěma sporozoity. Doba sporulace je rozdílná u různých druhů eimerií (López-Osorio et al., 2020; Volf et Horák, 2007).

Obrázek 1.3: Životní cyklus rodu *Eimeria*, upraveno podle Gardiner, 1988.



U živých organismů se diagnostika provádí nálezem oocyst v trusu. Při pitvě se hledají v postižené tkáni makroskopicky viditelné léze, hemorhagie nebo drobné krevní výrony. Následně se v tkáni hledají mikroskopicky vývojová stádia kokcií (Ryšavý, 1989).

1.9 Kokcidióza

Kokcidióza skotu způsobená *Eimeria* spp. zůstává významným zdravotním problémem v moderním chovu telat. Onemocnění ve většině případů ustane, jakmile skončí rozmnožování parazita ve střevě (ukončení vylučování oocyst) (Daugschies et Najdrowski, 2005). Ekonomické ztráty souvisejí se zhoršenou užitkovostí, zvýšenou úmrtností a náklady na léčbu (Enemark et al., 2013).

Prevalence infekce u skotu je vysoká a u telat může dosahovat až 100 %. Většina druhů eimerií skotu nevyvolává výrazné klinické příznaky, pouze dva druhy jsou zodpovědné za klinickou, život ohrožující kokcidiózu. Nejvíce patogenní jsou *E. zuernii* a *E. bovis*. Příležitostně však byly pozorovány průjmy u infekce způsobené *E. auburnensis* a *E. ellipsoidalis* (Daugschies et Najdrowski, 2005). Obzvláště náchylná ke klinické kokcidióze jsou telata ve věku tří týdnů až šesti měsíců (Daugschies et Najdrowski, 2005).

Infekce telat s velkým množstvím oocyst *E. zuernii* a *E. bovis* může vést k těžkým průjmům obsahujícím krev, fibrin a střevní tkáň. Tato telata trpí horečkou, bolestmi břicha, dehydratací, slabostí, anorexií, a nakonec mohou uhynout. Mortalita může dosahovat 7–20 % (Daugschies et Najdrowski, 2005; Lassen et al., 2009).

Patologické změny a klinické příznaky vytvářejí především pohlavní stadia, protože porušují sliznici jejunu, ilea a céka. Při infekci dochází k destrukci sliznice střev vedoucí k atrofii klků a destrukci mikrokloků (López-Osorio et al., 2020). Klinické příznaky jsou zřetelné většinou jen při první infekci, při další infekci dochází ke specifické imunitní odpovědi na přítomnost parazita (Enemark et al., 2013).

Za příznivých podmínek si oocysty udržují infekčnost po několik měsíců a mohou přežít i zimní období (Daugschies et Najdrowski, 2005). Oocysty jsou odolné vůči některým běžně používaným dezinfekčním prostředkům, ale jsou zlikvidovány vysokou teplotou (López-Osorio et al., 2020).

K léčbě kokcidiózy se používají přípravky s účinnou látkou sulfonamid, diclazuril nebo toltrazuril. Poslední dvě jmenované účinné látky jsou schváleny k metafylaxi (Weerda et al., 2021).

1.10 Nejpatogennější eimerie u skotu

Nejvíce patogenní jsou *E. zuernii*, *E. bovis* a *E. ellipsoidalis* (Lassen et al., 2009).

1.10.1 *Eimeria bovis*

Oocysty jsou vejčité s hladkou dvouvrstevnou stěnou. Síla stěny je okolo 2 μm , žlutohnědé barvy. Mikropyle je málo zřetelné a nachází se na zúženém konci oocysty. Sporulace při pokojové teplotě trvá 2–3 dny. Velikost gametocytů je 300–400 μm , lze je zaznamenat zrakem. Vývoj probíhá v tenkém, tlustém i slepém střevě. Prepatentní perioda je 18–19 dní (Černá, 1983).

1.10.2 *Eimeria ellipsoidalis*

Oocysty jsou oválné s hladkou, tenkou, bezbarvou stěnou. Mikropyle je nezřetelné. Sporulace trvá tři dny. Vývoj probíhá v epitelových buňkách tenkého střeva. Prepatentní perioda je 8–13 dní (Černá, 1983).

1.10.3 *Eimeria zuernii*

Oocysty jsou vejčité nebo subsférické. Stěna je bezbarvá 1 μm silná, bez mikropyle. Doba sporulace trvá 3–4 dny při pokojové teplotě. Vývojový cyklus obsahuje dvě merogonie a probíhá v tenkém, tlustém i slepém střevě (Černá, 1983). Prepatentní perioda *E. zuernii* se pohybuje kolem 16–17 dní (Mundt et al., 2005). Je považována za nejvíce patogenní druh u skotu (Černá, 1983).

2 Cíle

Cílem práce je posoudit vliv způsobu odchovu a technologie chovu telat na výskyt parazitárních onemocnění ve vybraných chovech dojného skotu.

Pomocí standardní parazitologické metody vyšetřit dvě skupiny telat ve stáří 0 až čtyři měsíce a pomocí molekulárních metod provést genotypizaci nalezených parazitů. Výsledky zpracovat příslušnými statistickými metodami a porovnat získaná data s publikovanými údaji.

3 Materiál a metodika

3.1 Materiál

Odběry probíhaly v Zemědělském družstvu Dolní Hořice. Na farmě Kloužovice a Pořín se odebíraly vzorky trusu od nově narozených jaloviček, celkem 20 kusů z každé farmy. Později byla telata převezena do teletníku umístěného na středisku v Chotčínách.

Převoz telat z farmy Pořín probíhal po odstavu a telata již byla na rostlinné výživě. Stáří telat se pohybovalo mezi 2,5 až 3 měsíci. V teletníku v Chotčínách byla umístěna do společného kotce.

Z farmy v Kloužovicích byla telata převážena ve stáří okolo 1 až 1,5 měsíce věku do teletníku v Chotčínách, kde byla krmena mléčnou krmnou směsí. V teletníku byla ustájena v individuálních boxech, které se již nenacházely venku, ale v budově. Po odstavu (2,5 až 3 měsíce stará telata) byla přesunuta do společných kotců, kde se nacházela telata pocházející z farmy v Poříně.

Vzorky trusu byly odebírány od narození do 112. dne stáří. Od každého telete bylo odebráno 17 vzorků, vždy po sedmi dnech. Do výzkumu byly vybrány pouze jalovičky. Vzorky byly získávány z rekta a uskladněny v chladničce. Celkem bylo odebráno a vyhodnoceno 680 vzorků. Odběry byly realizovány od 17. 2. do 1. 8. roku 2022.

3.1.1 Farma Pořín

Plemeno: Český strakatý skot

Zaměření: Chov dojeného skotu

Technologie odchovu telat: Narozená telata jsou do 12 hodin po narození přesunuta do venkovních individuálních boxů (VIB), které jsou stlané slámou. Měří se hodnota protilátek v mlezivu a na první napojení dostává tele kvalitní mlezivo. Dále je podáváno mlezivo získané od matky. Od pátého dne se přechází na mléčnou krmnou směs od firmy Forst Agro s.r.o. Odstav telat probíhá ve věku dvou měsíců a následně se přesouvají do společného výběhu umístěného vedle VIB. Velikost skupiny ve výběhu je 15 ks. Do skupiny jsou telata postupně přidávána podle toho, jak se odstavují. Pokud je kapacita výběhu naplněna, telata (2,5 až 3 měsíce stáří) jsou převezena do teletníku umístěného v Chotčínách.

Přistýlání VIB a výběhu je prováděno dle potřeby. Boxy se čistí pouze mechanicky, dezinfekce se neprovádí. Stav telat na farmě se pohybuje kolem 50 ks.

3.1.2 Farma Kloužovice

Plemeno: Holštýnský skot

Zaměření: Chov dojeného skotu

Technologie chovu: Telata jsou po narození ihned přesunuta do VIB. Mlezivo pro telata pochází od otelených krav, tele tedy nepřímá mlezivo pouze od matky a podává se první čtyři dny života. Od pátého dne se přechází na mléčnou krmnou směs od firmy VVS Verměřovice s.r.o. Kolem jednoho měsíce stáří jsou telata přesunuta do teletníku v Chotčínách.

Slámou je do VIB přistýláno každý den. Boudy se čistí pouze mechanicky, dezinfekce se též neprovádí. Na farmě se stav telat pohybuje okolo 35 ks.

3.1.3 Farma Chotčiny

Plemena: Holštýnský a Český strakatý skot

Zaměření: Odchov telat a mladého dobytka

Technologie chovu: Telata přivezená z farmy v Kloužovicích jsou ustájena v řadě individuálních boxů, které od sebe dělí plastová příčka. Jsou krmeny stejnou mléčnou krmnou směsí jako na původní farmě. Odstav telat je realizován ve věku cca 2,5 měsíce a následně jsou telata přesunuta do společných kotců. Zde se míchají zvířata z obou farem stejného věku. Přistýlání do individuálních boxů je realizováno jednou denně. Vývoz chlévské mrvy ze společných kotců se provádí 3× týdně. Mechanické čištění individuálních boxů se provádí vysokotlakým čističem.

Počet telat na farmě do čtyř měsíců věku je kolem 65 ks. Celkový počet chovaného dobytka je okolo 270 ks.

3.2 Metodika

3.2.1 Barvení anilin-karbol-methyl violetí dle Miláčka a Vítovce

Přítomnost kryptosporidií se zjišťovala pomocí barvení oocyst dle Miláčka a Vítovce (1985). Hodnocení intenzity infekce pro kryptosporidie bylo realizováno při barvicí metodě dle Miláčka a Vítovce (1985). V případě, že se na skle nacházelo do 10 oocyst, byla intenzita infekce hodnocena jako slabá (+), do 50 oocyst byla středně silná (++)

do 100 oocyst byla silná (+++) a nad 100 oocyst na skle byla intenzita infekce masivní (++++).

Roztok methylvioleti:

- 0,6 g methylviolet
- 1 ml anilin
- 1 g fenol
- 30 ml alkohol
- 70 ml dH₂O

Roztok tartrazinu:

- 1% roztok tartrazinu v 1 % kyselině octové

Postup:

- Špejlí rozetřeme malé množství trusu na podložní sklíčko a necháme uschnout.
- Vzorek zafixujeme methanolem v plameni.
- Barvíme roztokem methylvioleti po dobu 30 minut.
- Opláchneme vodou.
- Následně sklíčko se vzorkem diferencujeme 2 % kyselině sírové 1 minutu.
- Opláchneme vodou.
- Dobarvíme tartrazinem po dobu 5 minut.
- Opláchneme vodou.
- Osušíme a prohlédneme světelným mikroskopem s imerzním olejem při 1000× zvětšení.

3.2.2 Flotace

Přítomnost vývojových stadií parazitů byla detekována pomocí flotační metody. Hodnocení intenzity infekce pro *Eimeria* spp. bylo realizováno při flotační metodě. V případě, že se na skle nacházelo do 10 oocyst, byla intenzita infekce slabá (+), do 50 oocyst byla středně silná (++) , do 100 oocyst byla silná (+++) a nad 100 oocyst na skle byla intenzita infekce masivní (++++).

Sheaterův roztok:

- 259 ml dH₂O
- 405 g cukru

Postup:

- Trus s destilovanou vodou zhomogenizujeme ve třetí misce.
- Přefiltrujeme přes sítko do zkumavky, pro odstranění hrubých nečistot.
- Centrifugujeme 5 minut při 500 g.
- Slijeme supernatant.
- K sedimentu přidáme 1 ml Sheaterova roztoku a promícháme, dále zkumavku doplníme.
- Centrifugujeme 5 minut při 500 g.
- Kličkou přeneseme povrchovou blanku na podložní skličko a přikryjeme krycím skličkem.
- Prohlížíme světelným mikroskopem při zvětšení 400×.

3.2.3 Izolace gDNA

DNA byla extrahována ze vzorku pozitivního na oocysty kryptosporidií/kokcií pomocí komerčního kitu GeneAll® Exgene™ Stool DNA mini.

Postup:

- Přibližně 200 mg trusu dáme do Safe – Lock Tube společně se skleněnými a zirkonovými kuličkami a 1ml FL pufru.
- Zhomogenizujeme vortexováním a rozbijeme v homogenizátoru FastPrep-24 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
- Necháme inkubovat 5 minut, poté centrifugujeme 5 minut/14000 g.
- Přepipetujeme supernatant na EzPass kolonku.
- Centrifugujeme 1 minutu/14000 g, poté vylijeme odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetujeme 100 µl EB pufru a necháme 1 minutu inkubovat.
- Centrifugujeme 1 minutu/14000 g.
- Do sběrné zkumavky napipetujeme 500 µl PB pufru a obsah zkumavky přeneseme na mini spin column.
- Centrifugujeme 1 minutu/14000 g, poté vylijeme odpad ze sběrné zkumavky.

- Napipetujeme 500 μ l NW pufru.
- Centrifugujeme 1 minutu/14000 g, poté vylijeme odpad ze sběrné zkumavky.
- Přeneseme kolonku na novou eppendorfku a připipetujeme 200 μ l EB pufru.
- Necháme inkubovat 1 minutu, poté centrifugujeme 1 minutu/14000 g.
- Získanou DNA skladujeme v mrazničce při -20 °C.

3.2.4 Polymerázová řetězová reakce

Molekulární metodou nested PCR ampflifikující gen kódující malou podjednotku rRNA (SSU rRNA) a 60 kDa glykoprotein (*gp60*) byly určeny genotypy kryptosporidií (Jiang et al., 2005; Xiao et al., 1999; Yang et al., 2020). Pro genotypizaci *Eimeria* spp. byla provedena nested PCR amplifikující část genu kódujícího ITS (Ekawasti et al., 2022).

PCR reakce byla provedena v celkovém objemu 50 μ l. Složení reakční směsi pro primární i sekundární PCR reakci je uvedeno v tabulce 3.1. Amplifikační programy pro termocycler pro jednotlivé PCR reakce jsou uvedeny v tabulce 3.2.

Tabulka 3.1: Rozpis přípravy master-mixu pro PCR analýzy.

Chemie	Koncentrace	Primární reakce (μ l)	Sekundární reakce (μ l)
H ₂ O	-	36,75	36,75
MgCl ₂	25 mM	5	5
Pufr	1 \times	2	2
dNTP	200 nM	2	2
BSA	10 mg/ml	1	1
Tag	1,25 U	0,25	0,25
Primer forward	200 nM	0,5	0,5
Primer reverse	200 nM	0,5	0,5
gDNA	-	2	0
Produkt primární reakce		0	2
Celkový objem		50	50

Tabulka 3.2: Nastavení amplifikačních program pro jednotlivé PCR reakce.

Fáze amplifikace	Počet cyklů	Čas (s)	<i>Cryptosporidium</i> spp.				<i>Eimeria</i> spp.			
			SSU		<i>gp60 C. parvum</i>		<i>gp60 C. ryanae</i>		ITS	
			primární	sekundární	primární	sekundární	primární	sekundární	primární	sekundární
Teplota (°C)										
denaturace	1	600								
denaturace		45								
annealing	35	45	50	55	50	50	55	55	55	55
elongace		60								
elongace	1	420								
schlazení	1	∞								

Použité chemikálie:

- TAQ POLYMERÁZA – Dream Taq (5 U/1 ul), polymeráza Thermo Fisher Scientific (LOT 00899431)
- BSA – bovinní sérový albumin, lyofilizovaný prášek, vhodný pro (pro molekulární biologii), neacetylovaný, Merck (B6917-100)
- PUFER – 10× Dream taq green buffer 20 mM mgCL, Thermo Fisher Scientific (LOT 00900550)
- MgCl₂ – 25 mM MgCl₂, Thermo Fisher Scientific (LOT 01156552)
- dNTP – 10mM pracovní roztok, dNTP Set, pro molekulární biologii
- PCR H₂O – Top-Bio s.r.o.
- PRIMERY – pracovní roztok 10 μM, Generi Biotech

Seznam použitých primerů je uveden v tabulkách 3.3, 3.4, 3.5 a 3.6.

Tabulka 3.3: Primery pro amplifikaci genu kódujícího SSU rodu *Cryptosporidium*.

Primer	Název primeru	Sekvence (5'–3')
F1	SSU-F1	ATA GTC TCC GCT CTA TTC
R1	SSU-R1	GGA AGG AAC GAT GTA TCT
F2	SSU-F2	TCC GCT GTA TTC TCA GCC
R2	SSU-R2	GCA GAG GAA CCA GCA TC

Tabulka 3.4: Primery pro amplifikaci genu kódujícího *gp60* druhu *Cryptosporidium parvum*.

Primer	Název primeru	Sekvence (5'–3')
F1	gp60-F1	ATA GTC TCC GCT CTA TTC
R1	gp60-R1	GGA AGG AAC GAT GTA TCT
F2	gp60-F2	TCC GCT GTA TTC TCA GCC
R2	gp60-R2	GCA GAG GAA CCA GCA TC

Tabulka 3.5: Sety primerů pro amplifikaci genu kódujícího *gp60* druhu *Cryptosporidium ryanae*.

Primer set	Název primeru	Sekvence (5'–3')
F1F2	Ry- <i>gp60</i> -F1	GCT CGA GTT CTG AGT CGA
	Ry- <i>gp60</i> -R1	ATA CCG TTA AAA TGA AGG CCA A
	Ry- <i>gp60</i> -F2	CCT CAG ATA ATG AGC AGT CTA
	Ry- <i>gp60</i> -R2	GAT GGG ATA ACA TAT CTA TAA CCA AA
F3F4	Ry- <i>gp60</i> -F3	TCT ACC GTT CAG ACT GAA GCT
	Ry- <i>gp60</i> -R1	ATA CCG TTA AAA TGA AGG CCA A
	Ry- <i>gp60</i> -F4	AGT TCT GAT TCA AGT AAC GGT GA
	Ry- <i>gp60</i> -R2	GAT GGG ATA ACA TAT CTA TAA CCA AA
F3F2	Ry- <i>gp60</i> -F3	TCT ACC GTT CAG ACT GAA GCT
	Ry- <i>gp60</i> -R1	ATA CCG TTA AAA TGA AGG CCA A
	Ry- <i>gp60</i> -F2	CCT CAG ATA ATG AGC AGT CTA
	Ry- <i>gp60</i> -R2	GAT GGG ATA ACA TAT CTA TAA CCA AA
F5F6	Ry- <i>gp60</i> -F5	GTC GAC CTC AGG TAA TGA GCA
	Ry- <i>gp60</i> -R1	ATA CCG TTA AAA TGA AGG CCA A
	Ry- <i>gp60</i> -F6	GTC TAG TTC TTC TGA TCA AGT TG
	Ry- <i>gp60</i> -R2	GAT GGG ATA ACA TAT CTA TAA CCA AA

Tabulka 3.6: Sety primerů pro amplifikaci genu kódujícího ITS rodu *Eimeria*.

Druhy	Primery	Sekvence (5'–3')	Velikost produktu (bp)
<i>Eimeria</i> spp.	E1	CTGCAATTCACAATGCGTATCGC	348–546
	E2	GCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCG	
<i>Eimeria bovis</i>	E3	ATAATTGCGATAAGGGAGACA	238
	E4	TCATAAAACATCACCTCCA	
<i>Eimeria zuernii</i>	E5	CGATAAGGAGGAGGACAAC	344
	E6	AACATGTTTCTACCCACTAC	
<i>Eimeria alabamensis</i> *	E7	GCTTCCAAACTAATGTTCTG	184
	E8	CATTCACACATTGTTCTTTCAG	
<i>Eimeria auburnensis</i>	E9	GCAATGAGAGAAAGATTTAATA	295
	E10	TAAATTGGTGCGATGAGGGA	
<i>Eimeria cylindrica</i>	E11	GGCTGCAATAAGATAGACATA	304
	E12	GACATTTAAAAAACCGATTGGT	
<i>Eimeria ellipsoidalis</i>	E13	ACTGCGATGAGAGAGAGCG	148
	E14	CAACGTTTTTCCTTTTCCTATCA	

* primery kódují DNA druhu *Eimeria alabamensis* a také druhu *Eimeria subshérica*

3.2.5 Elektroforéza na agarozovém gelu

Chemikálie:

- TAE pufr
- Agaróza
- Ethidium-bromid
- 100 pb DNA Ladder

Postup:

- Agarozu s TAE pufrém smícháme v erlenmeyerově baňce a vložíme do mikrovlnné trouby.
- Rozehřátý roztok schladíme pod tekoucí vodou.
- Připipetujeme 1 µl ethidium bromidu a promícháme.
- Obsah baňky vylejeme do připravené formy s hřebenem.
- Necháme gel tuhnout přibližně 5–10 minut.
- Gel vložíme do elektroforetické vany naplněnou TAE pufrém.
- Do startů napipetujeme ladder a vzorky.
- Vyvíjíme asi 1 hodinu při napětí 70 V.
- Vizualizaci provedeme na UV transiluminátoru.

3.2.6 Extrakce z gelu

Extrakce byla realizována pomocí komerčního kitu Gen Elute.

Postup:

- Z gelu vyřízneme fragment s DNA a vložíme do eppendorfky.
- Připipetujeme 500 μ l Gel Solubilization Solution a necháme inkubovat 10 minut při 50 °C (do rozpuštění gelu).
- Sestavíme si Binding Column G a napipetujeme 500 μ l Column Preparation Solution a centrifugujeme 1 minutu/14000 g.
- K vzorku připipetujeme 150 μ l isopropanolu a promícháme.
- Veškerý obsah vzorku přepipetujeme na Binding Column G a centrifugujeme 1 minutu/14000 g.
- Vylijeme obsah ze sběrné zkumavky.
- Připipetujeme 700 μ l Wash Solution G a centrifugujeme 1 minutu/14000 g.
- Vylijeme obsah ze sběrné zkumavky a dáme znovu centrifugovat na 1 minutu/14000 g.
- Otočíme zkumavku v centrifuze o 180° a centrifugujeme 3 minuty/14000 g.
- Binding Column G přendáme do nové eppendorfky a provedeme eluci napipetováním 30 μ l PCR vody přehřáté na 65 °C.
- Necháme inkubovat 1 minutu a poté centrifugujeme 1 minutu/14000 g.

3.2.7 Sekvence vzorků

DNA extrahována z gelu byla zaslána do firmy SEQme s.r.o. Výsledné sekvence byly porovnány se sekvencemi v GenBank. Po zpracování sekvencí byly použity programy Chromas Pro a BioEdit.

3.2.8 Statistická analýza

Statistické rozdíly mezi sledovanými faktory byly vypočteny v programu Epi Info (TM) 7.1.5.2. (for Disease Control and Prevention, USA). Pro stanovení významnosti byl použit chí-kvadrát test rozdílů spojitých proměnných. Pro určení rizikovosti jednotlivých faktorů bylo vypočteno odds ratio (OR).

4 Výsledky

4.1 Technologie chovu

V tabulce 4.1 je uvedeno porovnání technologie chovu a odchovu telat ve sledovaných chovech.

Tabulka 4.1: Porovnání technologie chovu a odchovu telat ve sledovaných chovech.

Technologie	Kloužovice	Pořín	Chotčiny
Porod	Ve skupině 30 krav.	Ve skupině 6-8 krav.	-
Měření IgG v mlezivu	Neprovádí se.	ANO	-
První napojení mleziva	Do 2 hodin.	Do 2 hodin.	-
Přemístění do VIB	Ihned po narození.	Po 12 hodinách.	-
Umístění VIB	Telata se umísťují chronologicky do VIB. Umožněn kontakt mezi zvířaty.	Telata se umísťují náhodně do volných VIB. Umožněn kontakt mezi zvířaty.	Individuální ustájení je rozděleno pouze příčkou.
Dezinfekce VIB	Neprovádí se.	Neprovádí se.	Neprovádí se.
Krmení mléčnou krmnou náhražkou	VVS	ForstAgro	VVS
Mytí kýblů	Vždy po napojení, důkladně horkou vodou a dezinfekcí.	Vypláchnutí horkou vodou.	Vypláchnutí horkou vodou.
Odstav	Telata před odstavem přesunuta na farmu Chotčiny.	2 měsíce stáří. Snižování množství MKN.	2,5 měsíce stáří. Ředění MKN.
Přistýlání slámou ve VIB	Každý den	Podle posouzení ošetřovatelů.	Každý den
Manipulace se zvířaty ve skupinovém ustájení	Telata před odstavem přesunuta na farmu Chotčiny.	Mezi zvířata se chodí každý den.	Mezi zvířata se chodí 3× týdně.

4.2 Mikroskopické vyšetření

Celkem bylo vyšetřeno 680 vzorků trusu od 40 zvířat ze dvou chovů s odlišnou technologií a managementem odchovu. Mikroskopické vyšetření prokázalo přítomnost oocyst *Cryptosporidium* spp. a *Eimeria* spp. u 35 ze 40, respektive 40 ze 40 zvířat v obou chovech. Kombinací flotačních a barvicích metod byly oocysty kryptosporidií detekovány u 17 telat ve 27 vzorcích v Kloužovicích a u 18 telat ve 25 vzorcích v Poříně, což odpovídalo jednomu až třem pozitivním vzorkům na jedno tele. Oocysty eimerií byl detekovány pomocí flotačních metod a mikroskopické vyšetření prokázalo přítomnost těchto parazitů u všech vyšetřovaných telat. Nicméně u telat

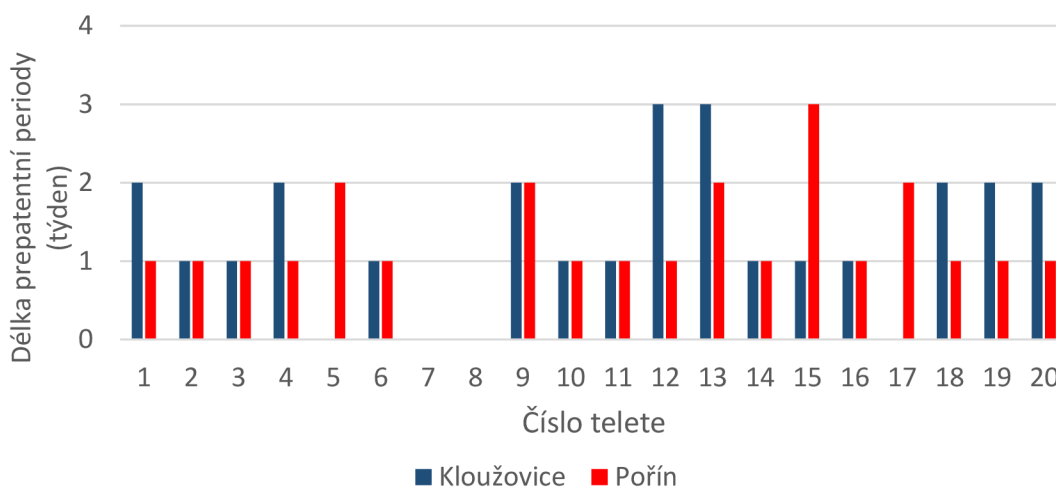
z Kloužovic byly kokcidie detekovány pouze v 50 vzorcích trusu, zatímco u telat z Pořina byli tito paraziti nalezeni ve 115 vzorcích. Počet pozitivních vzorků na tele se pohybovalo od 1 do 9.

4.3 Délka infekce

Délka patentní periody *C. parvum* se pohybovala od jednoho do tří týdnů (graf 4.1). Na základě zjištěných výsledků můžeme konstatovat, že telata chovaná na farmě Kloužovice měla průměrně delší patentní periodu než telata na farmě v Poříně ($p < 0,05$). Telata z farmy Kloužovice, u kterých byla patentní perioda delší než jeden týden, vylučovala oocysty *C. parvum* v průměru o ½ týdne déle než obdobná skupina telat na farmě v Poříně ($p < 0,05$; graf 4.1).

Na farmě v Kloužovicích byla zjištěna kumulativní prevalence *C. parvum* 80 % a na farmě v Poříně 90 %. Statistická analýza neprokázala rozdíl v promořenosti telat na obou sledovaných farmách ($\chi^2=0,78$; d.f.=1; $p > 0,05$).

Graf 4.1: Délka patentní periody infekce způsobené *Cryptosporidium parvum* u telat na sledovaných farmách.



4.4 Genotypizace kryptosporidií

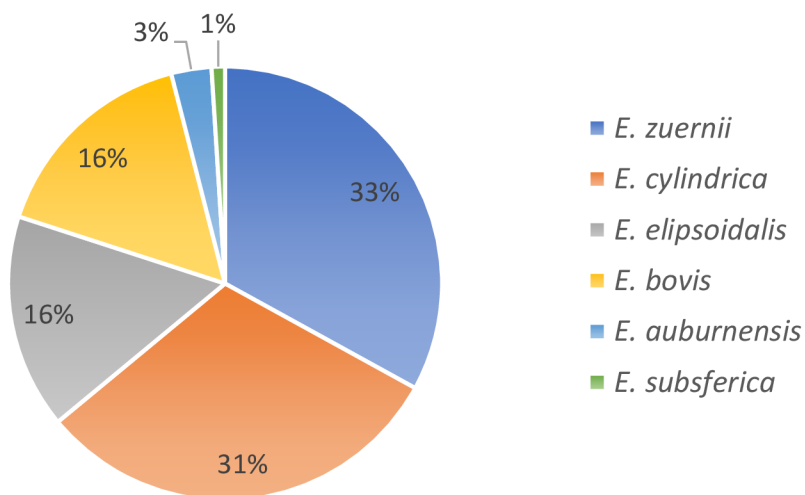
Všechny vzorky pozitivní na přítomnost kryptosporidií byly molekulárně genotypizovány. Analýza sekvencí kódujících malou podjednotku rRNA s následnými analýzami prokázala přítomnost dvou druhů kryptosporidií, a to *C. parvum* a *C. ryanae*. Subtypizace na genu kódujícím 60 kDa glykoprotein prokázala v rámci druhu

C. parvum přítomnost dvou alelických subtypových rodin a jedné rodiny v rámci *C. ryanae*. Všechna telata na farmě Kloužovice byla infikována výhradně druhem *C. parvum* subtypem IIaA13G1R1, zatímco u telat na farmě v Poříně byl detekován subtyp IIaA17G1R1. Na farmě Chotčiny, kam byla přemístěna telata z obou předchozích farem byla u dvou zvířat ve stáří 9 a 11 týdnů detekována přítomnost druhu *C. ryanae* subtypu XXIc. Zvířata pozitivní na *C. ryanae* pocházela každé po jednom z farmy Pořín, respektive Kloužovice. Nicméně infekce se vyskytla až po spojení všech zvířat na farmě Chotčiny.

4.5 Genotypizace eimerií

Obdobně jako v případě kryptosporidií, všechny vzorky mikroskopicky pozitivní na oocysty *Eimeria* spp. byly genotypovány. Sekvenačními analýzami a druhově specifickými PCR byla prokázána přítomnost šesti druhů kokcií rodu *Eimeria*. Nejčastěji byla detekována *E. zuernii* (33 %), dále pak *E. cylindrica* (31 %), *E. elipsoidal*s (16 %), *E. bovis* (16 %), *E. auburnensis* (3 %) a *E. subsferica* (1 %; graf 4.2).

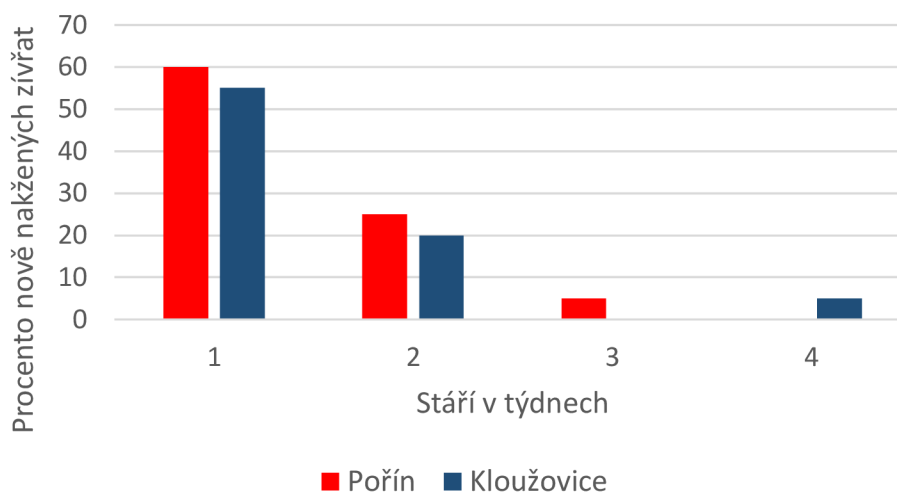
Graf 4.2: Druhové složení *Eimeria* spp. vyskytujících se u sledovaných telat.



4.6 Vliv věku na přítomnost *Cryptosporidium parvum*

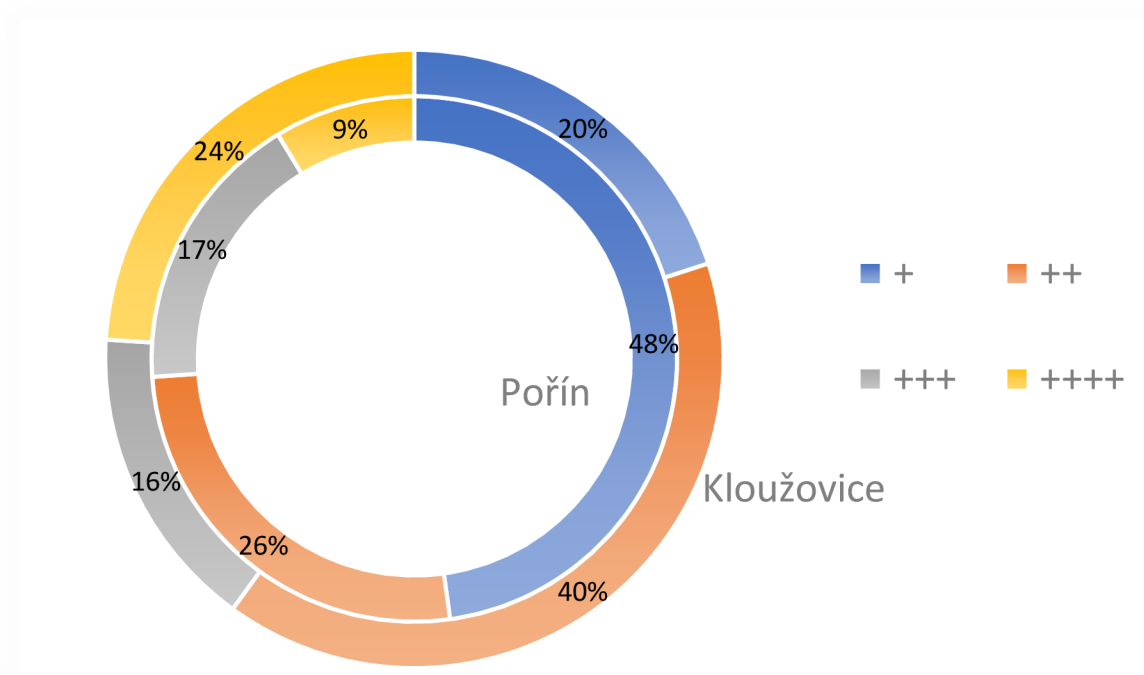
Oocysty kryptosporidií byly na obou sledovaných farmách poprvé zaznamenány u telat ve věku jednoho týdne. Nejčastěji byla infekce *C. parvum* zjištěna u zvířat ve stáří jednoho týdne, a to v Kloužovicích u 55 % zvířat a v Poříně u 60 % zvířat. Rozdíl mezi farmami nebyl statisticky významný ($\chi^2=0,102$; d.f.=1; $p>0,05$). Taktéž přírůstek nově nakažených telat v dalších týdnech se mezi farmami výrazně nelišil (graf 4.3).

Graf 4.3: Věk telat při prvním výskytu infekce *Cryptosporidium parvum* na sledovaných farmách.



Byly zjištěny významné rozdíly v intenzitě infekce způsobené druhem *C. parvum* v jednotlivých chovech (graf 4.4). Téměř polovina zvířat chovaných na farmě v Poříně měla kryptosporidiovou infekci se slabou infekcí s ojedinělým výskytem oocyst kryptosporidií ve vyšetřovaném vzorku, zatímco stejná intenzita infekce byla zjištěna jen u 20 % telat v Kloužovicích. Také byl výrazný rozdíl v podílu masivních (++++) a silných (++++) intenzitách infekce. Zatímco v Poříně tvořily tyto infekce 26 % všech detekovaných infekcí, v Kloužovicích byl tento podíl 40 % (graf 4.4). Rozdíl mezi chovy byl statisticky významný ($\chi^2=17,47$; d.f.=1; $p<0,001$). U obou zvířat pozitivních na přítomnost *C. ryanae* byla zaznamenán slabá intenzita infekce.

Graf 4.4: Intenzita infekce *Cryptosporidium parvum* ve sledovaných chovech. Slabá infekce (+), středně silná infekce (++) , silná infekce (+++) a masivní infekce (++++).



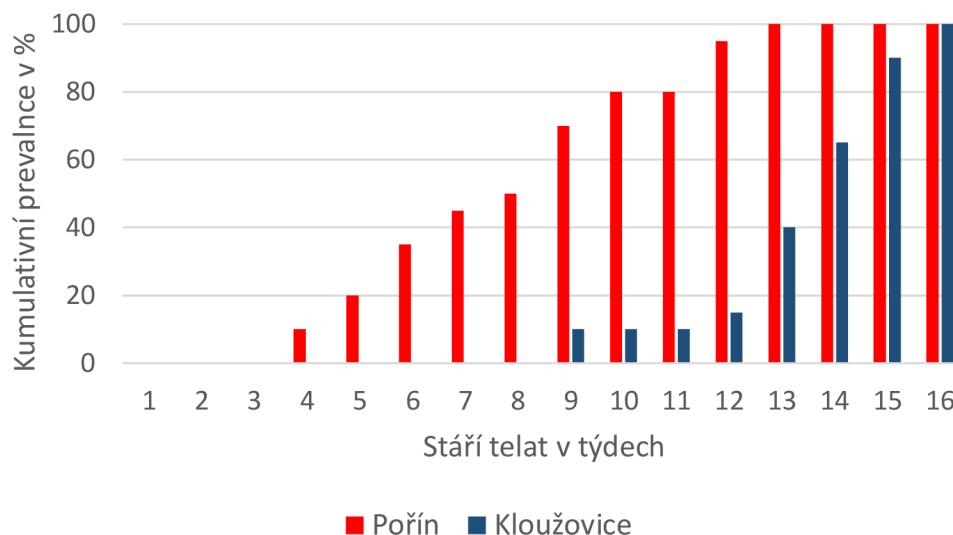
4.7 Vliv věku na přítomnost *Eimeria* spp.

Oocysty eimerií byly poprvé zjištěny u dvou telat ve stáří čtyř týdnů v Poříně (graf 4.5). U telat umístěných na farmě Kloužovice nebyl až do jejich odstavu a následného převedení na farmu v Chotčínách zaznamenán žádný pozitivní vzorek na přítomnost oocyst eimerií. U zvířat z farmy v Poříně byl zaznamenán postupný vzestupný trend v procentu nakažených zvířat od čtvrtého týdne stáří telat. Stoprocentní promořenost sledované skupiny byla zjištěna 13. týden stáří telat. U telat z farmy Kloužovice byla první mikroskopicky detekovatelná infekce *Eimeria* spp. pozorována u zvířat ve stáří devíti týdnů, tedy 4–5 týdnů po přemístění z farmy Kloužovice na farmu Chotčiny. U těchto telat byl pozorován obdobný trend.

Statistická analýza prokázala, že telata pocházející z Kloužovic byla méně často infikována eimeriemi než telata z Pořína ($\chi^2 = 33,81$; d.f.=1; $p < 0,05$). Z výsledků vyplývá, že na farmě Pořín jsou telata infikována eimeriemi krátce po narození a dochází k šíření infekce v chovu. Naopak u telat v Kloužovicích nedochází k rozvoji eimeriových infekcí a zvířata se nakazila až po umístění do společného odchovu na farmě v Chotčínách (graf 4.5).

U telat pocházejících z obou farem byla v 16. týdnu stáří zjištěna 100% kumulativní prevalence (graf 4.5).

Graf 4.5: Kumulativní prevalence *Eimeria* spp. ve sledovaném období na sledovaných farmách.



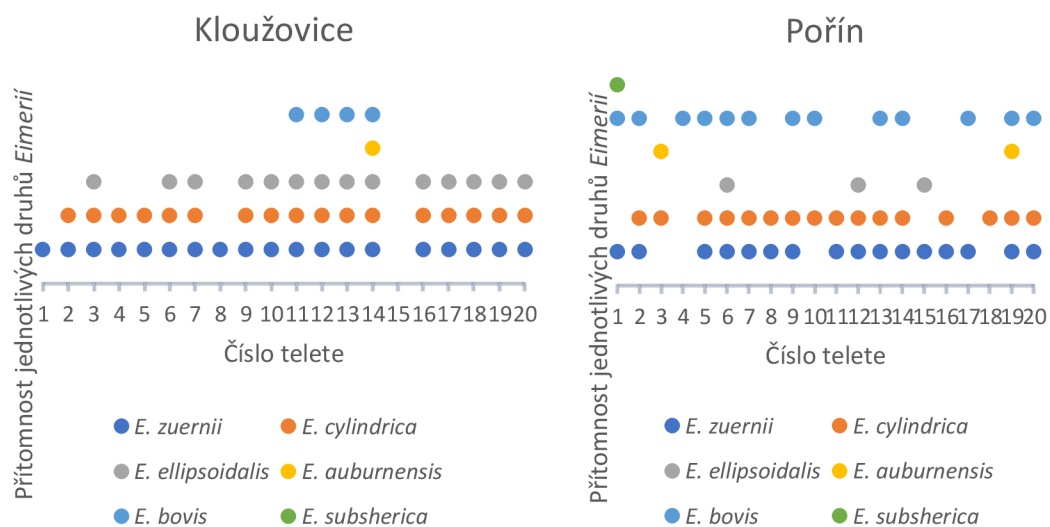
Podíl jednotlivých druhů eimerií u telat pocházejících ze sledovaných farem se částečně lišil. Výsledky analýz ukázaly, že *E. zuernii* a *E. cylindrica* byly na obou farmách dominantními druhy (tabulka 4.2). Zatímco telata z Kloužovic byla v 70 % infikována druhem *E. elipsoidalis*, u telat z Pořína byla tato eimerie detekována pouze v 15 % vzorků. V případě *E. bovis* byl podíl na eimeriových infekcích opačný. Častější výskyt této eimerie byl detekován u zvířat z chovu Pořín oproti zvířatům z Kloužovic (tabulka 4.2).

Tabulka 4.2: Podíl jednotlivých druhů rodu *Eimeria* na infekcích telat pocházejících z farmy Pořín a Kloužovice.

<i>Eimeria</i> spp.	Pořín	Kloužovice
<i>E. zuernii</i>	80 %	95 %
<i>E. cylindrica</i>	80 %	90 %
<i>E. elipsoidalis</i>	15 %	70 %
<i>E. bovis</i>	65 %	20 %
<i>E. auburnensis</i>	10 %	5 %
<i>E. subsferica</i>	5 %	0 %

Pouze u třech zvířat byly zjištěny eimeriové monoinfekce způsobené *E. zuernii*, nebo *E. cylindrica*. V ostatních případech byly detekovány smíšené infekce, kdy nejčastější kombinací byla koinfekce *E. zuernii*, *E. cylindrica* a *E. ellipsoidalis* u telat z Kloužovic a *E. zuernii*, *E. cylindrica* a *E. bovis* u telat z Pořina (graf 4.6).

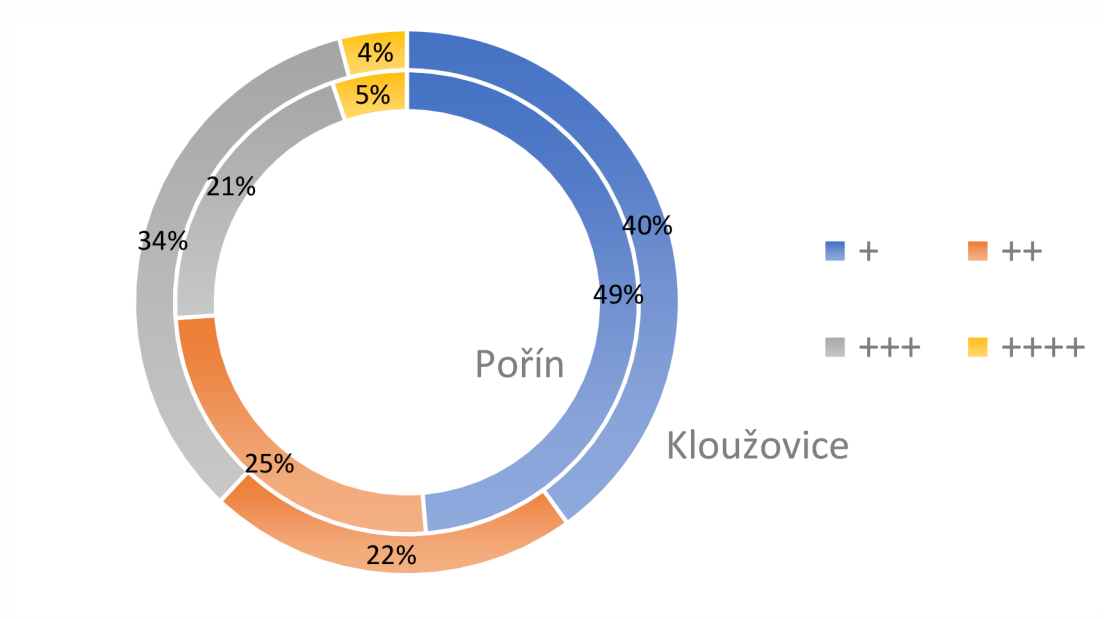
Graf 4.6: Druhové zastoupení druhů rodu *Eimeria* ve smíšených infekcích u telat ze sledovaných farem.



Výsledky molekulární analýzy ukázaly, že zvířata pocházející z farmy v Pořině byla infikována všemi druhy eimerií již před převedením na farmu Chotčiny.

V grafu 4.7 je uveden podíl jednotlivých intenzit infekce eimeriových infekcí u telat ze sledovaných chovů. Podíl slabých (+) a středně silných (++) infekcí byl 62 a 74 % u telat z Kloužovic, respektive z Pořina ($\chi^2 = 3,309$; d.f.=1; $p > 0,05$). Nebyl zjištěn rozdíl v podílu masivních infekcí (++++) u telat z Pořina a Kloužovic ($\chi^2 = 0,116$; d.f.=1; $p > 0,05$; graf 4.7).

Graf 4.7: Intenzita infekce *Eimeria* spp. ve sledovaných chovech. Slabá infekce (+), středně silná infekce (++), silná infekce (+++) a masivní infekce (++++).



4.8 Vliv sledovaných parazitů na výskyt průjmových onemocnění

U sledovaných telat se vyskytovaly průjmy v 69 případech odebraných vzorků. Průjmová onemocnění u telat pocházejících z farmy v Kloužovicích byla přítomna po celou sledovanou dobu. Od prvního týdne stáří až do 16. týdne stáří telat se průjmy vyskytovaly u 5–15 % sledovaných zvířat (graf 4.8). Výskyt průjmových onemocnění není shodný s nástupem parazitárních infekcí (graf 4.8) a jejich příčina bude jiného původu.

V případě farmy Pořín se průjmové onemocnění vyskytovalo u 35 % zvířat starých jeden týden (graf 4.9). Průjmy se znovu objevily v 5–7 týdnech stáří a měly rostoucí trend až do 12. týdne stáří telat, kde se opět dosáhlo hranice 35 % zvířat. Poté četnost průjmů klesala (graf 4.9). Výskyt průjmových onemocnění je shodný s nástupem infekce, první týden s přítomností *C. parvum* a od pátého týdne kopíruje nástup infekcí *Eimeria* spp. (graf 4.9). Průjmová onemocnění na farmě Pořín jsou spojena s parazitární infekcí eimerií.

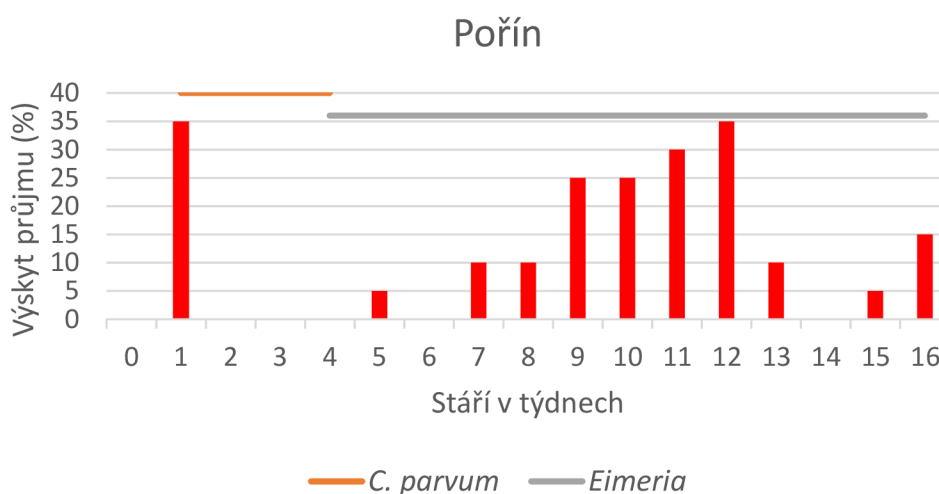
Statisticky významný je ve výskytu průjmů u telat starých jeden a 12 týdnů ($\chi^2 = 10,666$; d.f.=1; $p < 0,05$). Pokud vezmeme v úvahu celkový počet zvířat trpících

průjmovým onemocněním, výsledek není statisticky významný ($\chi^2 = 0,458$; d.f.=1; $p > 0,05$).

Graf 4.8: Procento průjmových zvířat ve sledovaném období na farmě Kloužovice.



Graf 4.9: Procento průjmových zvířat ve sledovaném období na farmě Pořín.



Ve dvou případech přítomnosti *C. ryanae* trpělo průjmem pouze jedno tele pocházející z farmy Pořín. Jen jeden průjmový vzorek s příměsí krve pocházel od telete v Kloužovicích, které bylo jeden týden staré a byla u něj potvrzena masivní infekce *C. parvum*. U zvířat pocházejících z Kloužovic, které se nakazily eimeriemi až ve společném teletníku v Chotčínách, nebyly detekovány žádné krvavé průjmy,

zatímco u telat z Pořina byl zaznamenán výskyt dvou případů krvavých průjmů (obrázek 4.1). Telata byla stará 10 a 11 týdnů a byla u nich detekována infekce *E. bovis*, *E. bovis* a *E. cylindrica*.

Obrázek 4.1: Vzorek trusu odebraný při klinické kokcidióze od telete starého 11 týdnů (vlastní obrázek).



Byl detekován statisticky významný rozdíl ve výskytu průjmů u telat ve stáří 8–12 týdnů. Zatímco u telat z Kloužovic se procento průjmujících telat pohybovalo od 5–15 % a nebyl zjištěn žádný významný trend, u zvířat v Pořině byl zaznamenán výrazný vzestup počtu průjmujících telat z 10 % na 35 % ($\chi^2=10,5882$; d.f.=1; $p<0,001$). Byla vypočtena míra relativního rizika výskytu eimeriových infekcí v chovu Pořin u telat ve věku 8–12 týdnů (OR = 1,6452).

5 Diskuse

Kryptosporidiové a eimeriové infekce patří mezi nejčastější příčiny parazitárních onemocnění mléčných telat po celém světě (Lassen et al., 2009; Santín et al., 2004; Sawitri et al., 2020; Thompson et al., 2003). Skot je přirozeně vnímavý k infekci čtyř druhů kryptosporidií, *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* a *C. andersoni* (Deksne et al., 2022; Kváč et al., 2011; Wang et al., 2017; Yang et al., 2020). Výskyt jednotlivých druhů kryptosporidií ve stádě je ovlivněn věkem zvířat a technologií chovu (Åberg et al., 2020; Deksne et al., 2022; Lee et al., 2021). Druh *C. parvum* se vyskytuje převážně u telat do tří měsíců věku, což je v souladu s výsledky zjištěnými v této práci (Fayer et al., 2008; Santín et al., 2004; Thompson et al., 2003; Wu et al., 2020). Ostatní druhy kryptosporidií jsou u telat, respektive u mladého skotu detekovány až v pozdějším období (Åberg et al., 2020; Kváč et al. 2006; Mohammed et al., 1999; Santín et al., 2008; Trotz-Williams et al., 2007). V našem sledování jsme detekovali přítomnost *C. ryanae* ve stáří 9–11 týdnů věku, což odpovídá dříve publikovaným údajům (Åberg et al., 2019).

Výskyt kryptosporidií v chovech skotu je ovlivněn řadou faktorů, zejména krmením mlezivem a mléčnou krmnou náhražkou, frekvencí podestýlání, výměnou podestýlky po odstavu nebo použitím dezinfekčních prostředků (Åberg et al., 2020; Kváč et al. 2006; Mohammed et al., 1999; Santín et al., 2008; Trotz-Williams et al., 2007). Dalším faktorem je frekvence telení (Kváč et al., 2006). Zatímco v chovech krav bez tržní produkce mléka, kde je telení soustředěno do několika měsíců v roce, je výskyt *C. parvum* u telat relativně nízký a parazit se v chovech vyskytuje ojediněle, u telat dojených plemen, kdy je telení rozloženo do celého roku, je výskyt *C. parvum* velmi častý (Kváč et al., 2006). Na námi sledovaných farmách jsme detekovali výskyt *C. parvum* u zvířat již od sedmého dne po narození, což není neobvyklé a odpovídá to dříve uváděným výsledkům (de Graaf et al., 1999; Hoque et al., 2022). Detekce infekce *C. parvum* u sedmidenních zvířat ukazuje na skutečnost, že zvířata musela být infikována do tří dnů po otelení, protože vývojový cyklus *C. parvum* trvá u telat okolo 4–5 dnů (de Graaf et al., 1999, Fayer et Xiao, 2007). Takto rychlý nástup infekce ukazuje na přežívání oocyst *C. parvum* ve vnějším prostředí farmy a na nedostatečnou hygienu prostředí. Oocysty *C. parvum* jsou velmi odolné vůči nepříznivým podmínkám prostředí a odolávají běžným dezinfekčním prostředkům (Barbee et al., 1999; King et Monis, 2007; Murphy et Arrowood, 2020). Na základě šetření

provedeném na obou farmách bylo zjištěno, že nejsou používány žádné dezinfekční postupy, které by cílily na devitalizaci oocyst kryptosporidií. Nepoužívání dezinfekce 350× zvyšuje pravděpodobnost infekce telat (Mohammed et al., 1999). Dalším možným zdrojem infekce telat je horizontální přenos infekce z matky na tele. Sturdee et al. (2003) uvádějí, že přibližně 3,5 % dospělých zvířat může být infikováno *C. parvum* a představovat tak zdroj infekce pro narozená mláďata. K obdobným závěrům dospěly i další studie (Lee et al., 2021; Santín et al., 2008). Nicméně statistická analýza neprokázala rozdíl ve stáří nástupu infekce mezi chovem, kde byla telata přemístěna do VIB ihned po porodu a chovem, kde telata strávila s matkou cca 12 hodin.

V několika studiích byl prokázán vliv hyperimunního kolostra na mírnější průběh kryptosporidiózy (Graczyk et al., 1998; Graczyk et al., 2000; Hoskins et al., 1991). Výsledky našich vyšetření ukázaly, že v chovu Pořín, kde byla telata napájena mlezivem s odpovídající koncentrací imunoglobulinů (22°Bx a více) měla statisticky významně nižší procento silných a masivních infekcí než v Kloužovicích, kde takováto úprava nebyla prováděna. Naopak studie provedená Derbakova et al. (2020), vliv zvýšeného množství IgG protilátek v mlezivu na procento infikovaných zvířat druhem *C. parvum* nepotvrdila. Rozdíly mezi výše uvedenými studiemi spočívá v přítomnosti specifických protilátek proti kryptosporidiím, které byly přítomny v mlezivu po imunizaci krav antigenem *C. parvum* (Fayer et al., 1991; Perryman et al., 1999). Další rozdíly v technologii a způsobu odchovu telat na obou sledovaných farmách byly vyhodnoceny jako neprůkazné s přímým vlivem na výskyt kryptosporidiových infekcí způsobených *C. parvum*.

Celková kumulativní prevalence *C. parvum* v obou sledovaných chovech přesáhla hodnotu 85 %. Obdobné výsledky byly zjištěny i v dalších studiích po celém světě (Ruest et al., 1998; Santín et al., 2008; Xiao et Herd, 1994). Zjištěné výsledky jsou v souladu s vysokou prevalencí dosahující 80–100 % zjištěnou v různých chovech mléčných telat po celém světě (Trotz-Williams et al., 2007; O’Handley et al., 1999). Naopak Lee et al., 2021 a další uvádějí prevalenci infekce *C. parvum* u telat v rozmezí 15–60 % (Olson et al., 1997a,b; Trotz-Williams et al., 2005; Wu et al., 2020). Rozdíly mezi studiemi mohou být způsobeny celou řadou faktorů. Pokud pomíneme faktory metodické – způsob detekce kryptosporidií v trusu telat (Shah et Ramasamy, 2022), tak rozdíly budou způsobeny právě odlišnými technologiemi a způsobem chovu.

Genotypizace *C. parvum* na úrovni subtypů prokázala přítomnost dvou odlišných subtypů alelické rodiny IIa genu kódujícího 60 kDa glykoprotein. Telata

v Kloužovicích byla infikována výhradně subtypem IIaA13G1R1, zatímco v Poříně byl detekován subtyp IIaA17G1R1. Rozšíření subtypu IIaA13G1R1 je celosvětově poměrně ojedinělé. Podle dosavadních molekulárně-epidemiologických studií byl tento subtyp detekován pouze u telat ve Španělsku (Díaz et al., 2010). Také subtyp IIaA17G1R1 není příliš rozšířen a dosud byl detekován po jedné studii ve Slovinsku (Soba et Logar, 2008) a v Maďarsku (Plutzer et Karanis, 2007). Podle studie Kváč et al. (2011), jsou nejčastějšími subtypy *C. parvum* v České republice subtyp IIaA16G1R1 a IIaA15G2R1. Posledně zmíněný subtyp je současně nejčastěji se vyskytující variantou po celém světě (Hoque et al., 2022; Xiao, 2010; Yasur-Landau et al., 2021).

Podle studie Yang et al., (2020) je u mléčného skotu XXIIa dominantní podtypovou rodinou *C. ryanae* a rodiny XXIIc a XXIIh byly zjištěny pouze u jaků a masného dobytka. To je v rozporu s genotypem zjištěným v této práci, protože zde byla subtypová rodina XXIIc zjištěna u telat mléčného skotu. Nicméně je třeba poznamenat, že subtypizace druhu *C. ryanae* není příliš častá a dosud máme k dispozici jen omezené množství výsledků. Je tedy pravděpodobné, že rozšíření dalších subtypů *C. ryanae* je častější, stejně tak, jak tomu bylo v případě subtypů *C. ubiquitum* (Kellnerová et al., 2017; Kotková et al., 2016; Li et al., 2014; Trogu et al., 2021).

Kokcidióza skotu je významné protozoární onemocnění na celém světě způsobené druhy rodu *Eimeria*, která každoročně způsobuje významné ekonomické ztráty v chovech skotu (Dauguschies et Najdrowski, 2005; Nalbantoglu et al., 2008; Olafadunsin et al., 2020). Na rozdíl od kryptosporidiových infekcí se eimeriové objevují nejčastěji u starších telat, což jsme potvrdili i v této práci (Chandra Deb et al., 2022).

Celková prevalence *Eimeria* spp. ve sledovaných chovech byla 100 %. Obdobně vysokou prevalenci 96,2 % zjistili Enemark et al., (2013) v Dánsku. Další studie uvádějí podobně vysoké promoření stád skotu (Bangoura et al., 2011; Bangoura et al., 2012; Barburas et al., 2022; Ekawasti et al. 2021; Koutny et al., 2012).

Dosud bylo popsáno více než 20 druhů rodu *Eimeria*, které infikují skot po celém světě. Mezi dominantní druhy patří *E. bovis*, *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii* a *E. auburnensis* (Enemark et al., 2013; Chandra Deb et al., 2022; Koutny et al., 2012; Melo et al., 2022; Saravia et al., 2021). Výsledky naší práce se s výše uvedenými údaji shodují jen částečně. Ve shodě s publikovanými pracemi jsme detekovali jako dominantní druhy *E. bovis*, *E. ellipsoidalis* a *E. zuernii*. V naší práci jsme jako druhou

nejčastější eimerii detekovali *E. cylindrica*, která je považována za druh minoritní. Zatímco více než 30 % infekcí bylo způsobeno touto eimerií, Melo et al., 2022 uvádí pouze 0,76 % infekcí s *E. cylindrica*, Lassen et al. (2009) detekovali pouze 2 % této kokcidie, Ola-Fadunsin et al. (2020) zjistili výskyt *E. cylindrica* u 8 % infekcí, Saravia et al. (2021) nedekovali žádný případ infekce touto eimerií. V souladu s našimi výsledky jsou naopak zjištěni Enemark et al., (2013), kteří detekovali *E. cylindrica* ve 23 % případů.

Za pozornost stojí rozdílné druhové zastoupení jednotlivých druhů eimerií u telat pocházejících z různých chovů. Téměř všechna zvířata z farmy Pořín byla dominantně parazitována *E. bovis*, *E. zurnii* a *E. cylindrica*. Tyto eimerie byly spolu se zvířaty přeneseny na farmu Chotčiny. Telata z farmy Kloužovice byla infikována až po převedení na farmu Chotčiny, nicméně tato zvířata byla dominantně parazitována druhy, *E. zurnii*, *E. cylindrica* a *E. elipsoidalis*. Výskyt *E. bovis* u telat z Kloužovic byl ojedinělý. V literatuře jsme nedohledali žádné vědecky podložené vysvětlení v druhovém zastoupení eimerií u různých skupin zvířat. Absenci *E. bovis* u většiny telat z Kloužovic nelze vysvětlit věkovou specifitou *E. bovis*, neboť tento druh se běžně vyskytuje u všech věkových kategorií skotu (Bangoura et al., 2012; Fayer et al., 2000b; Pyziel et al., 2019).

Výsledky práce ukázaly, že výskyt průjmových onemocnění, včetně krvavých průjmů, je spojený s výskytem eimeriových infekcí. Nicméně byl pozorován rozdíl mezi chovy. První výskyt oocyst eimerií v trusu telat na farmě v Poříně byl zaznamenán u jedinců ve stáří čtyř týdnů. S ohledem na délku vývojového cyklu kokcidií skotu, který se pohybuje v rozmezí od 8 do 18 dnů (Mundt et al., 2005; Černá, 1983), je zřejmé, že zvířata byla nakažena již v prvních dvou týdnech stáří. Zdroj infekce pro tyto zvířata představují pravděpodobně jejich matky, se kterými telata zůstávají po dobu až 12 hodin po porodu. Kontakt novorozeného telete s kontaminovanou podestýlkou na porodně tak představuje výrazné riziko infekce (Klein-Jöbstl et al., 2014). Naopak u telat v Kloužovicích nebyly detekovány žádné eimeriové infekce až do doby přesunu na farmu Chotčiny. První výskyt oocyst u těchto zvířat byl v devátém týdnu stáří, tedy pět týdnů po přesunu, což dokazuje vliv způsobu odchovu telat na výskyt eimeriových infekcí.

Výskyt jednotlivých intenzit infekcí napříč vyšetřovanými věkovými kategoriemi telat v této studii odpovídal údajům publikovanými Enemark et al., (2013). Slabé a

střední infekce se v naší studii vyskytovaly u 68 % zvířat, což je v souladu se 71 % uváděnými výše zmíněnými autory.

Byly zjištěny významné rozdíly ve výskytu průjmů u telat ve stáří 8–12 týdnů. U zvířat v Poříně byl zaznamenán výrazný vzestup počtu průjmujících telat (z 10 % na 35 %). Na základě získaných dat se domníváme, že příčinou je kombinace eimeriových infekcí a nevhodného ustájení, zejména v období dešťů. Waruiru et al. (2000) uvádí, že deštivé počasí zvyšuje pravděpodobnost eimeriových infekcí.

Závěry a doporučení

Prokázali jsme výskyt kryptosporidií, zejména *C. parvum*, v obou sledovaných chovech (v Kloužovicích i v Poříně). Byly zjištěny nedostatky ve způsobu odchovu telat (absence dezinfekce, nesystémové umístění zvířat do volných VIB), které představují zvýšené riziko šíření kryptosporidiových infekcí. Z hlediska prevence výskytu kryptosporidiových infekcí doporučujeme důkladnou mechanickou očistu VIB po vyskladnění telete s následnou dezinfekcí VIB a plochy kde VIB byla umístěna.

Napájení kvalitním mlezivem s vyšším obsahem imunoglobulinů vedlo ke snížení intenzity infekce způsobené *C. parvum*, nicméně nezabránilo jejímu vzniku. Z uvedeného plyne, že kontrola kvality mleziva je nezbytná a neměla by být opomíjena.

Bylo zjištěno, že s prodlužující se dobou pobytu telete v prostředí porodny a umístování nově narozených zvířat do kontaktu se staršími telaty vedlo k zvýšenému riziku infekce eimeriemi již v raném stáří telat. Doporučujeme bezprostřední převedení telat do VIB ihned po porodu. Ideálně mimo skupinu telat, u které je riziko výskytu infekcí *Eimeria* spp.

Nevyhovující technologie společného odchovu telat v Poříně po odstavu vede k zvýšené pravděpodobnosti výskytu průjmů, pravděpodobně spojených s infekcí *Eimeria* spp. Doporučujeme změnit odchov telat po odstavu a zlepšit zoohygienu ustájení. Nicméně bez aplikace předchozích doporučení nebude mít tato změna požadovaný efekt.

Seznam použité literatury

Abdel-Moein, K. A., Saeed, H. (2016). The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings. *Parasitology Research*, 115(8):3197–3202.

Åberg, M., Emanuelson, U., Troell, K., Björkman, C. (2019). Infection dynamics of *Cryptosporidium bovis* and *Cryptosporidium ryanae* in a Swedish dairy herd. *Veterinary Parasitology*, 276:100010.

Åberg, M., Emanuelson, U., Troell, K., Björkman, C., (2020). A single-cohort study of *Cryptosporidium bovis* and *Cryptosporidium ryanae* in dairy cattle from birth to calving. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 20:100400.

Amadi, B., Mwiya, M., Sianongo, S., Payne, L., Watuka, A., Katubulushi, M., Kelly, P. (2009). High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. *BMC Infectious Diseases*, 9:195.

Bangoura, B., Mundt, H. C., Schmäschke, R., Westphal, B., Dauschies, A. (2011). Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion. *Parasitology Research*, 109 (1):129–138.

Bangoura, B., Mundt, H. C., Schmäschke, R., Westphal, B., Dauschies, A. (2012). Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion. *Parasitology Research*, 110(2):875–881.

Barbee, S. L., Weber, D. J., Sobsey, M. D., Rutala, W. A. (1999). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. *Gastrointestinal Endoscopy*, 49(5):605–611.

Barburas, D. A., Cozma, V., Ionica, A. M., Abbas, I., Barburas, R., Mircean, V., D'Amico, G., Dubey, J. P., Gyorke, A. (2022). Intestinal parasites of buffalo calves from Romania: molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*, and the first report of *Eimeria bareillyi*. *Folia Parasitologica*, 69:015.

Bouzid, M., Hunter, P. R., Chalmers, R. M., Tyler, K. M. (2013). *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1):115–134.

Brouček, J., Šoch, M. (2008). *Technologie chovu telat do odstavu*. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice. ISBN 978-80-7394-096-6.

Cruvinel, L. B., Ayres, H., Zapa, D. M. B., Nicaretta, J. E., Couto, L. F. M., Heller, L. M., Bastos, T. S. A., Cruz, B. C., Soares, V. E., Teixeira, W. F., de Oliveira, J. S., Fritzen, J. T., Alfieri, A. A., Freire, R. L., Lopes, W. D. Z. (2020). Prevalence and risk factors for agents causing diarrhea (Coronavirus, Rotavirus, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., and nematodes helminthes) according to age in dairy calves from Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 52(2):777–791.

Čermáková, Z., Voxová, B., Ryšková, O., Valenta, Z., Plíšková, L., Lesná, J., Förstl, M., Buchta, V., Plíšek, S., Prášil, P., & Bolehovská, R. (2008). *Giardia intestinalis* – zajímavý střevní prvok. *Folia Gastroenterologica et Hepatologica*, 6(1).

Černá, Ž. (1983). *Kokcidie některých domácích a užitkových zvířat a kokcidie člověka*. Academia.

Dauguschies, A., Najdrowski, M. (2005). Eimeriosis in cattle: current understanding. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52(10):417–427.

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. *International Journal for Parasitology*, 29(8):1269–1287.

Deksne, G., Mateusa, M., Cvetkova, S., Derbakova, A., Keidāne, D., Troell, K., Schares, G. (2022). Prevalence, risk factor and diversity of *Cryptosporidium* in cattle in Latvia. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 28:100677.

Derbakova, A., Zolovs, M., Keidāne, D., Šteingolde, Ž. (2020). Effect of immunoglobulin G concentration in dairy cow colostrum and calf blood serum on *Cryptosporidium* spp. invasion in calves. *Veterinary World*, 13(1):165–169.

Díaz, P., Quílez, J., Chalmers, R. M., Panadero, R., López, C., Sánchez-Acedo, C., Morrondo, P., Díez-Baños, P. (2010). Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology*, 137(8):1187–1193.

Doležal, O., Staněk, S., Bečková, I., Černá, D., Dolejš, J. (2015). *Chov dojeného skotu: technologie, technika, management*. Profi Press, Praha. ISBN 978-80-8672-670-0.

Ekawasti, F., Nurcahyo, R. W., Firdausy, L. W., Wardhana, A. H., Sawitri, D. H., Prastowo, J., Priyowidodo, D. (2021). Prevalence and risk factors associated with *Eimeria* species infection in cattle of different geographical regions of Indonesia. *Veterinary World*, 14(9):2339–2345.

Ekawasti, F., Nurcahyo, R. W., Nashrulloh, M. F., Priyowidodo, D., Prastowo, J. (2022). Development of a multiplex polymerase chain reaction technique for detection and discrimination of *Eimeria* spp. in cattle in Indonesia. *Veterinary World*, 15(4):975–980.

Enemark, H. L., Dahl, J., Enemark, J. M. (2013). Eimeriosis in Danish dairy calves--correlation between species, oocyst excretion and diarrhoea. *Parasitology Research*, 112(1):169–176.

Fayer, R., Morgan, U., Upton, S. J. (2000a). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13):1305–1322.

Fayer, R., Santín, M., & Trout, J. M. (2008). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156(3-4):191-198.

Fayer, R., Santín, M., Xiao, L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Parasitology*, 91(3):624–629.

Fayer, R., Tilley, M., Upton, S. J., Guidry, A. J., Thayer, D. W., Hildreth, M., Thomson, J. (1991). Production and preparation of hyperimmune bovine colostrum for passive immunotherapy of cryptosporidiosis. *The Journal of Protozoology*, 38(6):38–39.

Fayer, R., Trout, J. M., Graczyk, T. K., Lewis, E. J. (2000b). Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Veterinary Parasitology*, 93(2):103–112.

Fayer, R., Xiao, L. (2007). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 2. vyd. CRC press. ISBN: 978-1-4200-5226-8

Feng, Y., Yang, W., Ryan, U., Zhang, L., Kvac, M., Koudela, B., Modry, D., Li, N., Fayer, R., Xiao, L. (2011). Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1):34–41.

Gardiner, C. H. (1988). *An atlas of protozoan parasites in animal tissues* (No. 651). US Department of Agriculture, Agricultural Research Service.

Gargala G. (2008). Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*. *Parasite*, 15(3):275–281.

Geden, C. J., Rutz, D. A., Bishop, D. R. (1990). Cattle lice (Anoplura, Mallophaga) in New York: seasonal population changes, effects of housing type on infestations of calves, and sampling efficiency. *Journal of Economic Entomology*, 83(4):1435–1438.

Glaberman, S., Moore, J. E., Lowery, C. J., Chalmers, R. M., Sulaiman, I., Elwin, K., Rooney, P. J., Millar, B. C., Dooley, J. S., Lal, A. A., Xiao, L. (2002). Three drinking-

water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases*, 8(6):631–633.

Graczyk, T. K., Cranfield, M. R., Bostwick, E. F. (2000). Successful hyperimmune bovine colostrum treatment of Savanna monitors (*Varanus exanthematicus*) infected with *Cryptosporidium* sp. *The Journal of Parasitology*, 86(3):631–632.

Graczyk, T. K., Cranfield, M. R., Helmer, P., Fayer, R., Bostwick, E. F. (1998). Therapeutic efficacy of hyperimmune bovine colostrum treatment against clinical and subclinical *Cryptosporidium* serpentis infections in captive snakes. *Veterinary Parasitology*, 74(2-4):123–132.

Holubová, N., Sak, B., Horčíčková, M., Hlásková, L., Květoňová, D., Menchaca, S., McEvoy, J., Kváč, M. (2016). *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitology Research*, 115(6):2243–2251.

Hoque, S., Mavrides, D. E., Pinto, P., Costas, S., Begum, N., Azevedo-Ribeiro, C., Liapi, M., Kváč, M., Malas, S., Gentekaki, E., Tsaousis, A. D. (2022). High occurrence of zoonotic subtypes of *Cryptosporidium parvum* in cypriot dairy farms. *Microorganisms*, 10(3):531.

Hoskins, D., Chrisp, C. E., Suckow, M. A., Fayer, R. (1991). Effect of hyperimmune bovine colostrum raised against *Cryptosporidium parvum* on infection of guinea pigs by *Cryptosporidium wrairi*. *The Journal of Protozoology*, 38(6):185–186.

Chandra, Deb, L., Ahmed, S. S. U., Baidhya, C. C., Deb Nath, N., Ghosh, S., Paul, S. (2022). Prevalence of *Eimeria* spp. with associated risk factors in dairy calves in Sylhet, Bangladesh. *Veterinary Medicine and Science*, 8(3):1250–1257.

Cho, Y. I., Yoon, K. J. (2014). An overview of calf diarrhea – infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science*, 15(1):1–17.

Jarolímková, A. (2020). *Průjmy u telat – praktický postup pro chovatele* [online]. Asociace soukromého zemědělství ČR. Praha © 2023 [cit. 14.2.2023]. Dostupné z:

<https://www.asz.cz/clanek/5948/prujmy-u-telat-prakticky-postup-pro-chovatele/?fbclid=IwAR2ORLpXc12LJM8KK6ipEqLbMie2Y6x4tFBxL1mhLeb5Rrm5ofG2mdMeX3I>

Jiang, J., Bai, L., Surtees, J. A., Gemici, Z., Wang, M. D., Alani, E. (2005). Detection of high-affinity and sliding clamp modes for MSH2-MSH6 by single-molecule unzipping force analysis. *Molecular Cell*, 20(5):771–781.

Klein-Jöbstl, D., Iwersen, M., Drillich, M. (2014). Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: a case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *Journal of Dairy Science*, 97(8):5110–5119.

Kellnerová, K., Holubová, N., Jandová, A., Vejčík, A., McEvoy, J., Sak, B., Kváč, M. (2017). First description of *Cryptosporidium ubiquitum* XIIa subtype family in farmed fur animals. *European Journal of Protistology*, 59:108–113.

King, B. J., Monis, P. T. (2007). Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology*, 134(3):309–323.

Kotková, M., Nemejc, K., Sak, B., Hanzal, V., Květoňová, D., Hlásková, L., Condlová, S., McEvoy, J., Kváč, M. (2016). *Cryptosporidium ubiquitum*, *C. muris* and *Cryptosporidium deer genotype* in wild cervids and caprines in the Czech Republic. *Folia Parasitologica*, 63, 2016.003.

Koutny, H., Joachim, A., Tichy, A., Baumgartner, W. (2012). Bovine *Eimeria* species in Austria. *Parasitology Research*, 110(5):1893–1901.

Kváč, M., Havrdová, N., Hlásková, L., Daňková, T., Kanděra, J., Ježková, J., Vítovec, J., Sak, B., Ortega, Y., Xiao, L., Modrý, D., Chelladurai, J. R., Prantlová, V., McEvoy, J. (2016). *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PloS One*, 11(1): e0147090.

-
- Kváč, M., Hromadová, N., Květoňová, D., Rost, M., Sak, B. (2011). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. *Veterinary Parasitology*, 177(3-4):378–382.
- Kváč, M., Kouba, M., Vítovec, J. (2006). Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 137(3-4):202–209.
- Kváč, M., Vítovec, J. (2003). Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 50(9):451–457.
- Lassen, B., Viltrop, A., Raaperi, K., Jarvis, T. (2009). *Eimeria* and *Cryptosporidium* in Estonian dairy farms in regard to age, species, and diarrhoea. *Veterinary Parasitology*, 166(3-4):212–219.
- Lee, H. H., Lee, J. Y., Liu, S. S., Chen, C. C., Hsu, H. Y. (2021). *Cryptosporidium parvum* infection and management-based risk factors of dairy calves in Taiwan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 83(12):1838–1844.
- Li, N., Xiao, L., Alderisio, K., Elwin, K., Cebelinski, E., Chalmers, R., Santin, M., Fayer, R., Kváč, M., Ryan, U., Sak, B., Stanko, M., Guo, Y., Wang, L., Zhang, L., Cai, J., Roellig, D., Feng, Y. (2014). Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 20(2):217–224.
- Lindsay, D. S., Upton, S. J., Owens, D. S., Morgan, U. M., Mead, J. R., Blagburn, B. L. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(1):91–95.
- López-Osorio, S., Chaparro-Gutiérrez, J. J., Gómez-Osorio, L. M. (2020). Overview of poultry *Eimeria* life cycle and host-parasite interactions. *Frontiers in Veterinary Science*, 7:384.

Melo, L. R. B., Sousa, L. C., Lima, B. A., Silva, A. L. P., Lima, E. F., Ferreira, L. C., Feitosa, T. F., Vilela, V. L. R. (2022). The diversity of *Eimeria* spp. in cattle in the Brazilian Semiarid region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 31(3): e006422.

Miláček, P., Vítovec, J. (1985). Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica*, 32(1):50.

Mohammed, H. O., Wade, S. E., Schaaf, S. (1999). Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, 83(1):1–13.

Mundt, H. C., Bangoura, B., Rinke, M., Rosenbruch, M., Dauschies, A. (2005). Pathology and treatment of *Eimeria zuernii* coccidiosis in calves: investigations in an infection model. *Parasitology International*, 54(4):223–230.

Murphy, J. L., Arrowood, M. J. (2020). Cell culture infectivity to assess chlorine disinfection of *Cryptosporidium* oocysts in water. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2052:283–302.

Nalbantoglu, S., Sari, B., Cicek, H., Karaer, Z. (2008). Prevalence of coccidian species in the water buffalo (*Bubalus bubalis*) in the province of Afyon, Turkey. *Acta Veterinaria. Brno* 77:111–116.

O'Handley, R. M., Cockwill, C., McAllister, T. A., Jelinski, M., Morck, D. W., Olson, M. E. (1999). Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214(3):391–396.

Ola-Fadunsin, S. D., Rabiou, M., Hussain, K., Sanda, I. M., Ganiyu, I. A. (2020). Epidemiological studies of *Eimeria* species of cattle in Ilorin, North-Central Nigeria. *Annals of Parasitology*, 66(3):373–384.

Olson, M. E., Guselle, N. J., O'Handley, R. M., Swift, M. L., McAllister, T. A., Jelinski, M. D., Morck, D. W. (1997a). *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 38(11):703–706.

Olson, M. E., Thorlakson, C. L., Deselliers, L., Morck, D. W., McAllister, T. A. (1997b). *Giardia* and *Cryptosporidium* in canadian farm animals. *Veterinary Parasitology*, 68(4):375–381

Pancieria, R. J., Thomassen, R. W., Garner, F. M. (1971). Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, 8(5-6):479–484.

Perryman, L. E., Kapil, S. J., Jones, M. L., Hunt, E. L. (1999). Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. *Vaccine*, 17(17):2142–2149.

Plutzer, J., Karanis, P. (2007). Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Veterinary Parasitology*, 146(3-4):357–362.

Pyziel, A. M., Demiaszkiewicz, A. W., Klich, D., Laskowski, Z. (2019). A morphological and molecular comparison of *Eimeria bovis* – like oocysts (Apicomplexa: Eimeriidae) from European bison, *Bison bonasus* L., and cattle, *Bos taurus* L., and the development of two multiplex PCR assays for their identification. *Veterinary Parasitology*, 275, 108917.

Ruest, N., Faubert, G. M., Couture, Y. (1998). Prevalence and geographical distribution of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in dairy farms in Québec. *The Canadian Veterinary Journal = La revue Veterinaire Canadienne*, 39(11): 697–700.

Ryšavý, B. (1989). *Základy parazitologie: vysokoškolská učebnice pro studenty přírodovědecké fakulty*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha. ISBN 80-04-20864-9.

Santín, M., Trout, J. M., Fayer, R. (2008). A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, 155(1-2):15–23.

Santín, M., Trout, J. M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R. (2004). Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 122(2):103–117.

Saravia, A., Miraballes, C., Riet-Correa, F., Castro-Janer, E. (2021). *Eimeria* spp. in dairy calves in Uruguay. Identification, dynamics of oocyst excretion and association with the age of calves. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 25, 100588.

Sawitri, D. H., Wardhana, A. H., Martindah, E., Ekawasti, F., Dewi, D. A., Utomo, B. N., Shibahara, T., Kusumoto, M., Tokoro, M., Sasai, K., Matsubayashi, M. (2020). Detections of gastrointestinal parasites, including *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* spp., in cattle of Banten province, Indonesia. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 44(1):174–179.

Shah, J. S., Ramasamy, R. (2022). Fluorescence in situ hybridization (FISH) tests for identifying protozoan and bacterial pathogens in infectious diseases. *Diagnostics*, 12(5):1286.

Smith, D. R. (2012). Field disease diagnostic investigation of neonatal calf diarrhea. *The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice*, 28(3):465–481.

Soba, B., Logar, J. (2008). Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology*, 135(11):1263–1270.

Staněk, S., Doležal, O., Zink, V., Stádník, L. (2014). Analýza individuálního ustájení telat v období mléčné výživy ve stádech dojeného skotu v české republice. *Agritech Science*, 8(2):1–7. ISSN 1802-8942.

Strapák, P., Tančín, V., Vavrišínová, K., Grafenau, P., Bulla, J., Chrenek, P., Šimko, M., Juráček, M., Polák, P., Ryba, Š., Juhás, P., Huba, J., Krupová, Z. (2013). *Chov hovädzieho dobytka*. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. ISBN 978-80-552-0994-4.

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. *Veterinary Parasitology*, 116(2):97–113.

Thompson, R. A., Armson, A., Ryan, U. M. (2003). *Cryptosporidium: from molecules to disease*. Elsevier. ISBN 0444-51351-5.

Trogu, T., Formenti, N., Marangi, M., Viganò, R., Bionda, R., Giangaspero, A., Lanfranchi, P., Ferrari, N. (2021). Detection of Zoonotic *Cryptosporidium ubiquitum* in Alpine Wild Ruminants. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(6):655.

Trotz-Williams, L. A., Jarvie, B. D., Martin, S. W., Leslie, K. E., Peregrine, A. S. (2005). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *The Canadian Veterinary Journal = La revue Veterinaire Canadienne*, 46(4):349–351.

Trotz-Williams, L. A., Wayne Martin, S., Leslie, K. E., Duffield, T., Nydam, D. V., Peregrine, A. S. (2007). Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 82(1-2):12–28.

Tyzzar E. E. (1910). An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of Medical Research*, 23(3):487–510.

Tyzzar, E. E. (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 5(1):12–13.

Tyzzar, E. E. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde*, 26:394–412.

Upton, S. J., Current, W. L. (1985). The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *The Journal of Parasitology*, 71(5):625–629.

Volf, P., Horák, P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha. ISBN 978-80-7387-008-9.

Wang, R., Zhao, G., Gong, Y., Zhang, L. (2017). Advances and Perspectives on the Epidemiology of Bovine *Cryptosporidium* in China in the Past 30 Years. *Frontiers in Microbiology*, 8:1823.

Waruiru, R. M., Kyvsgaard, N. C., Thamsborg, S. M., Nansen, P., Bøgh, H. O., Munyua, W. K., Gathuma, J. M. (2000). The prevalence and intensity of helminth and coccidial infections in dairy cattle in central Kenya. *Veterinary Research Communications*, 24(1):39–53.

Weerda, M., Mahlkow-Nerge, K., Fiedler, A. (2021). *50 nejčastějších chorob skotu: rozpoznání, prevence, léčba*. Profi Press, Praha. ISBN 978-80-88306-15-3.

Wu, Y., Zhang, K., Zhang, Y., Jing, B., Chen, Y., Xu, C., Wang, T., Qi, M., Zhang, L. (2020). Genetic Diversity of *Cryptosporidium parvum* in Neonatal Dairy Calves in Xinjiang, China. *Pathogens*, 9(9):692.

Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124(1):80–89.

Xiao, L., Herd, R. P. (1994). Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology*, 55(3):257–262.

Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R. C., Fayer, R., Lal, A. A. (1999). Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8):3386–3391.

Yang, X., Huang, N., Jiang, W., Wang, X., Li, N., Guo, Y., Kváč, M., Feng, Y., Xiao, L. (2020). Subtyping *Cryptosporidium ryanae*: A Common Pathogen in Bovine Animals. *Microorganisms*, 8(8):1107.

Yasur-Landau, D., Zilberberg, M., Perry Markovich, M., Behar, A., Fleiderovitz, L., Leszkowicz Mazuz, M. (2021). *Cryptosporidium parvum* subtypes from diarrheic dairy calves in Israel. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 25:100608.

Zahedi, A., Ryan, U. (2020). *Cryptosporidium* – An update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission. *Research in Veterinary Science*, 132:500–512.

Seznam grafů

Graf 4.1: Délka patentní periody infekce způsobené <i>Cryptosporidium parvum</i> u telat na sledovaných farmách.	34
Graf 4.2: Druhové složení <i>Eimeria</i> spp. vyskytujících se u sledovaných telat.	35
Graf 4.3: Věk telat při prvním výskytu infekce <i>Cryptosporidium parvum</i> na sledovaných farmách.	36
Graf 4.4: Intenzita infekce <i>Cryptosporidium parvum</i> ve sledovaných chovech. Slabá infekce (+), středně silná infekce (++) , silná infekce (+++) a masivní infekce (++++).	37
Graf 4.5: Kumulativní prevalence <i>Eimeria</i> spp. ve sledovaném období na sledovaných farmách.	38
Graf 4.6: Druhové zastoupení druhů rodu <i>Eimeria</i> ve smíšených infekcích u telat ze sledovaných farem.	39
Graf 4.7: Intenzita infekce <i>Eimeria</i> spp. ve sledovaných chovech. Slabá infekce (+), středně silná infekce (++) , silná infekce (+++) a masivní infekce (++++).	40
Graf 4.8: Procento průjmových zvířat ve sledovaném období na farmě Kloužovice.	41
Graf 4.9: Procento průjmových zvířat ve sledovaném období na farmě Pořín.	41

Seznam obrázků

Obrázek 1.1: Životní cyklus <i>Giardia</i> sp. podle Gardiner, 1988.....	13
Obrázek 1.2: Vývojový cyklus rodu <i>Cryptosporidium</i> , upraveno podle Gardiner, 1988.....	15
Obrázek 1.3: Životní cyklus rodu <i>Eimeria</i> , upraveno podle Gardiner, 1988.	20
Obrázek 4.1: Vzorek trusu odebraný při klinické kokcidióze od telete starého 11 týdnů (vlastní obrázek).....	42

Seznam tabulek

Tabulka 1.1: Přehled <i>gp60</i> subtypových rodin <i>Cryptosporidium parvum</i> a jejich ozančení (Xiao, 2010).	17
Tabulka 1.2: Morfologie oocyst druhů <i>Eimeria</i> vyskytujících se u skotu v Evropě (Daugschies et Najdrowski, 2005).	19
Tabulka 3.1: Rozpis přípravy master-mixu pro PCR analýzy.....	28
Tabulka 3.2: Nastavení amplifikačních program pro jednotlivé PCR reakce.	29
Tabulka 3.3: Primery pro amplifikaci genu kódujícího SSU rodu <i>Cryptosporidium</i>	29
Tabulka 3.4: Primery pro amplifikaci genu kódujícího <i>gp60</i> druhu <i>Cryptosporidium parvum</i>	30
Tabulka 3.5: Sety primerů pro amplifikaci genu kódujícího <i>gp60</i> druhu <i>Cryptosporidium ryanae</i>	30
Tabulka 3.6: Sety primerů pro amplifikaci genu kódujícího ITS rodu <i>Eimeria</i>	31
Tabulka 4.1: Porovnání technologie chovu a odchovu telat ve sledovaných chovech.	33
Tabulka 4.2: Podíl jednotlivých druhů rodu <i>Eimeria</i> na infekcích telat pocházejících z farmy Pořín a Kloužovice.....	38

Seznam použitých zkratk

BVD	bovinní virová diarrhoea
gDNA	genomová DNA
gp60	60 kDa glykoproteinu
IgG	imunoglobulin G
ITS	vnitřní transkribovaný mezerník
PCR	polymerázová řetězová reakce
SSU rRNA	malá podjednotka rRNA
VIB	venkovní individuální boxy