



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

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

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Katedra zootechnických věd

**Bakalářská práce**

**Kryptosporidiové infekce ryb**

Autor práce: Michal Havelka

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

Konzultant práce: doc. Ing. Jitka Rutkayová, Ph.D.

České Budějovice

2021

## **Prohlášení**

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

V Českých Budějovicích dne 22. dubna 2021

.....

Podpis

## Abstrakt

Kryptosporidie jsou schopny infikovat širokou škálu hostitelů včetně volně žijících a domácích zvířat a lidí. Ačkoli je dobře známo, že ryby mohou být hostitelé několika druhů a genotypů kryptosporidií, o prevalenci kryptosporidií ve sladkovodních rybách v Evropě je k dispozici jen velmi málo informací. Infekčnost *C. parvum* pro ryby, jakožto druhu s širokým hostitelským spektrem, zůstává nedostatečně studována. V této studii jsme shromáždili 283 vzorků volně žijících sladkovodních ryb z osmi lokalit, 41 vzorků okrasných ryb shromážděných z osmi zooshopů v České republice. Výskyt a genetická rozmanitost *Cryptosporidium* spp. u studovaných ryb byla zkoumána mikroskopicky a polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) / sekvenováním zaměřeným na malou podjednotku rRNA. Experimentálně byla ověřena infekčnost *C. parvum* pro štiky (*Esox lucius*) a karasy (*Carrasius auratus*). Mikroskopie a molekulární analýza neodhalily přítomnost oocyst ani specifické DNA kryptosporidií u volně žijících sladkovodních ryb. Zatímco mikroskopické analýzy vzorků trusu okrasných ryb byly negativní na přítomnost oocyst kryptosporidií, molekulární analýzy prokázaly přítomnost *Cryptosporidium avium*, *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium tyzzeri* a *Cryptosporidium varanii*. Histologické vyšetření neprokázala přítomnost žádných vývojových stadií u štik ani karasů inkulovaných *C. parvum* nebo žijících v prostředí s oocystami *C. parvum*. Přítomnost DNA *C. parvum* byla detekována pouze v obsahu střev štik a karasů, kteří obývali prostředí s oocystami *C. parvum*. Přítomnost *C. avium*, *C. baileyi*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. tyzzeri* a *C. varanii* u okrasných ryb je pravděpodobně důsledkem kontaminace vody v nádrži prodavačem a zjištěné druhy kryptosporidií téměř bezpochyby pocházely od domácích hlodavců, ptáků a plazů chovaných ve stejném obchodě s domácími mazlíčky. Výsledek experimentální studie podporuje hypotézu, že kryptosporidie savců a ptáků nejsou pro ryby infekční a jejich přítomnost v rybách je důsledkem kontaminace životního prostředí.

**Klíčová slova:** *Cryptosporidium* spp.; prostředí; ryby; infekce

## Abstract

*Cryptosporidium* spp. is able to infect a wide range of hosts including wild and domestic animals, and humans. Although it is well known that fish could be host several *Cryptosporidium* species and genotypes, little information is available concerning the prevalence of *Cryptosporidium* in fresh water fish in Europe. Additionally, the infectivity of *C. parvum* for fish, the species with wide host range, remains poorly studied. In this study we collected 283 specimens of wild fresh water fish from eight localities, 41 specimens of ornamental fish collected from eight pet shops in the Czech Republic. The occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in studied fish was examined by microscopy and polymerase chain reaction (PCR)/sequencing targeting the small subunit rRNA. The infectivity of *C. parvum* for pike (*Esox lucius*) and crucian (*Carrasius auratus*) were experimentally verified. Microscopy and molecular analysis did not revealed presence of oocysts and specific *Cryptosporidium* DNA in wild fresh water fish. While microscopy analyses of faecal samples of ornamental fish were negative for presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts, molecular analyses shown presence *Cryptosporidium avium*, *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium varanii*. Histology did not show the presence of any developmental stages in any pikes and crucians inoculate with *C. parvum* or inhabit an environment with *C. parvum* oocysts. The presence of *C. parvum* DNA was detected only in intestinal contains of pikes and crucians who inhabit an environment with *C. parvum* oocysts. Presence of *C. avium*, *C. baileyi*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. tyzzeri* and *C. varanii* in ornamental fish is probably resulting of the contamination of the water in the tank by caretaker and detected species almost certainly originated from the pet rodents and birds bred in the same shop. The result of the experimental study supports the hypothesis that cryptosporidia of mammals, birds and reptiles are not infectious for fish and their presence in the fish is result of the environmental contamination.

**Keywords:** *Cryptosporidium* spp.; enviroment; fish; infection

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu práce prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. a celému kolektivu laboratoře za metodické vedení, odbornou pomoc a cenné rady poskytnuté při vypracování této bakalářské práce. Tato bakalářská práce byla finančně podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LTAUSA17165, řešitel prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>10</b>
<b>2 Literární přehled</b> .....	<b>11</b>
2.1 Kryptosporidie .....	11
2.2 Taxonomie kryptosporidií .....	11
2.3 Kryptosporidie a kryptosporidióza ryb .....	11
2.4 Charakteristika druhů a genotypů kryptosporidií detekovaných u ryb .....	12
2.4.1 <i>Cryptosporidium molnari</i> .....	12
2.4.2 <i>Cryptosporidium scophthalmi</i> .....	13
2.4.3 <i>Cryptosporidium huwi</i> .....	13
2.4.4 <i>Cryptosporidium bollandi</i> .....	13
2.4.5 <i>Cryptosporidium abrahamseni</i> .....	13
2.4.6 <i>Cryptosporidium</i> piscine genotypy 3–6, 8, 9.....	13
2.4.7 Koi-Carp genotype.....	13
2.4.8 <i>Cryptosporidium</i> marine genotypy I a II .....	13
2.4.9 <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	14
2.4.10 <i>Cryptosporidium hominis</i> .....	14
2.4.11 <i>Cryptosporidium scrofarum</i> .....	14
2.4.12 <i>Cryptosporidium xiaoi</i> .....	15
2.4.13 <i>Cryptosporidium</i> rat genotyp III.....	15
<b>3 Studie zabývající se kryptosporidiovými infekcemi u sladkovodních ryb</b> .....	<b>16</b>
3.1 Ryby .....	17
3.1.1 Karas zlatý ( <i>Carassius auratus</i> ) .....	17
3.1.2 Štika obecná ( <i>Esox lucius</i> ).....	17
3.2 Trávicí soustava ryb .....	17
3.3 Dutina ústní ryb.....	17
3.3.1 Druhy úst ryb .....	18

3.4	Žaludek ryb .....	19
3.5	Střevo ryb .....	20
<b>4</b>	<b>Cíl práce .....</b>	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>22</b>
5.1	Oocysty <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	22
5.2	Experimentální zvířata .....	22
5.3	Volně žijící a zájmově chované ryby .....	22
5.4	Charakteristika jednotlivých přírodních lokalit .....	24
5.5	Charakteristiky jednotlivých zájmových chovů a akvaristik .....	27
5.6	Design pokusů .....	27
5.6.1	Pokus 1 – Vnímavost štiky obecné k infekci <i>Cryptosporidium parvum</i> .	28
5.6.2	Pokus 2 – Vnímavost karase obecného ( <i>Carrasius auratus</i> ) k infekci <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	28
5.7	Barvení oocyst (Miláček a Vítovec 1989) .....	29
5.8	Izolace DNA .....	29
5.8.1	Izolace pomocí GeneAll® Exgame™ Stool DNA mini .....	30
5.8.2	Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit .....	31
5.8.3	Molekulární analýza .....	32
5.9	Gelová elektroforéza .....	33
5.10	Izolace PCR fragmentu z gelu .....	33
5.11	Sekvenace DNA .....	34
5.12	Odběr tkání pro histologické vyšetření .....	34
5.13	Příprava histologických preparátů .....	34
5.14	Barvení histologických řezů periodic acid shiff (PAS) .....	35
<b>6</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>37</b>
6.1	Výskyt kryptosporidií u volně žijících ryb .....	37
6.2	Výskyt kryptosporidií u akvariálních ryb .....	37



6.3	Infektivita <i>Cryptosporidium parvum</i> pro štiky obecné .....	38
6.4	Výskyt <i>Cryptosporidium parvum</i> u karase zlatého v závislosti na kontaminaci prostředí.....	39
<b>7</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>Závěry.....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>Seznam tabulek.....</b>	<b>52</b>
<b>11</b>	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>53</b>
<b>12</b>	<b>Seznam grafů .....</b>	<b>54</b>

---

# 1 Úvod

Ryby se vyskytují na zemi již od spodního devonu, tedy přibližně 400 milionů let (Roček, 2002) a jakožto jeden z nejrozšířenějších živočišných druhů obývají prakticky všechny typy pozemních vod od extrémně horkých, jako například halančikové prameny v Mexiku, které mají až 45 °C nebo extrémně studených, jako například v Antarktidě ryby druhu *Chamsocephalus gunnari*, které snášejí teplotu kolem -2 °C (Fischer, 2007). Rybolov jakožto obživa a ryby jako zdroj bílkovin jsou pro lidstvo důležité od nepaměti. První zmínky o chovu ryb a jejich využití nalezneme již 2300 let před naším letopočtem v Číně. V Egyptě a zemích blízkého východu se ryby začaly chovat kolem roku 700 př. n. l. V období středověku se ve velkém začaly stavět vodní nádrže a ryby v nich účelně chovat. Ryba sloužila ve středověku jako postní jídlo a na jídelníčku tvořila nemalé zastoupení. Pro zajímavost kapr ve středověku stál stejně jako dvě slepice. V dnešní době je trend všeobecně na ústupu i štedrovecerní kapr není již tolik vyžadován. Přesto je produkce ryb v České republice přibližně 17–20 tisíc tun za rok (Čítek et al., 1998).

Kromě pozitivního hospodářského významu představují ryby ale i potenciální nebezpečí. Jak sladkovodní, tak i mořské ryby jsou hostiteli a mezihostiteli celé řady parazitů, kteří mohou u člověka způsobovat závažná onemocnění. Kromě parazitů, pro které jsou ryby přirozenými hostiteli a mezihostiteli, mohou být ryby zdrojem parazitů, jejichž primárním hostitelem jsou jiní obratlovci (Certad et al., 2015).

Velké osídlení naší krajiny a poměrně nešetrné nakládání s odpadními vodami může být příčinou znečišťování povrchových vod. Odpadní vody, ale i splašky z polí, kde se hnojí chlévskou mrvou, jsou zdrojem řady parazitů pocházejících z hospodářsky chovaných zvířat. Přestože paraziti hospodářských zvířat jsou neinfekční pro ryby, mohou být jimi ryby kontaminovány.

Zde se dostáváme k cíli této práce, prokázání možného nakažení/kontaminace volně žijících ryb kryptosporidii. V nedávné době bylo publikováno několik studií s podezřením na kontaminaci rybích vnitřností, a dokonce i masa zoonotickými druhy kryptosporidií, zejména druhem *C. parvum*. Některé studie dokonce předpokládají možný vývoj této savčí kryptosporidie v zažívacím traktu ryb. Doposud však nebyl proveden žádný věrohodný experiment, který by prokázal, jestli jsou ryby hostiteli *C. parvum*.

---

## 2 Literární přehled

### 2.1 Kryptosporidie

Kryptosporidie jsou jednobuněční paraziti rozšíření po celém světě. Zpravidla parazitují v trávicím traktu obratlovců. V současné době je známo 47 druhů a velké množství tzv. genotypů kryptosporidií, které se navzájem liší ve svých biologických vlastnostech (Ježková et al., 2021). Některé druhy parazitují výhradně v žaludku, zatímco jiné, těch je většina, osidlují různé části střev svých hostitelů. V rámci rodu *Cryptosporidium* rozlišujeme druhy a genotypy, které jsou úzce specializovány na konkrétní živočišný druh a druhy, které jsou velmi univerzální a parazitují ve velkém množství hostitelů (Fayer a Xiao, 2007). Zástupci první skupiny jsou druhy *C. parvum*, *C. baileyi* nebo *C. ubiquitum*, kteří byli detekováni u velkého množství hostitelů, zatímco do druhé skupiny patří většina známých druhů a genotypů kryptosporidií. Typickým příkladem je druh *C. wrairi* u něhož je znám pouze jeden hostitel – morče (Vetterling et al., 1971).

### 2.2 Taxonomie kryptosporidií

Kryptosporidie jsou zástupci rodu Apicomplexa a patří mezi eukaryotické organismy. Typickým znakem těchto organismů je přítomnost apikálního komplexu, který slouží k infekci hostitelské buňky (Fayer et al., 1997). Kryptosporidie a kokcidie mají velmi podobný vývojový cyklus a na základě této podobnosti tak byly kryptosporidie dlouho řazeny mezi kokcidie (Fayer et al., 1997). Fylogenetickou odlišnost kokcidií a kryptosporidií vyvrátily až molekulární analýzy. Na základě těchto analýz se prokázala příbuznost kryptosporidií s gregarinami (Carreno et al., 1999).

### 2.3 Kryptosporidie a kryptosporidióza ryb

Na rozdíl od kryptosporidií a kryptosporidiových infekcí savců nebo ptáků, které jsou intenzivně studovány již desítky let, o kryptosporidiích ryb existuje relativně malé množství informací (Zahedi et al., 2021). Se stoupajícím počtem provedených molekulárních studií došlo k odhalení mnohem větší diverzity kryptosporidií ryb, než se dříve předpokládalo (Certad et al., 2020). *Dosud byly pomocí molekulárních metod detekovány kryptosporidie u více než 25 druhů mořských i sladkovodních ryb* (Zahedi et al., 2021). Ryby jsou přirozenými hostiteli pěti druhů kryptosporidií *Cryptosporidium molnari* (Alvarez-Pellitero a Sitjà-Bobadilla, 2002; Palenzuela et al.,

---

2010), *C. scophthalmi* (Alvarez-Pellitero et al., 2004) a *C. huwi* (dříve známé jako *Cryptosporidium* piscine genotyp 1; Ryan et al., 2015), *C. bollandi* (dříve známé jako *Cryptosporidium* piscine genotyp 2; (Bolland et al., 2020) a *C. abrahamseni* (dříve známé jako *Cryptosporidium* piscine genotyp 7; Zahedi et al., 2021). Kromě těchto hostitelsky specifických druhů, byly u ryb nalezeny i další druhy kryptosporidií primárně adaptované na jiné obratlovce, jako jsou *C. parvum*, *C. hominis*, *C. scrofarum* a *C. xiaoi*. Kromě toho byl hlášen výskyt *Cryptosporidium* piscine genotypy 3–6 (Certad et al., 2015; Collins 1997; Couso-Pérez et al., 2018; Darriba et al., 2012), piscine genotypy 8–9 (Díaz et al., 2018), *C. molnari*-like genotyp (Alvarez-Pellitero et al., 2004; Collins, 1997; Elwakil a Hewedi, 2010; FAO, 2018; Follet et al., 2011; Gatei et al., 2007), Koi-Carp genotype (Graczyk et al., 2007), *Cryptosporidium* marine genotypy I a II (Alvarez-Pellitero et al., 2004), pět nepojmenovaných nových genotypů (FAO, 2018, Follet et al., 2011) a *Cryptosporidium* rat genotyp III (Couso-Pérez et al., 2018; Ryan et al., 2014; Yang et al., 2015, 2016).

Většina studií o rybích kryptosporidiích byla však provedena na akvarijních nebo chovaných rybách a množství údajů o molekulární identifikaci druhů a genotypů kryptosporidií u volně žijících mořských a sladkovodních ryb je omezené.

Dosud byly provedeny pouze dvě studie v Austrálii a na Papui-Nové Guineji týkající se volně žijících mořských ryb (Koinari et al., 2013; Reid et al., 2010) a jedna studie zaměřená na výskyt těchto parazitů ve sladkovodních rybách v Ženevském jezeře (Certad et al., 2015).

## **2.4 Charakteristika druhů a genotypů kryptosporidií detekovaných u ryb**

### **2.4.1 *Cryptosporidium molnari***

Druh *C. molnari* je poměrně nový druh mezi kryptosporidiemi. Tento druh byl objeven a pozorován u dvou druhů mořských ryb a to pražmy mořské (*Sparus aurata*) a mořského vlka obecného (*Dicentrarchus labrax*). Byly nalezeny plně sporulované oocysty tohoto druhu kryptosporidií, které osidlují přednostně žaludek. Ve střevech byly nalezeny minimálně. Zajímavostí tohoto druhu je osidlování velmi hluboko v hostitelském epitelu (Alvarez-Pellitero a Sitjà-Bobadilla, 2002).

---

#### **2.4.2 *Cryptosporidium scophthalmi***

Tento druh byl objeven na pobřeží Španělska na farmách pro chov kambaly (*Scophthalmus maximus*). Byl nalezen ve střevě, zřídka v žaludku. Plně sporulované oocysty se nacházely v lumenu střev a v trusu (Alvarez-Pellitero et al., 2004).

#### **2.4.3 *Cryptosporidium huwi***

Tato kryptosporidie je poměrně nová, vzdáleně příbuzná *C. molnari*, avšak natolik jiná, aby byla uznána jako samostatný druh. Byla nalezena u sladkovodních ryb a u nás často u akvarijských rybiček známých jako živorodka duhová (*Poecilia reticulata*; Ryan et al., 2015).

#### **2.4.4 *Cryptosporidium bollandi***

*Cryptosporidium bollandi* je název druhu navržený pro druh *C. piscine* genotyp 2. Tento druh byl popsán u sladkovodních ryb a to u skalára amazonského (*Pterophyllus scalare*) a vrubozubce pavího (*Astronotus ocellatus*; Bolland et al., 2020).

#### **2.4.5 *Cryptosporidium abrahamseni***

Toto je velmi krátce objevený druh kryptosporidií, který byl nalezen u ryb a to konkrétně u tetry paraguayské (*Moenkhausia sanctaefilomenae*). Tento nový druh je geneticky nejbližší *C. huwi*, kde je genetická vzdálenost 6.7% (Zahedi et al., 2021).

#### **2.4.6 *Cryptosporidium piscine* genotypy 3–6, 8, 9**

O těchto genotypech toho není moc známo, byly identifikovány v tresce bezvousé (*Merlangius merlangus*), tresce tmavé (*Pollachius virens*), mníka modrého (*Molva dypterygia*) a makrele obecné (*Scomber scombrus*) odchycených v mořích kolem Evropy (Cerlad et al., 2020).

#### **2.4.7 Koi-Carp genotype**

Tento genotyp byl objeven nedávno u jednoho kusu ryby Koi kapr. Infekce byla lokalizována hluboko v epitelu střeva, sleziny, jater, žaber a ledvin. Na tomto exempláři byly pozorovány granulomatózní zánětlivé léze. Tento genotyp je nejvíce příbuzný druhu *C. molnari* (Yang et al., 2016).

#### **2.4.8 *Cryptosporidium marine* genotypy I a II**

Jak již samotný název říká, tak tento druh kryptosporidií pochází od slanovodních ryb konkrétně tresky bezvousé (*Merlangius merlangus*), tresky tmavé (*Pollachius*

---

*virens*), mníka modrého (*Molva dypterygia*) a makrely obecné (*Scomber scombrus*), které byly odebrány v několika mořích kolem celé Evropy. *Cryptosporidium* marine genotyp I má podle studie velké množství genetických variací, zatímco *Cryptosporidium* marine genotyp II byl zastoupen pouze v jedné variantě (Certad et al., 2020).

#### **2.4.9 *Cryptosporidium parvum***

*Cryptosporidium parvum* patří mezi jedny z prvních popsáných druhů kryptosporidií (Tyzzer, 1912). Tento druh se vyznačuje širokým hostitelským spektrem. Předpokládá se, že může být infekční pro všechny savce a některé ptáky (Hofmannová et al. 2016; Kváč et al., 2014).

#### **2.4.10 *Cryptosporidium hominis***

Přestože byla přirozená infekce druhem *C. hominis* detekována u celé řady hostitelů a také byl tento druh experimentálně přenesen na laboratorní zvířata, je *C. hominis* hostitelsky adaptovaný na člověka (Jíra, 2009c). U tohoto druhu nebyla popsána věková specifita. *Cryptosporidium hominis* primárně osidluje tenké střevo, ale u imunodeficitních jedinců může dojít k diseminaci i do dalších částí zažívacího (Mogan et al., 2002).

#### **2.4.11 *Cryptosporidium scrofarum***

Druh *C. scrofarum* (dříve známý jako *Cryptosporidium* pig genotyp II) je hostitelsky adaptovaný na prasata (Kváč et al., 2012). Celosvětově byl popsán jak v chovech prasat, tak i u divokých prasat (Kváč et al., 2013). Tato kryptosporidie se vyznačuje věkovou specifitou – je infekční pro selata starší pěti týdnů. Parazit osidluje všechny části tenkého i tlustého střeva hostitele. Infekce prasat tímto druhem kryptosporidie není spojována s výskytem klinických případů onemocnění. Kromě prasat bylo *C. scrofarum* detekováno u řady dalších hostitelů, jako například člověka, potkanů, myši nebo ryb (Němejc et al., 2013; Zhang et al., 2013). Kromě člověka, u kterého byla bezpochyby prokázána vnímavost k infekci tímto druhem, u ostatních hostitelů se předpokládá, že přítomnost *C. scrofarum* v trusu vyšetřovaných jedinců byla výsledkem kontaminace vody nebo potravy, kterou zvířata pozřela.

---

#### **2.4.12 *Cryptosporidium xiaoi***

*Cryptosporidium xiaoi* byl dříve označován jako genotyp druh *Cryptosporidium bovis*. Na základě hostitelské specificity a genetických odlišností byl popsán jako samostatný druh, který je primárně adaptovaný na ovce. Přestože jsou vnímavější jehňata, není neobvyklá infekce i u starších jedinců (Fayer a Santín, 2009).

#### **2.4.13 *Cryptosporidium rat* genotyp III**

Jak již napovídá sám název, jedná se o kryptosporidii, která parazituje primárně u krys a potkanů. Výskyt tohoto genotypu je dle dosavadních studií vázán na území Asie. V Evropě dosud tento genotyp nebyly nalezen (Ježková et al., 2020). Ze studie provedené na Havaji je možné se domnívat, že je možný přenos i na člověka (Zhao et al., 2019).

---

### 3 Studie zabývající se kryptosporidiovými infekcemi u sladkovodních ryb

Couso-Pérez et al. (2018) studovali výskyt kryptosporidií u farmově chovaných pstruhů duhových (*Oncorhynchus mykiss*) na farmě nedaleko Santiaga de Compostela. Celkově bylo vyšetřeno 360 ryb a pomocí imunofluorescenční mikroskopie byly oocysty kryptosporidií nalezeny u 33 jedinců. Nejčastěji byly kryptosporidie detekovány v pylorických přívěscích (42,4 %). Pouze ve střevech byly detekovány v 39,4 % a v 18,2 % případů byly kryptosporidie nalezeny jak ve střevech, tak i v pylorickém přívěsku. Následná sekvenace prokázala přítomnost *Cryptosporidium* piscine genotyp 9 a *C. parvum*. Couso-Pérez et al. (2019) studovali výskyt kryptosporidií u pstruhů obecných (*Salmo trutta*) odlovených ve 44 řekách v 10 různých povodích ve Španělsku. Z celkového počtu 613 odlovených ryb bylo na základě vyšetření imunofluorescenční mikroskopii 103 vzorků jejich střev a pylorických přívěsků pozitivních na přítomnost oocyst kryptosporidií. Ze všech pozitivních testů bylo 69,9 % v pylorických přívěscích, 14,6 % ve střevech a 15,5 % jak ve střevech, tak v pylorických přívěscích. Molekulární analýzy prokázaly přítomnost *Cryptosporidium molnari*-like genotypu a *C. parvum* subtypů IIaA15G2R1 a IIaA18G3R1.)

Ve studii zaměřené na kryptosporidiové infekce kaprů Koi (*Cyprinus carpio*) byl nalezen pouze jeden pozitivní jedinec s masivní infekcí ve střevech, ledvinách, slezině, játrech a žábřácích. Dle studie se jednalo o nový genotyp, který byl fylogeneticky nejvíce příbuzný *Cryptosporidium molnari* (Yang et al., 2016).

Certad et al. (2015) studovali sladkovodní ryby v Ženevském jezeře. Celkově bylo vyšetřeno 41 kusů ryb a 100 filetů od místních rybářů. Pomocí PCR metod byly kryptosporidie detekovány u 15 ryb, konkrétně u sivena severního (*Salvelinus alpinus*), štiky obecné (*Esox lucius*), síha severního (*Coregonus maraena*), okouna říčního (*Perca fluviatilis*) a plotice obecné (*Rutilus rutilus*). Sekvenace získaných PCR produktů prokázaly přítomnost *C. parvum* (87 %), *C. molnari* (7 %) a smíšených infekcí *C. parvum* a *C. molnari* (7 %). *Cryptosporidium molnari* bylo identifikováno pouze v žaludku, zatímco *C. parvum* se vyskytovalo v žaludku i ve střevech. Z celkové počtu 100 filetů byla přítomnost kryptosporidií prokázána jen v jednom z nich a jednalo se o *C. molnari*.



---

## 3.1 Ryby

Ryby jsou obratlovci s největším zastoupením druhů a to přes 30 000 různých druhů. Přibližně polovina je sladkovodních. Ročně je popisováno mnoho dalších druhů, jak slanovodních, tak sladkovodních. Ryby nalezneme od vysoko tekoucích potoků v Himalájích po obrovské hlubiny oceánů (Hanel, 1998).

V dalším textu se budu zabývat podrobněji jen druhy ryb, které jsme použili v naší práci.

### 3.1.1 Karas zlatý (*Carassius auratus*)

Karas zlatý je u nás nepůvodní druh, který byl do České republiky dovezen v 17. století jako okrasná ryba z Číny (Hanel, 1998). Je to velmi odolná a přizpůsobivá ryba. Přijímaná potrava je zooplankton, hmyz, bentos, detrit, řasy a úlomky rostlin. Karas je schopen adaptace i ve velmi znečištěných vodách (Dubský et al., 2003).

### 3.1.2 Štika obecná (*Esox lucius*)

Štika obecná je vrcholový predátor, který se vyskytuje na severní polokouli. Je to stanovištní ryba, která většinu svého života tráví na jednom místě. Živí se rybičkami a je vyhledávanou sportovní rybou (Hanel, 1998). V České republice je štika původním druhem. Není náročná na obsah kyslíku a může žít i v eutrofních vodách. Důležitou součástí pro její život je rozmanité pobřeží s velkým dostatkem úkrytů. Po většinu roku žije samotářským způsobem života. S ostatními jedinci se setkává pouze v období výtěrů (Dubský et al., 2003).

## 3.2 Trávicí soustava ryb

Trávicí soustava je složena z trávicí trubice. Hlavní funkce trávicí soustavy je příjem potravy, její trávení a v neposlední řadě i vylučování nestrávených zbytků (Dvořák, 2014).

## 3.3 Dutina ústní ryb

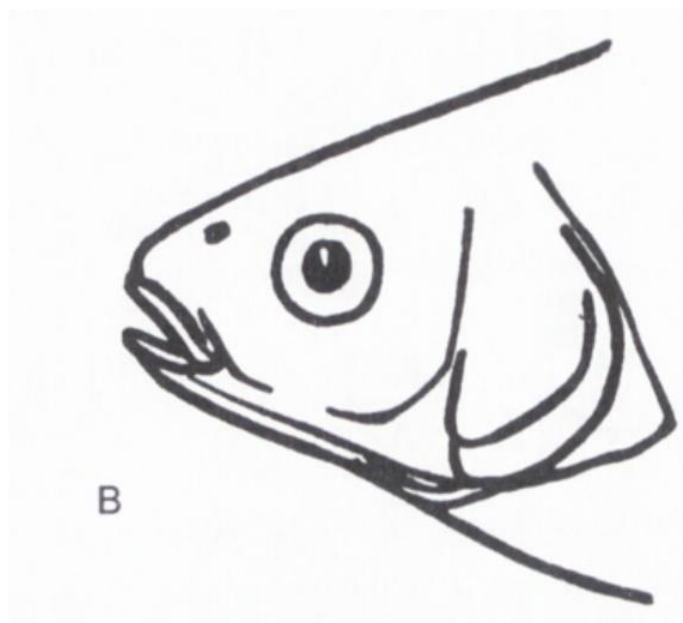
Ryby jsou na příjem potravy adaptovány různými tvary a druhy úst. A to ústy horními, koncovými nebo spodními (Kapoor et al., 1975).

---

### 3.3.1 Druhy úst ryb

#### - Koncová ústa

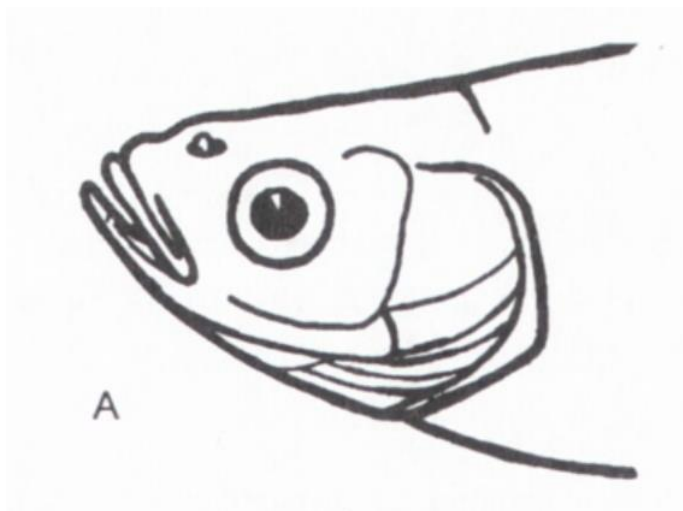
Ryby s tímto typem úst jsou nejběžnější. Obývají střední vrstvu vodního sloupce a preferují příjem potravy, která se vznáší ve vodním prostředí (Dubský et al., 2003).



Obrázek 1. Koncová ústa (Dubský et al., 2003).

#### - Horní ústa

Ryby vybavené horními ústy jsou specializované na příjem potravy z vodní hladiny (Dubský et al., 2003).

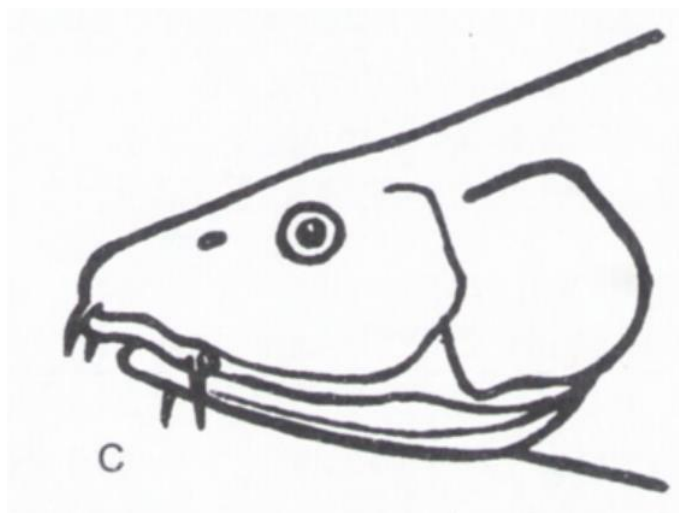


Obrázek 2. Horní ústa (Dubský et al., 2003).

---

## - Spodní ústa

Ryby se spodními ústy jsou plně adaptovány na život u dna a příjem potravy ze dna. Tyto ryby bývají uzpůsobené pro převrácení dna a vyhledávání potravy jak na dně, tak i v něm (Dubský et al., 2003).



Obrázek 3. Spodní ústa (Dubský et al., 2003).

## 3.4 Žaludek ryb

Žaludek je dutý orgán vakovitého tvaru. Žaludek není ovšem přítomen u všech druhů ryb. Žaludek přímo navazuje na jícn, poznávacími znaky jsou vyústění trávicích a jiných žláz. Tvarově je žaludek u ryb velmi rozmanitý, nejčastěji však trubicovitý. Na žaludku popisujeme tři části: vstupní část, tělo a distální oddíl žaludku. Tělo žaludku může vybíhat ve slepé vaky nebo pylorické přívěsky. Žaludek je od střeva oddělen vrátníkem (Castro et al., 1961).

Ryby bez žaludku jsou z čeledí Cyprinidae, Cobitidae a Gobiidae. U těchto čeledí se střevo napojuje přímo na jícn. Střevo je u těchto druhů v proximální části rozšířeno v žaludeční rozšířeninu. Žaludeční rozšířenina neprodukuje kyselinu chlorovodíkovou ani pepsin, jelikož nedisponuje žlázami pro tvorbu těchto látek. Trávení u těchto čeledí probíhá v lehce zásaditém až neutrálním prostředí (Harder, 1975).

---

### 3.5 Střevo ryb

Střevo je u ryb bez žaludku stejné jako u ryb s žaludkem. Navazuje na žaludeční rozšířeninu nebo žaludek. V anatomické stavbě tenkého a tlustého střeva nejsou téměř žádné rozdíly. Proximální část je více využívána a je pro nás více zajímavá. V přední části do ní ústí žlučový vývod. Tato část může být též vybavena pylorickými přívěsky, které zvětšují povrch těla a prodlužují dobu průchodu potravy (Fischer a Seeseman, 1963).

---

## 4 Cíl práce

Cílem předložené práce je vyhodnotit prevalenci a druhové zastoupení kryptosporidií u volně žijících sladkovodních ryb v České republice a sladkovodních ryb chovaných v zájmových chovech. Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp detekovaných kryptosporidií. Pomocí experimentální infekce ověřit infektivitu druhu *C. parvum* pro vybrané druhy ryb, u kterých byl tento druh kryptosporidie v minulosti detekován.

---

## 5 Materiál a metody

### 5.1 Oocysty *Cryptosporidium parvum*

Pro experimentální účely byly použity oocysty *C. parvum* izolát WERU získaný z experimentálně infikovaných SCID myši a udržovaný v Laboratoři lékařské a veterinární protistologie, Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i. Původní izolát byl získán z přirozeně infikovaného člověka.

### 5.2 Experimentální zvířata

Pro ověření infekivity druhu *C. parvum* byly použity štiky obecné a karasové zlatí. Ryby pocházely z malého rybářství Ryby Duda a před každým pokusem byly řádně otestovány na případnou kontaminaci kryptosporidii.

### 5.3 Volně žijící a zájmově chované ryby

Pro účely práce byly odebírány vzorky trusu volně žijících a zájmově chovaných ryb. Volně chované ryby pocházely z jižních a západních Čech, byly odlovené v rybnících, nádržích a řekách (Tabulka 1, Obrázek 4) a chované v rámci akvaristických obchodů.

Z ryb odlovených ve volné přírodě byl trus získán po vyvrhnutí ryby přímo z distální části střeva. Odběr vzorku byl proveden jednorázovou špachtlí a sterilní sadou pitevních nástrojů. Vzorek byl umístěn do 1,7 ml sterilní mikrozkušavky a uchováván bez fixace v chladu při 4–8 °C až do doby dalšího zpracování, ne však déle než 1 měsíc.

V akvaristikách a v zájmových chovech byl odebírán sediment / trus z chovných nádrží (Tabulka 2). K odběru byla používána skleněná fajfka, která byla před každým novým odběrem omyta pod tekoucí vodou a vysterilizována UV zářením. Obraný sediment byl shromažďován ve sterilních zkumavkách o objemu 50 ml a uchováván bez fixace v chladu při 4–8 °C až do doby dalšího zpracování, ne však déle než 1 měsíc. Před odběrem sedimentu pro další molekulární metody byly vzorky centrifugovány při 1 500 g po dobu 20 minut. Po odstranění supernatantu byl použit sediment pro izolaci genomové DNA (gDNA).

**Tabulka 1.** Seznam lokalit odchyťů volně žijících ryb, počet odchycených ryb a jejich druh.

<b>NÁZEV LOKALITY (SOUŘADNICE)</b>	<b>POČET VZORKŮ</b>	<b>DRUH RYB (VĚDECKÉ JMÉNO)</b>
<b>CEHNICKÝ RYBNÍK</b> (49.22832, 14.02238)	32	Cejn velký ( <i>Abramis brama</i> ) Perlín ostrobřichý ( <i>Scardinius erythrophthalmus</i> ) Plotice obecná ( <i>Rutilus rutilus</i> ) Kapr obecný ( <i>Cyprinus carpio</i> ) Střevlička východní ( <i>Pseudorasbora parva</i> )
<b>DRAHOTÍNSKÝ RYBNÍK</b> (49.80939, 13.44959)	2	Okoun říční ( <i>Perca fluviatilis</i> )
<b>KAMENNÝ MALÍKOV</b> (49.20583, 15.12058)	28	Candát obecný ( <i>Sander lucioperca</i> ) Ježdík obecný ( <i>Gymnocephalus cernua</i> ) Karas stříbřitý ( <i>Carassius gibelio</i> ) Lín obecný ( <i>Tinca tinca</i> ) Okoun říční ( <i>Perca fluviatilis</i> ) Perlín ostrobřichý ( <i>Scardinius erythrophthalmus</i> ) Plotice obecná ( <i>Rutilus rutilus</i> )
<b>LIPNO</b> (48.68498, 14.09148)	10	Cejnek malý ( <i>Abramis bjoerkna</i> ) Okoun říční ( <i>Perca fluviatilis</i> ) Plotice obecná ( <i>Rutilus rutilus</i> )
<b>MARKOVEC U ŽIŽKY</b> (49.24581, 14.06392)	38	Cejn velký ( <i>Abramis brama</i> ) Kapr obecný ( <i>Cyprinus carpio</i> ) Perlín ostrobřichý ( <i>Scardinius erythrophthalmus</i> ) Plotice obecná ( <i>Rutilus rutilus</i> ) Střevlička východní ( <i>Pseudorasbora parva</i> )
<b>POLŽICKÝ RYBNÍK</b> (49.53916, 12.88257)	139	Cejn velký ( <i>Abramis brama</i> ) Karas stříbřitý ( <i>Carassius gibelio</i> ) Lín obecný ( <i>Tinca tinca</i> ) Okoun říční ( <i>Perca fluviatilis</i> ) Perlín ostrobřichý ( <i>Scardinius erythrophthalmus</i> )
<b>ÚBOČ</b> (49.43764, 13.08686)	32	Jelec tloušť ( <i>Squalius cephalus</i> ) Kapr obecný ( <i>Cyprinus carpio</i> ) Okoun říční ( <i>Perca fluviatilis</i> ) Lín obecný ( <i>Tinca tinca</i> ) Ouklej obecná ( <i>Alburnus alburnus</i> ) Plotice obecná ( <i>Rutilus rutilus</i> ) Štika obecná ( <i>Esox lucius</i> )
<b>VLTAVA</b> (48.97657, 14.46667)	2	Podoustev říční ( <i>Vimba vimba</i> )

---

## 5.4 Charakteristika jednotlivých přírodních lokalit

**Cehnický rybník:** Je rybník využívaný pro chov kapra obecného. Rybník se nachází mezi poli přibližně uprostřed rybniční soustavy.

**Drahotín:** Rybník v majetku města Plzně nacházející se u obce Drůzdová. Rybník o výměře 10 ha byl v minulosti používán jako dočišťovací rybník. Dnes je využíván pro produkci kapra a jako rekreační.

**Kamenný Malíkov:** Tento rybník je spíše menší výměry, typu polní, s menší hloubkou vody. Využíván převážně pro chov rybích násad.

**Vodní dílo Lipno:** Velká nádrž na řece Vltavě v jejím horním povodí. Osídlení na březích poměrně značné. Velké vytížení jako rekreační plocha.

**Markovec u Žižky:** Tento rybník je v užívání Rybářství Protivín, je to předposlední rybník v rybniční soustavě. Rybník je spíše typu polního, na jeho březích se nachází úzké pásy stromů.

**Polžický rybník:** Tento rybník se nachází uprostřed polí nad vesnicí Polžice. Kontaminace vod může být maximálně z přilehlých polností, ovšem neznáme jejich konkrétní typ obhospodařování.

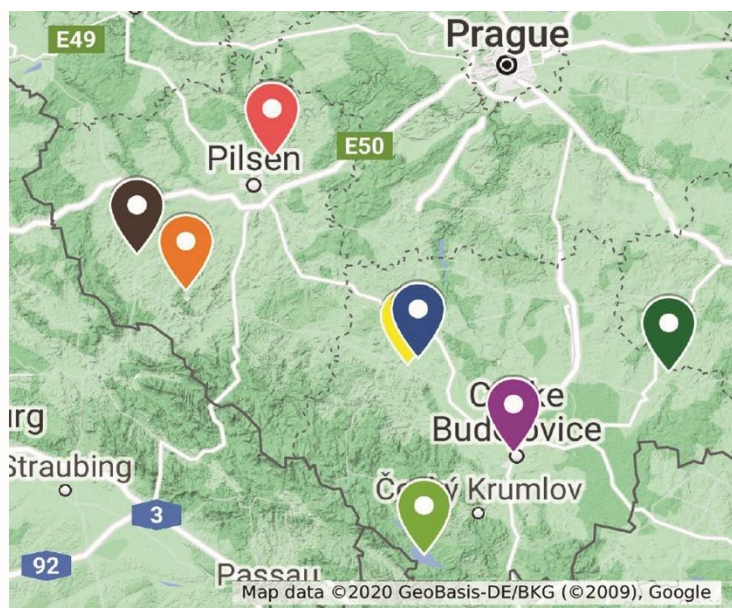
**Úbočský rybník:** Je rybník využívaný pro běžnou rybářskou praxi a nachází se na okraji vesnice Úboč. Obsádka rybníka spíše hospodářská se zaměřením na ušlechtilé ryby.

**Řeka Vltava:** Jedna z nejdelších řek v České republice. Vzorkované ryby byly odebrány na území Českých Budějovic.



**Loality odběrů:**

- Drahotfiský rybník
- Cehnický rybník
- Kamenný Malíkov
- Lipno
- Markovec u Žižky
- Polžický rybník
- Úbočský rybník
- Vltava



**Obrázek 4.** Mapka s vyznačenými místy odběru z volné přírody. Jednotlivé lokality odpovídají lokalitám z tabulky 1.

**Tabulka 2.** Seznam zájmových chovů a akvaristik, počet a druh vyšetřených ryb

<i>Prodejna</i>	<i>Vyšetřená nádrž</i>	<i>Druh ryb (vědecký název)</i>
<i>Akva centrum České Budějovice</i>	1	Tetra měděná ( <i>Hasemania nana</i> ) Přisavka thajská ( <i>Gyrinocheilus aymonieri</i> )
	2	Štíhlotělka stříkavá ( <i>Copella arnoldi</i> ) Tetra peruánská ( <i>Hyphessobrycon peruvianus</i> )
	3	Skalára amazonská ( <i>Pterophyllum scalare</i> )
	4	Bojovnice pestrá ( <i>Betta splendens</i> )
	5	Anténovec pruhovaný ( <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> ) Parmička červenoocasá ( <i>Labeo bicolor</i> )
	6	Arowana dvojvousá ( <i>Osteoglossum biciffrhosum</i> ) Parmička Denisonova ( <i>Sahyadria denisonii</i> ) Nožovec bronejský ( <i>Chitala lopis</i> )
	7	Tetra měděná ( <i>Hasemania nana</i> ) Plata pestrá ( <i>Xiphophorus variatus</i> )
	8	Plata pestrá ( <i>Xiphophorus variatus</i> )
	9	Perleťovka brazilská ( <i>Geophagus brasiliensis</i> ) Okounovec malošupinatý ( <i>Datnoides microlepis</i> )
	10	Hadohlavec neútočný ( <i>Channa Marulius</i> ) Sumec jaguáří ( <i>Liosomakodas oncinus</i> )
	11	Skalára amazonská ( <i>Pterophyllum scalare</i> )

<i>Pet centrum IGY České Budějovice</i>	12	Čichavec šedý ( <i>Trichopodus trichopterus</i> )
	13	Čichavec perleťový ( <i>Trichopodus leeri</i> ) Živorodka duhová ( <i>Poecilia reticulata</i> )
<i>Pet centrum Mercury České Budějovice</i>	14	Čichavec šedý ( <i>Trichopodus trichopterus</i> ) Čichavec perleťový ( <i>Trichopodus leeri</i> ) Čichavec modrý ( <i>Trichopodus trichopterus sumatranus</i> )
	15	Tetra krvavá ( <i>Hyphessobrycon eques</i> )
	16	Karas zlatý ( <i>Carassius auratus</i> )
	17	Živorodka duhová ( <i>Poecilia reticulata</i> )
<i>Ryby Duda Bavorov</i>	18	Karas zlatý ( <i>Carassius auratus</i> )
<i>Super zoo Gečko České Budějovice</i>	19	Parmoun širokopruhý ( <i>Crossocheilus siamensis</i> ) Živorodka ostrotlamá ( <i>Poecilia sphenops</i> )
	20	Karas zlatý ( <i>Carassius auratus</i> )
	21	Živorodka duhová ( <i>Poecilia reticulata</i> )
	22	Tetra fantomová ( <i>Hyphessobrycon megalopterus</i> ) Tetra černá ( <i>Gymnocorymbus ternetzi</i> )
	23	Plata pestrá ( <i>Xiphophorus variatus</i> ) Čichavec šedý ( <i>Trichopodus trichopterus</i> ) Čichavec perleťový ( <i>Trichopodus leeri</i> ) Čichavec medový ( <i>Trichogaster chuna</i> )
		24
<i>Super zoo Mercury České Budějovice</i>	25	Kančík zelenooký ( <i>Cryptoheros sajica</i> )
	26	Tetra konžská ( <i>Phenacogrammus interruptus</i> ) Tetra krvavá ( <i>Hyphessobrycon callistus</i> )
		27
	28	Cichlida Papouščí ( <i>Parrot cichlid</i> )
	29	Karas zlatý ( <i>Carassius auratus</i> )
	30	Tlamovec Demanonův ( <i>Pseudotropheus demasoni</i> )
	31	Duhovka Boesemanova ( <i>Melanotaenia boesemani</i> )
<i>Super Zoo Tesco Plzeň</i>	32	Neonka obecná ( <i>Paracheirodon innesi</i> )
<i>Zoo Čech Plzeň</i>	33	Kapr obecný ( <i>Cyprinus carpio</i> )
	34	Karas zlatý ( <i>Carassius auratus</i> )
	35	Kapr obecný ( <i>Cyprinus carpio</i> ) Neonka obecná ( <i>Paracheirodon innesi</i> )
	36	Tetra červenoústá ( <i>Hemigrammus rhodostomus</i> ) Pancéřníček Sterbův ( <i>Corydoras sterbai</i> )
		37
	39	
		<i>Zverimex Jednota České Budějovice</i>
41	Živorodka duhová ( <i>Poecilia reticulata</i> )	

---

## 5.5 Charakteristiky jednotlivých zájmových chovů a akvaristik

**Akva Centrum (České Budějovice):** Specializovaná prodejna akvariálních ryb. Prodejna pouze s rybami, velké množství jak našich, tak exotických rybiček.

**Pet centrum IGY (České Budějovice):** Tato prodejna disponuje menším výběrem zvířat.

**Pet centrum Mercury (České Budějovice):** Oproti zverimexu v IGY disponuje obchod větším výběrem zvířat, a to jak ryb (i jezírkové druhy), tak ptáků, savců a plazů.

**Ryby Duda (Bavorov):** Jedná se hlavně o chov jezírkových a okrasných druhů ryb. Z tohoto rybářství jsme měli pokusné ryby. Specializují se pouze na ryby.

**Super Zoo (Plzeň):** Velký obchod s domácími mazlíčky, jak rybičky, tak ostatní drobná zvířata.

**Super Zoo (Plzeň):** Velký obchod s domácími mazlíčky. Prodej rybiček a ostatních drobných savců a ptáků.

**Super Zoo Gěčko (České Budějovice):** Větší prodejna, která je velice přehledná. Mimo rybiček ovšem nabízející i jiná domácí zvířata.

**Super Zoo Mercury (České Budějovice):** Zverimex nacházející se v obchodním domě. Prodejna nabízející nejen rybičky, ale i jiná drobná domácí zvířata.

**Zoo Čech (Plzeň):** Drobná prodejna soukromého prodejce. Prodávají zde jak akvariální rybičky, tak jiné živočichy včetně ptáků a hlodavců.

**Zoo Čech (Plzeň):** Drobná prodejna soukromého prodejce. Prodávají zde jak akvariální rybičky, tak jiné živočichy včetně ptáků a hlodavců.

**Zverimex Jednota (České Budějovice):** Nenápadný podnik, který se zaměřuje především na krmiva pro zvířata. Nicméně disponuje i základními druhy akvariálních rybiček.

## 5.6 Design pokusů

U všech ryb zařazených do pokusů bylo před započítáním pokusu provedeno pět kontrolních vyšetření trusu ve dvoudenních intervalech na přítomnost specifické DNA kryptosporidií.

---

### 5.6.1 Pokus 1 – Vnímavost štiky obecné k infekci *Cryptosporidium parvum*

Pro účely experimentu bylo použito pět štik obecných o velikosti 30 cm. Každá štika byla umístěna do sterilního akvária o objemu 50–200 l. Teplota vody byla udržována v rozmezí 18–20 °C a nasycenost kyslíku se pohyboval kolem 95 %. Na začátku pokusu byly čtyři štiky inokulovány pomocí nakažené rybičky, které byla vpravena infekční dávka *C. parvum* ( $1 \times 10^6$  do dutiny břišní). Jako potravní ryba byla zvolena střevlička východní (*Pseudorasbora parva*). Potravní ryby byly před pokusem zkontrolovány metodou PCR. Jedna štika, které byla podána střevlička východní bez *C. parvum* infekce, sloužila jako kontrolní skupina. Po dobu 14 dnů byly denně odebírány exkrementy ze dna akvárií a ze získaných vzorků byla izolována gDNA a nátěr sedimentu byl barven metodou dle Miláčka a Vítovce (1985) na přítomnost oocyst kryptosporidií. Všechny štiky byly každý den krmeny rybičkami, které byly bez kryptosporidií. Po ukončení pokusu byly všechny ryby usmrceny, byl získán zažívací trakt pomocí sad sterilních pitevních nástrojů. Vzorky jícnu, žaludku, tenkého střeva, tlustého střeva a konečníku byly použity pro izolaci gDNA a histologické vyšetření. V souběhu s tímto pokusem byla infikována laboratorní myš infekční dávkou  $1 \times 10^6$  *C. parvum* pro ověření infekčnosti podávané kryptosporidie.

### 5.6.2 Pokus 2 – Vnímavost karase obecného (*Carrasius auratus*) k infekci *Cryptosporidium parvum*

V tomto pokusu byl sledován vliv různých prostředí na přítomnost parazitů v rybě. Experiment probíhal souběžně v 5 akváriích o objemu 4 l, do kterých byly umístěny tři kusy karase zlatého o velikosti 3–5 cm. Teplota vody v nádržích byla udržována v rozmezí 18–20 °C a nasycení kyslíku bylo 85–95 %. V akváriu č. 1 byly umístěny tři ryby, které sloužily jako kontrolní skupina. Do akvária č. 2 byly umístěny tři ryby a do vody byly přidány oocysty *C. parvum* v koncentraci  $1 \times 10^7$  / l vody. Po dobu celého pokusu nebyla voda v tomto akváriu měněna. Do akvária č. 3 byly přidány tři kusy ryb, z nichž každá byla před zařazením do pokusu inokulována jícnovou sondou oocystami *C. parvum* v dávce  $1 \times 10^6$ . Po dobu celého pokusu nebyla voda v akváriu č. 3 měněna. Akvárium č. 4 bylo identické s akváriem č. 2 s rozdílem výměny vody každých 24 hodin. Do vyměněné vody nebyly oocysty kryptosporidií přidávány. Akvárium č. 5 bylo identické s č. 3 s rozdílem výměny vody každých 24 hodin. Celý pokus probíhal po dobu 10 dnů. Přítomnost specifické DNA *C. parvum* byla ve všech akváriích sledována pomocí PCR. U akváriích č. 4 a 5 byly sediment a oocysty ve

---

vyměňované vodě koncentrovány centrifugací 20 minut při 1500 g. V akváriích č. 2 a 3, kde se voda neměnila, byl sediment a oocysty ve vodě koncentrovány až na konci pokusu. Získaný sediment byl použit k izolaci gDNA a pro detekci oocyst kryptosporidií pomocí specifického barvení (Miláček a Vítovec 1989). Ve všech sedimentech byla provedena detekce specifické DNA kryptosporidií. Po ukončení pokusu byly všechny ryby usmrceny, byl získán zaživací trakt pomocí sad sterilních pitevních nástrojů. Vzorky jícnu, žaludku, tenkého střeva, tlustého střeva a konečníku byly použity pro izolaci gDNA a histologické vyšetření. V souběhu s tímto pokusem byla infikována laboratorní myš infekční dávkou *C. parvum* pro ověření infekčnosti podávaného inokula.

## **5.7 Barvení oocyst (Miláček a Vítovec 1989)**

### **Materiál**

- roztok anilin-karbol-methyl-violeti (0,6 g methylvioleti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml ethanolu, 70 ml deionizované vody)
- 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině sírové
- 2% roztok kyseliny sírové

### **Postup**

Vzorek trusu/sedimentu byl nanesen na podložní sklíčko, zafixován methanolem v plameni. Vzorek byl vložen na dobu 30 minut do roztoku anilin-karbol-methyl-violeti. Po barvení byl vzorek opláchnut pod tekoucí vodou a následně diferencován v 2% kyselině sírové po dobu 2 minut. Po diferenciaci byl vzorek opláchnut pod tekoucí vodou a dobarven tartrazinem po dobu 1–2 minut. Vzorek byl opětovně opláchnut pod tekoucí vodou a usušen při laboratorní teplotě. Vzorky byly vyšetřovány na přítomnost oocyst kryptosporidií světelným mikroskopem při zvětšení 1000× při využití imerzního oleje.

## **5.8 Izolace DNA**

DNA byla izolována pomocí dvou různých sad. První sada byla pro izolaci veškeré DNA z exkrementu. Druhá sada se používala na izolaci DNA z tělní tkáně.

---

### 5.8.1 Izolace pomocí GeneAll® Exgame™ Stool DNA mini

#### Materiál

- FL pufr
- EB pufr
- PB pufr
- NW pufr

#### Postup

- Vzorek trusu nebo sediment z akvárií o přibližné hmotnosti 200 mg byl umístěn do Safe-Lock Tube, ke vzorku byly přidány zirkonové kuličky o velikosti 0,5 mm, skleněné kuličky o velikosti 0,1 mm a 1 ml FL pufru.
- Vzorek byl následně homogenizován pomocí přístroje FastPrep (ref) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
- Po homogenizaci byl vzorek inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl vzorek centrifugován při 16 000 g po dobu 5 minut.
- Veškerý supernatant byl přepipetován na EzPass kolonu.
- Kolonka byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g a odpad ze sběrné kolonky byl odstraněn.
- Na kolonku bylo napipetováno 100 µl EB pufru, kolonka se nechala inkubovat 1 min při laboratorní teplotě a poté byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g.
- Kolonka byla odstraněna a do sběrné zkumavky bylo připipetováno 500 µl PB pufru.
- Veškerý obsah byl přepipetován na mini spin column.
- Mini spin column byla následně centrifugována 1 minutu při 16 000 g. Sběrná zkumavka byla vyprázdněna.
- Na mini spin column bylo napipetováno 500 µl NW pufru.
- Mini spin column byla následně centrifugována 1 minutu při 16 000 g. A znovu byl vylit odpad ze sběrné zkumavky.
- Opakovala se centrifugace mini spin column a to 1 minutu při 16 000 g. Z mini spin column byla přenesena horní kolonka na čistou eppendorfku.
- Na kolonku bylo napipetováno 200 µl EB pufru a byla inkubována 1 minutu. Potom byl vzorek centrifugován po dobu 1 minuty při 16 000 g.

---

## 5.8.2 Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit

### Materiál

- ATL pufr
- Proteináza K
- AL pufr
- 96% EtOH
- AW1 pufr
- AW2 pufr
- AE pufr

### Postup

- Do mikrozkušavky bylo vloženo přibližně 10 mg tkáně, malé skleněné kuličky a jedna velká skleněná kulička.
- Ke vzorku bylo připipetováno 200  $\mu$ l ALT pufru a vzorek byl zvortexován.
- Následně byl vzorek homogenizován pomocí přístroje FastPrep (ref) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
- Vzorek byl centrifugován po dobu 10 s a při 16 000 g.
- Ke vzorku bylo přidáno 20  $\mu$ l proteinase K.
- Vzorek byl inkubován po dobu jedné hodiny při 56 °C za pravidelného míchání.
- Po inkubaci byl vzorek centrifugován po dobu 10 s a při 16 000 g.
- Ke vzorku bylo přidáno 200  $\mu$ l AL pufru a pak byl promíchán pomocí vortexu.
- Potom bylo do mikrozkušavky přidáno 200  $\mu$ l 96% EtOH a vše bylo promícháno pomocí vortexu.
- Zkušavka byla centrifugována 10 s při rychlosti 6 000 g.
- Ze zkušavky byl veškerý supernatant přepipetován na Mini spin column a centrifugován po dobu jedné minuty při rychlosti 8 000 g. Po centrifugaci byl vylit odpad.
- Na kolonku bylo připipetováno 500  $\mu$ l AW1 pufru.
- Kolonka byla centrifugována 1 minutu při 8 000 g.
- Ze zkušavky byl odstraněn odpad.
- Bylo připipetováno 500  $\mu$ l AW2 pufru a centrifugováno 1 min při 13 400 g.

- 
- Sběrná zkumavka byla vylita a následovala opět centrifugace 1 minutu při 13 400 g.
  - Sběrná zkumavka byla vyhozena a nahrazena novou čistou mikrozskumavkou. Přímo na kolonku bylo napipetováno 200 µl AE pufru a inkubováno 1 minutu při laboratorní teplotě.
  - Vzorek byl centrifugován jednu minutu při 8 000 g.

### 5.8.3 Molekulární analýza

#### Materiál

- DNA
- Primery
  - **Primární reakce – nasedací teplota 50 °C**  
F1 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'  
R1 5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'
  - **Sekundární reakce – nasedací teplota 55 °C**  
F2 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'  
R2 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCCA-3'
- PCR H<sub>2</sub>O
- 2× AmpONE™ HS-Tag premix (GeneAll Biotechnology, co., Ltd., Soul, Jižní Korea)

#### Postup

- Vyizolovaná DNA byla použita pro amplifikaci genů kódujících malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA; Jiang et al., 2005)
- Pro primární i sekundární PCR reakci byl namíchán mastermix, který byl posléze rozpipetován do mikrozskumavek, do kterých byla přidána vyizolovaná DNA z vyšetřovaných vzorků. Vše vortexováno, centrifugováno a vloženo do cycleru na příslušnou teplotu.
- Celkový objem jednotlivých reakčních směsí činil pro primární i sekundární PCR reakci 20 µl (18 µl mastermix + 2 µl DNA). V každé reakci byla využita negativní kontrola (PCR voda) a pozitivní kontrola.



---

## 5.9 Gelová elektroforéza

### Materiál

- 50× TAE pufr (Tris báze 242 g; ledová kyselina octová 47,1 ml; 0,5 M EDTA 100 ml; pH 8,00)
- Agarosa (Biotech, Česká republika)
- Ethidium bromid (10 mg / ml, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 100 bp DNA velikostní marker (Fermentas International Inc., Kanada)

### Postup:

Byl připraven 1% agarózový gel smícháním agarózy s TAE pufrém. Agaróza byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě. Gel byl ochlazen pod tekoucí vodou na přibližně 50 °C. Do agarózového gelu byl přidán 1 µl ethidium bromidu a pečlivě zhomogenizován. Agarózový gel byl nalit do nosiče s hřebeny dle počtu analyzovaných vzorků. Po ztuhnutí gelu byl nosič s gelem umístěn do elektroforetické vany a do jednotlivých jamek byly napipetovány vzorky a velikostní marker. Gel byl vyvíjen při napětí 90 V po dobu nutnou pro rozdělení fragmentů (cca 45 minut). Přítomnost očekávaného fragmentu DNA byla vizualizována pomocí UV transiluminátoru.

## 5.10 Izolace PCR fragmentu z gelu

Produkty gelové elektroforézy byly vyizolovány pomocí komerčního kitu Gen Elute (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) podle níže uvedeného postupu.

### Materiál

1,5 ml mikrozumavky, Binding kolonka G, Gel Solubilization Solution, PCR voda, Column Preparation Solution, isopropanol, Wash Solution G.

### Postup

- Vyříznutý fragment gelu s DNA pomocí čistého skalpelu byl vložen do nové 1,7 ml eppendorfky.
- Do eppendorfky s fragmentem bylo přidáno 500 µl Gel Solubilization Solutionu.
- Vzorek byl inkubován při 50 °C 10 minut. Každé 2 až 3 minuty byl vzorek promícháván.
- Do inkubátoru byla vložena eppendorfka s PCR vodou, zahřívána na 65 °C pro pozdější eluci.

- 
- Byly sestaveny kolonky Binding Columng G a do nich bylo napipetováno 500  $\mu$ l Column Preparation Solution.
  - Kolonky Binding Columng G byly centrifugovány 1 minutu při 16 000 g.
  - Ke vzorku s DNA bylo po rozpuštění připipetováno 150  $\mu$ l isopropanolu a vzorek byl promíchán.
  - Na kolonku Binding Columng G byl převeden celý obsah vzorku.
  - Kolonka byla centrifugována 1 minuty při 16 000 g.
  - Ze sběrné zkumavky byl vylit odpad.
  - Na kolonku Binding Columng G bylo napipetováno 700  $\mu$ l Wash solution G.
  - Kolonka byla centrifugována 1 minuty při 16 000 g.
  - Kolonka byla otočena o 180° a znovu centrifugována 3 minuty na 16 000 g
  - Do sterilní 1,7 ml eppendorfky byla vložena kolonka a byla provedena eluce napipetováním 30  $\mu$ l PCR vody přehřáté na 65 °C a po 1 minutové inkubaci při laboratorní teplotě centrifugována 1 minutu při 16 000 g.

### **5.11 Sekvence DNA**

Sekvenování sekundárních PCR produktů bylo provedeno za pomoci ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů v komerčních firmách (SeqMe, Dobříš, Česká republika a Eurofins, Praha, Česká republika).

### **5.12 Odběr tkání pro histologické vyšetření**

Po ukončení experimentů byly z každého zvířete odebrány vzorky jícnu, žaludku a proximální, centrální a distální střevo. Každý vzorek byl odebrán pomocí sady sterilních pitevních nástrojů. Vzorky byl uchována ve 4% formaldehydu a následně zpracovány histologickými metodami.

### **5.13 Příprava histologických preparátů**

Pro přípravu histologických preparátů byly použity následující chemikálie:

- 1. vzestupná alkoholová odvodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; aceton; xylen)
- parafinová řada (4 následné roztoky parafinu, 1:3, 1:1, 3:1, 100 % parafin)
- alkoholová sestupná řada, odparafinovací řada (xylen; alkohol 96%, alkohol 80%, alkohol 70%; dH<sub>2</sub>O)

- 
- 2. vzestupná odvodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; karboxylen; xylen)
  - kanadský balzám

#### Pracovní postup

- Vzorky tkání byly odvoděny v 1. vzestupné řadě, po 60 minutách byl vyměněn roztok. V posledním roztoku byly vzorky ponechány 90 minut.
- Vzorky byly prosyceny parafinem po dobu 2–4 hodiny v parafinu I a 4–6 hodin v parafinu II, 8–12 hodin v parafinu III, 8–12 hodin ve 100% parafinu).
- Vzorky byly zality do čistého parafinu a vytvořeny bločky. Byly zhotoveny 5  $\mu\text{m}$  silné histologické řezy a připraveny preparáty na podložní sklíčko, kde byly na plotně o teplotě 42 °C ponechány po dobu 24 hodin.
- Preparáty byly odparafinovány alkoholovou sestupnou zavodňovací řadou vždy po 5 minutách.
- Vzorky byly nabarveny (5.14) a po barvení bylo pokračováno v odvodňování 2. alkoholovou vzestupnou řadou vždy po 5 minutách. V karboxylenu a xyleny byly vzorky ponechány 1 minutu.
- Vzorky byly zamontovány do kanadského balzámu a ponechány k sušení při teplotě 37 °C.
- Vzorky byly prohlíženy mikroskopem (Olympus IX70) při zvětšení 100–400 $\times$ .

#### **5.14 Barvení histologických řezů periodic acid shiff (PAS)**

Pro barvení periodic acid shiff byly použity tyto chemikálie: Schiffovo reagens (100 ml H<sub>2</sub>O, 1 g basický fuchsin, 10 ml 1N kyselina chlorovodíková, 1 g pyrosiřičitan draselný, 0,5 g aktivního uhlí); siřičitá voda (5 ml 1N kyseliny chlorovodíkové, 0,5 g pyrosiřičitan draselný, 100 ml destilované H<sub>2</sub>O); roztok kyseliny jodisté (0,8 g ve 100 ml destilované H<sub>2</sub>O); hematoxylin; 96% alkohol; butylalkohol; xylen

#### Postup

- Byly připraveny odparafinované řezy.
- Řezy byly vloženy do roztoku kyseliny jodisté na 10 minut.
- Řezy byly oplachovány po dobu 10 minut pod tekoucí vodou.
- Dále byly řezy barveny v Schiffově reagens na 30 minut.
- Následně byl řezy oplachovány po dobu 5 minut v lázni siřičité vody.

- 
- Dále byl řez oplachován po dobu 15 minut pod tekoucí vodou.
  - Řezy byly ponořeny do hematoxylinu na dobu 1–2 minuty.
  - Nakonec byly řezy opláchnuty v 96% alkoholu, butylalkoholu a xylenu.

### **Montování nabarvených řezů**

Postup:

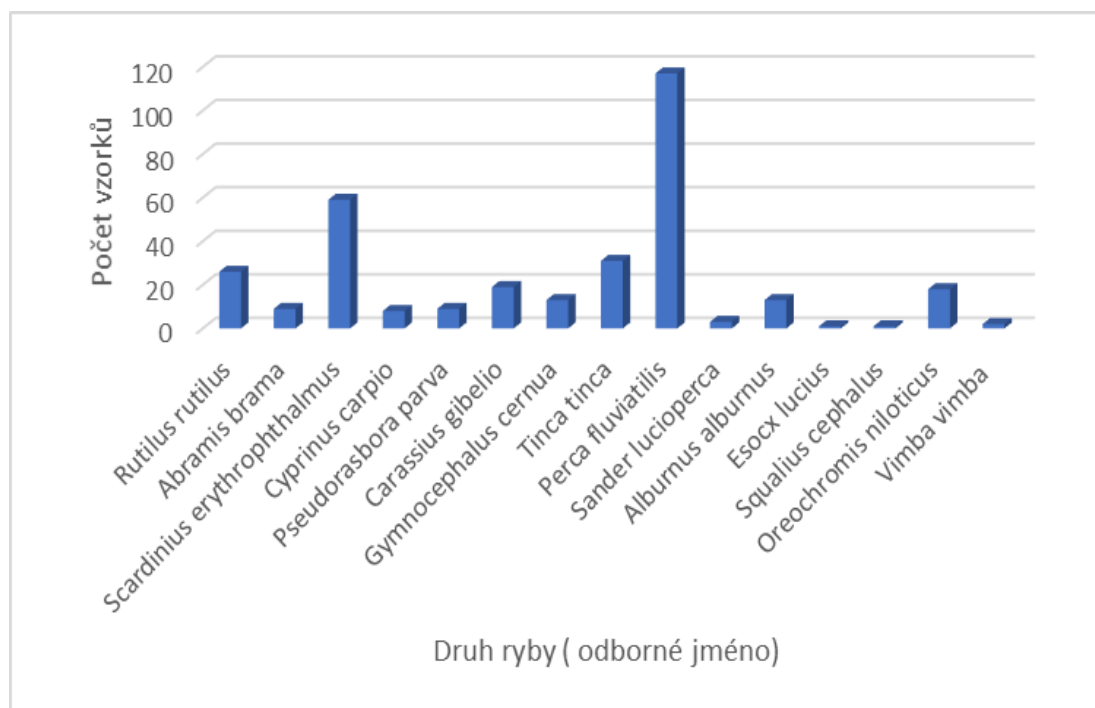
- Na preparát na podložním skle byla kápnuta kapka kanadského balzámu.
- Krycí sklíčko byl položeno tak, aby se nevytvořily vzduchové bubliny.
- Případné bublinky byly vytlačit mírným tlakem na krycí sklíčko.
- Hotový preparát byl vložen do termostatu (37 °C) - zaschnutí montovací media.

## 6 Výsledky

V rámci této práce bylo mikroskopicky a molekulárně vyšetřeno 238 obsahů střev volně žijících sladkovodních ryb z osmi lokalit v Plzeňském a Jihočeském kraji a dále 41 směsných vzorků sedimentů pocházejících z akvárií v osmi různých prodejnách akvaristických a chovatelských potřeb.

### 6.1 Výskyt kryptosporidií u volně žijících ryb

Odběry vzorků probíhaly v letech 2019 a 2020. Mikroskopické vyšetření obsahu kaudální části zažívacího traktu 283 volně žijících ryb (Graf 1.) odlovených na osmi lokalitách (Tabulka 1, Obrázek 4) pomocí specifického barvení anilin-karbol-metyl violetí neprokázalo přítomnost oocyst kryptosporidií v žádném z vyšetřovaných vzorků. Taktéž nebyla ve vyšetřovaných vzorcích detekována žádná specifická DNA kryptosporidií.



**Graf 1.** Druhy a počet volně žijících zařazených do sledování

### 6.2 Výskyt kryptosporidií u akvarijských ryb

V akvarijských chovech/prodejnách jsme odebrali 41 směsných vzorků od 42 druhů ryb. Odběry vzorků probíhaly v letech 2019 a 2020. Pro detekci oocyst kryptospo-

ridií jsme použili specifické barvení a PCR analýza. Pomocí specifického barvení nebyly detekovány žádné oocysty ve vyšetřovaných vzorcích. Molekulární analýzy, při níž byla amplifikována část genu kódující malou podjednotku rRNA kryptosporidií, prokázaly přítomnost specifické DNA v 9 z 41 vyšetřených nádrží. Přehled detekovaných druhů kryptosporidií v jednotlivých nádržích je uveden v tabulce 3.

**Tabulka 3.** Druhy kryptosporidií detekované ve směsných vzorcích trusu získaných z akvárií s akvarijními rybami v různých zoo prodejnách.

<b>Prodejna (město)</b>	<b>Vyšetřená nádrž</b>	<b><i>Cryptosporidium</i> spp.</b>
Pet centrum IGY (České Budějovice)	13	<i>Cryptosporidium muris</i>
Pet centrum Mercury (České Budějovice)	15	<i>Cryptosporidium tyzzeri</i>
Pet centrum Mercury (České Budějovice)	17	<i>Cryptosporidium tyzzeri</i>
Super zoo Gečko (České Budějovice)	20	<i>Cryptosporidium parvum</i>
Super zoo Gečko (České Budějovice)	21	<i>Cryptosporidium baileyi</i>
Super zoo Gečko (České Budějovice)	22	<i>Cryptosporidium avium</i>
Super zoo Mercury (České Budějovice)	27	<i>Cryptosporidium muris</i>
Super zoo Mercury (České Budějovice)	29	<i>Cryptosporidium tyzzeri</i>
Super Zoo Tesco (Plzeň)	32	<i>Cryptosporidium varanii</i>

### **6.3 Infektivita *Cryptosporidium parvum* pro štiky obecné**

Na základě provedeného experimentu jsme prokázali, že oocysty *C. parvum* použité jako inokulum, respektive specifická DNA byla vyloučena spolu s trusem do vodního prostředí akvária, kde byly štiky chovány. Specifická DNA *C. parvum* byla v akváriích detekována od druhého dne po nakrmení štik až do konce experimentu (14 dní). Molekulární a histologické vyšetření tkání inokulovaných štik druhem *C. parvum* neprokázalo přítomnost specifické DNA vývojových stádií. U jedné ze tří štik byla detekována specifická DNA kryptosporidií v obsahu střeva, nicméně histologické vyšetření neprokázalo přítomnost vývojových stádií *C. parvum*.

---

#### **6.4 Výskyt *Cryptosporidium parvum* u karase zlatého v závislosti na kontaminaci prostředí**

Mikroskopické a molekulární vyšetření sedimentu z akvária č. 1, kde byly umístěny kontrolní ryby, neprokázalo přítomnost oocyst nebo specifické DNA kryptosporidií. Také histologické a molekulární vyšetření tkání ryb z této skupiny po ukončení experimentu neprokázalo přítomnost vývojových stádií a specifické DNA kryptosporidií v žádné z vyšetřovaných tkání. U skupiny č. 2 a 3, kde nebyla v průběhu experimentu měněna voda, byla na konci experimentu detekována specifická DNA kryptosporidií jak v sedimentu získaného z akvárií, tak i v obsahu trávicí trubice. Naopak histologické vyšetření tkání neprokázalo přítomnost vývojových stádií. U skupiny č. 4 a 5, kde byly voda měněna každých 24 hodin, byly oocysty, kryptosporidií ve vodě detekovány u skupiny č. 4 do druhého dne a u skupiny č. 5 do čtvrtého dne. Specifická DNA *C. parvum* byla ve vodě u skupiny č. 4 detekována ještě třetí den experimentu a u skupiny č. 5 šestý den experimentu. Histologické a molekulární vyšetření tkání ryb ze skupin č. 4 a 5 neprokázalo přítomnost vývojových stádií a specifické DNA po ukončení experimentu.

---

## 7 Diskuze

Na základě výsledků prací publikovaných v posledních letech se ukazuje, že diverzita kryptosporidií parazitujících u ryb je výrazně vyšší než se dříve předpokládalo (Zahedi et al., 2021) a pravděpodobně se bude blížit diverzitě, kterou v současné době známe u savců a ptáků (Ježková et al., 2021). Do současné doby bylo u ryb popsáno pět druhů a desítky genotypů kryptosporidií, u kterých je možné na základě molekulárních dat předpokládat, že se jedná o samostatné druhy a jejich popis bude s velkou pravděpodobností dokončen v příštích letech (Couso-Pérez et al., 2018; Hoover et al., 1981; Zahedi et al., 2021).

Zajímavostí je, že existuje výrazná disproporce ve výskytu kryptosporidií mezi sladkovodními a slanovodními rybami. Jedním z důvodů může být fakt, že zatímco výzkumy na slánovodních rybách jsou poměrně časté (Alvarez-Pellitero et al., 2002; Certad et al., 2019; Sitjà-Bobadilla et al., 2003, 2005, 2006), počet publikací zabývajících se kryptosporidiiemi u sladkovodních ryb je nízký (Certad et al. 2019; Couso-Pérez et al., 2019; Reid et al. 2010).

Shodně s výsledky práce Reid et al. (2010) jsme v námi vyšetřených volně žijících sladkovodních rybách nedetekovali přítomnost oocyst nebo specifické DNA kryptosporidií. V dalších studiích zaměřených na kryptosporidiové infekce u sladkovodních ryb byla detekována nejen velmi nízká promořenost, ale i diverzita. V desítkách vyšetřených volně žijících sladkovodních rybách odchycených v řekách a jezerech ve Francii a Španělsku bylo detekováno pouze *Cryptosporidium molnari*-like genotyp, *C. molnari* a *C. parvum* (Certad et al., 2019; Couso-Pérez et al., 2019). Procento pozitivních ryb se pohybovalo do 10 %. S ohledem na stabilní teplotní a samozřejmě vlhkostní podmínky vodních toků a nádrží, by měly oocysty kryptosporidií ve vodním prostředí zůstat velmi dlouho infekce schopné (Alum et al., 2014; Fayer a Nerad, 1996; Peng et al., 2008). Důvody, nízkého počtu infikovaných ryb v populaci nejsou známi. Nicméně obdobně je tomu i u vodních savců. U ondatery, bobrů nebo nutrií by bylo s ohledem na nejčastější přenos kryptosporidií prostřednictvím vody možné předpokládat vyšší promořenost, ale opak je pravdou. V dosud provedených studiích se promořenost těchto vodních savců nejčastěji pohybovala okolo 10 % a méně (Meireles et al., 2007; Paziewska et al., 2007; Zhou et al., 2004). Tedy obdobně jako u ryb.



---

Podle dnešních znalostí víme, že většina druhů a genotypů savčích a ptačích kryptosporidií má úzkou hostitelskou specifitu. Výjimkami jsou *C. parvum*, druh schopný parazitovat u většiny savců a několika ptáků, *C. ubiquitum*, druh parazitující u celé řady drobných savců, kopytníků i člověka, *C. meleagridis*, druh infikující savce i ptáky a *C. baileyi*, druh infikující ptáky napříč téměř všemi řády (Hofmannová et al. 2016; Kotková et al., 2016; Kváč et al., 2014; Laatumna et al., 2017).

Přítomnost oocyst nebo DNA kryptosporidií v netypickém/nеспецифickém hostiteli je často zapříčiněn kontaminací prostředí. Přítomnost *C. parvum*, *C. hominis*, *C. scrofarum*, *C. bovis*, *C. xiaoi* nebo *Cryptosporidium* rat genotyp III v rybách v dřívějších studiích lze přikládat spíše kontaminaci vody než probíhající infekci (Pignata et al., 2019; Reid et al., 2010). Druh *C. hominis* je výlučně lidským patogenem, který je spolu *C. parvum* zodpovědný za více než 90 % všech lidských infekcí na celém světě. Z důvodů velkého množství infikovaných hostitelů je do prostředí celosvětově vylučováno obrovské množství oocyst. Toto potvrzují i studie, ve kterých byly detekovány kryptosporidie v povrchových vodách (Hamilton et al., 2018; Nasser, 2016). Právě druhy *C. parvum* a *C. hominis* jsou nejčastěji detekovány v povrchových vodách (Pignata et al., 2019). Přestože nelze infektivitu *C. scrofarum* a *C. xiaoi* pro ryby bez správně provedeného experimentu stoprocentně vyloučit, je pravděpodobnější, že stejně jako v předešlých případech se jedná o kontaminaci ryb z prostředí. Jak *C. scrofarum*, tak *C. xiaoi* jsou druhy s úzkým hostitelským spektrem (Fayer et al., 2009; Kváč et al., 2013).

Obdobně se stavíme k nálezům *C. muris*, *C. tyzzeri*, *C. avium*, *C. varanii* nebo *C. parvum* u akvariálních ryb v této práci. Výsledky Morine et al. (2012), kteří detekovali u akvariálních ryb *Cryptosporidium* rat genotype III, a výsledky našeho experimentu vysvětlují ojedinělé nálezy savčích, ptačích a plazích kryptosporidií u ryb. Všechny uvedené druhy kryptosporidií jsou primárními patogeny hlodavců, ptáků nebo plazů. Výskyt těchto druhů u akvariálních ryb přikládáme kontaminaci vody akvárií z pracovních pomůcek nebo rukou obchodníků, kteří ve svých obchodech kromě ryb prodávají i další zájmová zvířata, která jsou hostitelé těchto kryptosporidií. Dřívější studie ukázaly, že zájmoví hlodavci, ptáci a plazi v zoo buticích jsou často parazitováni hostitelsky specifickými kryptosporidii (Deng et al., 2020; Iijima et al., 2018; Lv et al., 2009; Zhang et al., 2020). Tyto nálezy jsou ekvivalentní nálezům *C. muris* u plazů a dravých ptáků (Crawshaw a Mehren, 1987; Graczyk et al.,

---

1996; Graczyk a Cranfield, 1998; Ng et al., 2006; Upton, 1990; Xiao et al., 2004). Přítomnost této, na hlodavce adaptované, kryptosporidie v trusu hadů a ptáků byla zapříčiněno krmením těchto zvířat myši s kryptosporidiovou infekcí. V momentě, kdy přirozeně infikované myši přestaly být zkrmovány, došlo k vymizení infekce i u zmíněných hostitelů (Xiao et al., 2004). Obdobně bylo prokázáno, že druhy *C. muris* a *C. tyzzeri*, které se běžně vyskytují u divokých myši a potkanů nejsou infekční pro prasata (Feng et al., 2011; Kváč et al., 2012; Ren et al., 2012) přestože specifická DNA těchto kryptosporidií byla ojediněle detekována v trusu prasat a relativně hojně v jímkách na kejdu (Chen a Huang, 2007; Kváč et al., 2009; Xiao et al., 2006). Oocysty *C. parvum* přidávané do akvárií s chovanými rybami v této studii bylo možné detekovat ještě po několikeré výměně vody. Současně s detekcí oocyst a DNA kryptosporidií ve vodě byla specifická DNA kryptosporidií detekována v zažívacím traktu chovaných ryb, aniž by došlo k detekci vývojových stádií (tato práce). K obdobnému závěru dospěli ve svém experimentu Freire-Santos et al. (1998), kteří neprokázali infektivitu *C. parvum* pro pstruhy. Také dřívější práce Graczyk et al. (1996, 1998) a Green et al. (2003) podporují výsledky o neinfekčnosti *C. parvum* pro ryby. Naopak Couso-Peréz et al. (2018) ve své práci tvrdí, že druh *C. parvum* je infekční pro pstruhy duhové. V práci publikované těmito autory byla detekována specifická DNA *C. parvum* v zažívacím traktu sedmi ryb. Na podporu své teorie provedli také přímý průkaz přítomnosti oocyst kryptosporidií v pylorických přívěscích pomocí imunofluorescenčního barvení. Vzhledem k tomu, že nebyl proveden přímý průkaz průběhu infekce na epitelu sliznice, přítomnost oocysty *C. parvum* v zažívacím traktu pstruhů lze přičítat i mechanické pasáži tak, jak jsme zjistili v naší práci. Navíc autoři uvádějí, že ve vodě, ve které byli pstruzi chováni, detekovali i cysty *G. intestinalis*. S ohledem na fakt, že *G. intestinalis* není pro ryby infekční je zřejmé, že voda v sádkách byla kontaminována fekálním znečištěním obsahující cysty giardií (El Kettani et al., 2006). Není tedy vyloučeno, že tato fekální kontaminace mohla obsahovat i oocysty kryptosporidií, která se vyskytují velmi často u stejné věkové skupiny hospodářských zvířat (Björkman et al., 2003).

---

## 8 Závěry

Výsledky této práce neprokázaly přítomnost kryptosporidií specifických pro ryby u volně žijících sladkovodních ryb v České republice. Přestože ryby nejsou s největší pravděpodobností hostitelé zoonotických druhů kryptosporidií, *C. muris*, *C. tyzzeri* a *C. parvum*, mohou akvarijní ryby sloužit jako mechanický vektor těchto parazitů a jimi kontaminovaná voda představuje potenciální zdroj infekce pro člověka.

---

## 9 Seznam literatury

- Alum, A. et al. (2014). Impact of Environmental Conditions on the Survival of *Cryptosporidium* and *Giardia* on Environmental Surfaces. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014:1–7.
- Alvarez-Pellitero, P. a Sitjà-Bobadilla, A. (2002). *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal of Parasitology*, 32(8):1007–1021.
- Alvarez-Pellitero, P. et al. (2004). *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62:133–145.
- Björkman, C. et al. (2003). *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44:145–152.
- Bolland, S. et al. (2020). *Cryptosporidium bollandi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from angelfish (*Pterophyllum scalare*) and Oscar fish (*Astronotus ocellatus*). *Experimental Parasitology*, 107956.
- Carreno, R. A. et al. (1999). *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, 85:899–904.
- Castro, N. M. et al. (1961). A histological and histochemical study of the gizzard of the Mugil species *Pisces*. *Acta Anatomica*, 45:155–163.
- Certad, G. et al. (2015). Identification of *Cryptosporidium* Species in Fish from Lake Geneva (Lac Léman) in France. *PLoS One*, 10(7):e0133047.
- Certad, G. et al. (2019). Prevalence, Molecular Identification, and Risk Factors for *Cryptosporidium* Infection in Edible Marine Fish: A Survey Across Sea Areas Surrounding France. *Frontiers in Microbiology*, 10:1–13.
- Certad, G. et al. (2020). Molecular Characterization of Novel *Cryptosporidium* Fish Genotypes in Edible Marine Fish. *Microorganisms*, 8(12):1–7.

- 
- Collins J. E. (1997). Impact of changing consumer lifestyles on the emergence/reemergence of foodborne pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4):471–479.
- Couso-Pérez, S. et al. (2018). Identification of a novel piscine *Cryptosporidium* genotype and *Cryptosporidium parvum* in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasitology Research*, 117(9):2987–2996.
- Couso-Pérez, S. et al. (2019). First Report of *Cryptosporidium molnari*-Like Genotype and *Cryptosporidium parvum* Zoonotic Subtypes (IIaA15G2R1 and IIaA18G3R1) in Brown Trout (*Salmo trutta*). *The Journal of Parasitology*, 105(1):170–179.
- Crawshaw, G. J. a Mehren K. G. (1987). Cryptosporidiosis in ZOO and wild animals. In: *Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsbericht des 29. Internationalen Symposiums ueber die Erkrankungen der Zootiere*, Cardiff. Akademie-Verlag, Berlin, pp. 353–362.
- Čítek, J. et al. (1998). *Rybníkářství*. 2. aktualiz. vyd. Praha: Informatorium. ISBN isbn80-86073-26-2.
- Darriba, D. et al. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8):772.
- Deng, L. et al. (2020). Occurrence and genetic characteristics of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in pet red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in China. *Scientific Reports*, 10(1):1026.
- Díaz, P. et al. (2018). *Cryptosporidium* species in post-weaned and adult sheep and goats from N.W. Spain: Public and animal health significance. *Veterinary Parasitology*, 254:1–5.
- Drábek, J. a Dubanský, V. (2003). *Zdravotní problematika prasat*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. ISBN isbn80-7305-460-4.
- Dubský, K. et al. (2003). *Obecné rybářství*. Praha: Informatorium. ISBN 80-7333-019-9
- Dvořák, P. (2014). *Anatomie a fyziologie ryb*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. ISBN 978-80-87437-80-3.

- 
- El Kettani, S. et al. (2006). Prévalence de *Giardia intestinalis* chez une population rurale utilisant les eaux usées à des fins agricoles à Settât, Maroc [Prevalence of *Giardia intestinalis* in a farming population using sewage water in agriculture, Settât, Morocco]. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 36(6):322–328.
- Elwakil, H. S. a Hewedi, I. H. (2010). Pathogenic potential of blastocystis hominis in laboratory mice. *Parasitology Research*, 107:685–689.
- FAO (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. ISBN 978-92-5-130562-1
- Fayer, R. a Nerad, T. (1996). Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocyst. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4):1431–1433.
- Fayer R. a Xiao L. (Eds.) (2007). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, New York, pp. 560.
- Fayer, R. a Santín, M. (2009). *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, 164(2-4):192–200.
- Fayer, R. et al. (1997). The general biology of *Cryptosporidium* in *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In: CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 530.
- Feng, Y. et al. (2011). Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Experimental Parasitology*, 127:238–242.
- Fischer, H. a Seesemann, E. (1961). Die Strukturprinzipien der Wand des Katzen-darmes im Vergleich mit dem Darm des Menschen. *Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch*, 102:257–263.
- Fischer, T. (2007). *Ryby*. Ilustroval Marion WIECZOREK. Plzeň: Fraus. Co-jak-proč. ISBN 978-80-7238-496-9.
- Follet, J. et al. (2011). *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France: molecular characterization of species in a longitudinal study. *Veterinary Research*, 42(1):116
- Freire-Santos, F. et al. (1998). *Cryptosporidium parvum*: an attempt at experimental infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Parasitology*, 84:935–938.

- 
- Gatei, W. et al. (2007). Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infection Genetics and Evolution*, 7(2):197–205.
- Graczyk, T. K. et al. (2007). Risk of handling as a route of exposure to infectious waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts via Atlantic blue crabs (*Callinectes sapidus*). *Applied Environmental Microbiology*, 73(12):4069–4070.
- Graczyk, T. K. a Cranfield, M. R. (1998). Experimental transmission of *Cryptosporidium oocyst* isolates from mammals, birds, and reptiles to captive snakes. *Veterinary Research*, 29:187–195.
- Graczyk, T. K. et al. (1996). *Cryptosporidium parvum* is not transmissible to fish, amphibians, or reptiles. *Journal of Parasitology*, 82:748–751.
- Graczyk, T. K. et al. (1998). Multiple *Cryptosporidium serpentis* oocyst isolates from captive snakes are not transmissible to amphibians. *Journal of Parasitology*, 84:1298–1300.
- Green, S. L. et al. (2003). Cryptosporidiosis associated with emaciation and proliferative gastritis in a laboratory-reared South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comparative Medicine*, 53:81–88.
- Hamilton, K. A. et al. (2018). *Cryptosporidium* and *Giardia* in Wastewater and Surface Water Environments. *Journal of Environment Quality*, 47:1006–1023.
- Hanel, L. (1998). *Ryby*. Praha: Albatros. Svět zvířat (Albatros). ISBN 80-00-00599-9.
- Harder, W. (1975a). *Anatomy of Fishes Part I: Text*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Germany, 612 pp. ISBN 978-3-510-65067-5
- Hofmannová, L. et al. (2016). *Cryptosporidium erinacei* and *C. parvum* in a group of overwintering hedgehogs. *European Journal of Protistology*, 56:15–20.
- Hoover, D. M. et al. (1981). Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus* Bloch Schneider. *Journal of Fish Diseases*, 4:425–428
- Chen, F. a Huang, K. (2007). Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* in pigs in eastern China. *Zoonoses Public Health*, 54:393–400.

- 
- Iijima, Y. et al. (2018). Molecular Prevalence of *Cryptosporidium* spp. among Companion Birds Kept in Pet Shops in Japan. *Korean Journal of Parasitology*, 56(3):281–285.
- Ježková, J. et al. (2021). *Cryptosporidium ratti* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in the Czech Republic. *Parasitology*, 148(1):84–97.
- Jiang, J. et al. (2005). Detection of High-Affinity and Sliding Clamp Modes for MSH2-MSH6 by Single-Molecule Unzipping Force Analysis. *Molecular Cell*, 20(5):771–781.
- Jíra, J. (2009). *Lékařská protozoologie: protozoální nemoci*. Praha: Galén. ISBN isbn978-80-7262-381-5.
- Kapoor, B. G. et al. (1975). The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advence in Marine Biology*, 13:109–239
- Koinari, M. et al. (2013). Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in fish from Papua New Guinea. *Veterinary Parasitology*, 198(1-2):1–9.
- Kotková, M. et al. (2016). *Cryptosporidium ubiquitum*, *C. muris* and *Cryptosporidium* deer genotype in wild cervids and caprines in the Czech Republic. *Folia Parasitologica*, 63:2016.003.
- Kváč, M. et al. (2009). Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 160(3-4):319–322.
- Kváč, M. et al. (2013). *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology*, 191(3-4):218–227.
- Laatamna, E. A. et al. (2017). *Cryptosporidium meleagridis* and *C. baileyi* (Apicomplexa) in domestic and wild birds in Algeria. *Folia Parasitologica*, 64:18.
- Lv, C. et al. (2009). *Cryptosporidium* spp. in Wild, Laboratory, and Pet Rodents in China: Prevalence and Molecular Characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24):7692–7699.



- 
- Meireles, M. V. et al. (2007). Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 147(1-2):166–170.
- Miláček, P. a Vítovec, J. 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.
- Morgan, U. M. et al. (2002). *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(6):433–440.
- Morine, M. et al. (2012). Additional novel *Cryptosporidium* genotypes in ornamental fishes. *Veterinary Parasitology*, 190(3-4), 578–582.
- Nasser, A. M. (2016). Removal of *Cryptosporidium* by wastewater treatment processes: A review. *Journal of Water and Health*, 14(1):1–13.
- Němejc, K. et al. (2013). Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitology Research*, 112(3):1143–1154.
- Ng, J. et al. (2006). Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:7548–7553.
- Palenzuela, O. et al. (2010). Molecular Characterization of *Cryptosporidium molnari* Reveals a Distinct Piscine Clade. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22):7646–7649.
- Paziewska, A. et al. (2007). Distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in selected species of protected and game mammals from north-eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 14:265–270.
- Peng, X. et al. (2011). The Fate and Transport of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in the Soil. *Principles, Application and Assessment in Soil Science*. Pignata, C. et al. (2019). E. *Cryptosporidium* Oocyst Contamination in Drinking Water: A Case Study in Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11):2055.

- 
- Pignata, C. et al. (2019). E. *Cryptosporidium* Oocyst Contamination in Drinking Water: A Case Study in Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11):2055.
- Reid, A. et al. (2010). Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in marine fish. *Veterinary Parasitology*, 168(3-4):190–195.
- Ren, X. et al. (2012). *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, 130:274–281.
- Roček, Z. (2002). *Historie obratlovců: evoluce, fylogeneze, systém*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0858-6.
- Ryan, U. et al. (2015). *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*, 150:31–35.
- Sitjà-Bobadilla, A. a Alvarez-Pellitero, P. (2003). Experimental transmission of *Cryptosporidium molnari* (Apicomplexa: Coccidia) to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Parasitology Research*, 91(3):209–214.
- Sitjà-Bobadilla, A. et al. (2005). Epidemiology of *Cryptosporidium molnari* in Spanish gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cultures: from hatchery to market size. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(1):131–139.
- Sitjà-Bobadilla, A. et al. (2006). Interactions between bacteria and *Cryptosporidium molnari* in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under farm and laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, 142(3-4):248–259.
- Tyzzer 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., (1990). *Cryptosporidium* spp. in lower vertebrates. In: Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. (Eds.), *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 149–156.
- Vetterling, J. et al. (1971). *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *The Journal of Protozoology*, 18:243–247.

- 
- Xiao, L. et al. (2004). Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:891–899.
- Xiao, L. et al. (2006). Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:4461–4463.
- Yang, R. et al. (2015). Molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in cats (*Felis catus*) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, 155:13–18.
- Yang, R. et al. (2016). Molecular characterisation of a disseminated *Cryptosporidium* infection in a Koi carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Parasitology*, 226:53–56.
- Zahedi, A. et al. (2021). *Cryptosporidium abrahamseni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidii) from red-eye tetra (*Moenkhausia sanctaefilomenae*). *Experimental Parasitology*, 223:108089.
- Zanguee, N. et al (2010). Identification of novel *Cryptosporidium* species in aquarium fish. *Veterinary Parasitology*, 174(1-2):43–48.
- Zhang, H. et al. (2020). Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in pet snakes in Beijing, China. *Parasitology Research*, 119(9):3119–3123.
- Zhang, W. et al. (2013). Prevalence and Genetic Characterizations of *Cryptosporidium* spp. in Pre-Weaned and Post-Weaned Piglets in Heilongjiang Province, China. *PLoS ONE*, 8(7):e67564.
- Zhao, W. et al. (2019). *Cryptosporidium* spp. in wild rats (*Rattus* spp.) from the Hainan Province, China: Molecular detection, species/genotype identification and implications for public health. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9:317–321.
- Zhou, L. et al. (2004). Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:7574–7577.

---

## 10 Seznam tabulek

Tabulka 1. Seznam lokalit odchyťů volně žijících ryb, počet odchycených ryb a jejich druh.....	23
Tabulka 2. Seznam zájmových chovů a akvaristik, počet a druh vyšetřených ryb....	25
Tabulka 3. Druhy kryptosporidií detekované ve směsných vzorcích trusu získaných z akvárií s akvariijními rybami v různých zoo prodejnách. ....	38

---

## 11 Seznam obrázků

Obrázek 1. Koncová ústa (Dubský et al., 2003). .....	18
Obrázek 2. Horní ústa (Dubský et al., 2003). .....	18
Obrázek 3. Spodní ústa (Dubský et al., 2003). .....	19
Obrázek 4. Mapka s vyznačenými místy odběru z volné přírody. Jednotlivé lokality odpovídají lokalitám z tabulky 1. ....	25

---

## **12 Seznam grafů**

Graf 1. Druhy a počet volně žijících zařazených do sledování.....	37
---	----