

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA v Českých  
Budějovicích**

Zemědělská fakulta

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Bakalářská práce:

**Diverzita kryptosporidií  
vybraných druhů letounů  
(Chiroptera)**

**Vypracovala:** Anna Hořická

**Vedoucí bakalářské práce:** doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Fakulta zemědělská  
Akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Anna HOŘICKÁ**  
Osobní číslo: **Z13406**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Zootechnika**  
Název tématu: **Diverzita kryptosporidií vybraných druhů letounů**  
Zadávající katedra: **Katedra zootechnických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření jednobuněční paraziti infikující všechny třídy obratlovců. V současné době je velmi málo známo o diverzitě, fylogenezi a biologii těchto parazitů infikujících netopýrovité a vrápence.


Cílem práce je vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikujících netopýrovité a vrápence. Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp kryptosporidií. V případě silných infekcí popsat morfologii a morfometrii oocyst. Na vybraných lokalitách v České republice sbírat vzorky trusu volně žijících zvířat. Pomocí standardních parazitologických metod a specifických barvicích metod diagnostikovat exogenní vývojová stádia kryptosporidií v trusu vyšetřovaných jedinců. Analýzou obrazu popsat morfologii a velikost oocyst nalezených druhů a genotypů. U pozitivních vzorků určit druh a genotyp kryptosporidií pomocí PCR, PCR-RFLP a sekvenování. Využít fylogenetické postupy k určení fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií. Datové soubory zpracovat příslušnými statistickými metodami. Vyhodnotit získaná data o prevalenci a výskytu. Zhodnotit hostitelskou specifitu a zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů.

Rozsah grafických prací: 2 - 3 tabulky, 2 - 3 grafy  
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická  
Seznam odborné literatury:


Dubey JP, Hamir AN, Sonn RJ, and Topper MJ (1998) Cryptosporidiosis in a bat (*Eptesicus fuscus*). *J Parasitol* 84, 622-3.  
Fayer R., Xiao L. (Eds.) 2007. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis second edition*. CRC Press, Boca Raton  
Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. (2004) *Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health*. *Clin Microbiol Rev.* 17, 72-97.  
Ziegler PE, Wade SE, Schaaf SL, Stern DA, Nadeski CA, Mohammed HO. (2007) *Prevalence of Cryptosporidium species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State*. *Vet Parasitol* 147, 176-84.

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.  
Katedra zootechnických věd

Datum zadání bakalářské práce: 30. března 2015  
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2015

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13 ①  
370 05 České Budějovice

  
doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 30. března 2015

+++++

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: „**Diverzita kryptosporidií vybraných druhů letounů (Chiroptera)**“ vypracovala na základě vlastních zjištění, poznatků a materiálů uvedených v seznamu literatury.

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

**V Českých Budějovicích dne: 19.04.2015**

.....  
Anna Hořická

Ráda bych poděkovala celé Laboratoři veterinární a medicínské protistologie za odborné vedení, užitečné rady a trpělivost při zpracování mé bakalářské práce, a to především doc. Ing. Martinovi Kváčovi, Ph.D. a RNDr. Daně Květoňové. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Michalovi Andreasovi, Ph.D.; Ing. Pavlovi Bendovi, Ph.D.; Mgr. Lence Florkové; Danielovi Horáčkovi; Mgr. Josefovi Hotovému; RNDr. Antonínovi Reiterovi, Ph.D.; doc. RNDr. Zdeňkovi Řehákovi, Ph.D.; RNDr. Jiřímu Šafářovi a Magdě Timplové za pomoc a odborné rady při odběru vzorků pro parazitologické vyšetření. Nechtěla bych opomenout poděkování mé rodině za pomoc, a to jak materiální, tak psychickou.

**Abstrakt:**

Vzorky pro parazitologické vyšetření byly odebrány na 27 lokalitách po celé České republice. Byl sledován výskyt a prevalence kryptosporidií infikujících letouny. Celkem bylo odebráno a pomocí molekulárních metod vyšetřeno 262 vzorků. Byl vyhodnocen zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů. Molekulární metody prokázaly přítomnost specifické DNA kryptosporidií u třech netopýrů hvízdavých (*Pipistrellus pipistrellus*). V jednom případě bylo detekováno *C. parvum*, ve dvou případech pak nový genotyp nazvaný *Cryptosporidium* bat genotype III.

**Klíčová slova:** *Cryptosporidium*; Rhinolophidae; Vespertilionidae; PCR; SSU; aktin

**Summary:**

Total 262 samples of different Chiropterans originating from 27 localities in the Czech Republic were collected. Occurrence and prevalence of *Cryptosporidium* infection in bats were screened using staining method and molecular tools. While no *Cryptosporidium* oocyst was detected by microscopy, PCR analyses revealed presence of three positive specimens from three common pipistrelle (*Pipistrellus pipistrellus*). Zoonotic *C. parvum* was detected in one case and novel *Cryptosporidium* bat genotype III was found in other two samples.

**Key words:** *Cryptosporidium*; Rhinolophidae; Vespertilionidae; PCR; SSU; actin

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce .....	10
3	Literární přehled .....	11
3.1	Historie.....	11
3.2	Taxonomie kryptosporidií.....	12
3.3	Vývojový cyklus kryptosporidií.....	13
3.4	Přenos a průběh infekce .....	15
3.5	Diagnostika .....	16
3.6	Obecná charakteristika řádu letouni (Chiroptera).....	17
3.7	Druhy a genotypy kryptosporidií infikující letouny.....	18
4	Materiál a metodika .....	19
4.1	Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření .....	19
4.2	Barvení trusu dle Miláčka a Vítovce (1985).....	20
4.3	Izolace DNA .....	21
4.4	Molekulární detekce kryptosporidií .....	23
4.4.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
4.4.2	Gelová elektroforéza .....	24
4.4.3	Izolace z gelu .....	25
4.4.4	Sekvenace vzorků .....	26
4.4.5	Fylogenetická analýza.....	26
5	Výsledky .....	27
5.1	Výskyt a prevalence kryptosporidií netopýrovitých a vrápenců.....	27
5.2	Genotypizace kryptosporidií vrápenců a netopýrovitých .....	28
6	Diskuze .....	31
7	Závěr .....	33
8	Přehled použité literatury.....	34



# 1 Úvod

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření jednobuněční, intracelulární, paraziti infikující gastrointestinální trakt obojživelníků, plazů, ryb, ptáků a savců včetně člověka (O'Donoghue 1995). V současné době je v rámci rodu *Cryptosporidium* popsáno 27 druhů (Carreno a kol. 1999; Fayer a kol. 2000; Morgan a kol. 2000). Patogenita druhů a genotypů rodu *Cryptosporidium* se liší dle druhu, věku a odolnosti imunitního systému daného hostitele. U infikovaných jedinců mohou způsobovat průjemové onemocnění, dehydrataci a úbytek hmotnosti (Xiao a kol. 2004). Infikovaní jedinci často vylučují oocysty v trusu nepřetržitě, po celou dobu patentní periody (Jeníková a kol. 2011). Oocysty jsou velmi odolné vůči nepříznivým vlivům vnějšího prostředí a přežívají velmi dlouhou dobu. Ve vhodných podmínkách vnějšího prostředí, to znamená ve vlhké půdě, si mohou zachovat svoji infekčnost až šest měsíců (Fayer a kol. 1998).

Čeledi netopýrovití a vrápencovití patří do řádu letounů (Chiroptera). Letouni, jako jediní aktivně létající savci, mohou díky svému celosvětovému rozšíření a schopnosti překonávat velké vzdálenosti představovat potenciální zdroj zoonotických agens. Přestože letouni tvoří 20 % všech savců na světě a existuje přibližně 1 000 druhů, je v současné době známo jen velmi málo informací o kryptosporidiových infekcích této skupiny savců.

Cílem této práce je doplnit znalosti o kryptosporidiích a kryptosporidióze vybraných zástupců řádu letounů.

## **2 Cíle práce**

- Vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikující letouny.
- Za použití molekulárních metod určit druh a genotyp kryptosporidií.
- Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů.
- V případě silných infekcí popsat morfologii a morfometrii oocyst.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Historie

Kryptosporidie byly poprvé popsány Ernestem Edwardem Tyzzerem v roce 1907, který je našel a popsal jako parazita v buňkách žaludečního epitelu laboratorních myší, který byl přichycen na epitelových buňkách hostitele pomocí zvláštních organel. Tohoto parazita pojmenoval *Cryptosporidium muris*. V roce 1910 popsal *C. muris* podrobněji a navrhl *Cryptosporidium* jako nový rod a *Cryptosporidium muris* jako typový druh toho rodu. V roce 1912 popsal *C. parvum* v tenkém střevě myší s oocystami menšími než u *C. muris* (Tyzzer 1907, 1910, 1912). Tyzzerův popis nebyl po mnoho let doceněn, protože mu nebyl přikládán medicínský, ekonomický ani veterinární význam.

V roce 1929 E. E. Tyzzer popsal kryptosporidiové infekci u domácí drůbeže, které mu dle vývojových stádií připomínala *C. parvum*. Tento druh byl pojmenován *C. tyzzeri*, ale z důvodu nekompletního popisu je dnes považován za neplatný (Current a kol. 1986; Tyzzer 1929). V roce 1955 byl popsán třetí druh, a to *Cryptosporidium meleagridis* u infikovaných krůt (Slavin 1955).

Do počátku 70. let 20. století nebyla kryptosporidii věnována velká pozornost, i když dnes víme, že jsou kryptosporidie přizpůsobeny parazitickému způsobu života a parazitují u všech tříd obratlovců.

V roce 1970 se kryptosporidie staly předmětem zvýšeného zájmu. Byly spojeny s těžkými vodnatými průjmy u telat a jehňat. Léčba byla neúčinná a bylo zaznamenáno velké procento úhynu u hospodářských zvířat (Meutin a kol. 1974; Paciera a kol. 1971).

První případy lidské kryptosporidie byly popsány v roce 1976 u 3leté holčičky a 39letého imunosuprimovaného (snížená obranyschopnost organismu) pacienta. Příznaky v obou případech byly stejné; těžký vodnatý průjem, gastroenteritida (zánět trávicí soustavy). Obě infikované osoby žily na farmě, kde byl chován dobytek. Diagnostika byla provedena na základě střevní biopsie a mikroskopického vyšetření (Meisel a kol. 1976; Nime a kol. 1976). Třetím případem bylo onemocnění u 9letého chlapce, který však nepřišel do styku se zvířaty (Lasser a kol. 1979).

Postupně byly zaznamenávány případy kryptosporidióz skotu, ovcí, prasat, koní, krocánů, králíků, opic a plazů (Fayer a kol. 2008). Onemocnění tak začala být přikládána vyšší důležitost.

Další zvýšený zájem o výzkum kryptosporidií přišel s pandemií HIV. Americké Centrum pro kontrolu chorob a prevence (CDC) studií popsalo v roce 1982 vleklé průjemové onemocnění u 21 mužů trpících AIDS v 6 různých městech Spojených států (Blagburn a Current 1983).

Další zvýšený zájem o kryptosporidie nastal v roce 1993 při kontaminaci vody oocystami kryptosporidií v Milwaukee ve Wisconsinu, kde bylo nakaženo více jak 400 000 osob (MacKenzie a kol. 1994).

Počátkem 21. století, s masivním využíváním molekulárních metod bylo popsáno velké množství nových druhů a genotypů. I přes obrovský nárůst výzkumu zaměřující se na různé aspekty biologie kryptosporidií parazitujících různých obratlovců, zůstávají letouni i přes svou druhovou pestrost v pozadí zájmů. Do současné doby bylo publikováno jen velmi málo prací zabývajících se touto problematikou (kapitola 3.7).

### **3.2 Taxonomie kryptosporidií**

Druhy patřící do rodu *Cryptosporidium* jsou jednobuněční, epicelulární, eukaryotičtí paraziti. Organismy těchto prvoků mají DNA uloženou v jádře, které je obklopeno dvojitou membránou. Rod *Cryptosporidium* patří spolu s více než 300 dalšími rody do kmene Apicomplexa, který zahrnuje přibližně 4 800 pojmenovaných druhů. Tento počet však není považován za konečný. Vzhledem k příznivým předpokladům se odhaduje, že by v budoucnu mohlo být objeveno až desetinásobné množství druhů (Carreno a kol. 1999; Fayer 2007).

Kryptosporidie byly donedávna nesprávně zařazeny do mezi Eimerie do třídy Coccidea, kvůli podobnosti vývojového cyklu (Fayer a kol. 1997). Kvůli nesprávnému zařazení kryptosporidií ke třídě Coccidae jim byla přidělena striktní hostitelská specifita. V současné době je známo 27 platných druhů kryptosporidií a více než 60 genotypů lišících se od sebe nejen molekulárně, ale právě i hostitelskou specifikou (Xiao a Ryan 2014).

Morfologicky identické genotypy zahrnující izoláty z celé řady obratlovčích hostitelů jako například z jelena, fretky, kachny, lišky, husy, koně, vačnatce, opice, králíka, hada a ještěrky budou pravděpodobně v budoucnu popsány jako samostatné druhy (Fayer a Xiao 2007; Kváč a kol. 2014; Šlapeta 2013). Až na základě sekvencí malé ribozomální podjednotky DNA, byla zjištěna příbuznost kryptosporidií ke gregarinám (Carreno a kol. 1999).

Pro zařazení kryptosporidií do druhu se používá morfologie oocyst, molekulární odlišnost od ostatních známých druhů, hostitelská specifita a vývoj vývojového cyklu v hostiteli. V rámci rodu *Cryptosporidium* rozeznáváme dvě morfologicky odlišné skupiny, žaludeční a střevní. Žaludeční kryptosporidie mají afinitu k žaludečním žlázám např.: *C. andersoni*, *C. muris*, *C. galli* nebo *C. serpentis*. Střevní kryptosporidie mají afinitu k enterocytům (jednoduchá cylindrická epitelová buňka, která se nachází v tenkém a tlustém střevě) např.: *C. bovis*, *C. canis*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. suis*, *C. wrairi*, *C. meleagridis*, *C. baileyi* nebo *C. varanii* (Xiao a kol. 2004).

### 3.3 Vývojový cyklus kryptosporidií

Na základě dosavadních studií se domníváme, že vývojový cyklus rodu *Cryptosporidium* je u všech druhů stejný nebo velmi podobný a liší se jen malými odlišnostmi (Current a kol. 1986; O'Donoghue 1995). Vývojový cyklus je nejlépe popsán u *C. parvum* a *C. muris*. Infekce způsobující kryptosporidiami jsou lokalizovány především v gastrointestinálním traktu (Guselle a kol. 2003), ale mohou zasáhnout i dýchací orgány a vylučovací aparát (Goodstein a kol. 1989), játra, pankreas a žlučník (Hinnant a kol. 1989; Kahn a kol. 1987). Životní cyklus kryptosporidií je jednohostitelský. Cyklus rozdělujeme na několik po sobě navazujících fází – excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie.

K nakažení dochází fekálně-orální cestou, pozřením oocyst. U kryptosporidií se sporozoiti nezanořují do cytoplazmy, ale zůstávají uloženi intracelulárně mimo cytoplazmu, tedy epiplazmaticky (Valigurová a kol. 2008).

Excystace je první fází a začíná pozřením oocysty vhodným hostitelem. Když je oocysta v těle hostitele, tak prvním krokem k propuknutí infekce je otevření švu (sutura) oocysty. Po otevření švu oocysty se uvolní čtyři infekční sporozoiti (Fayer a

kol. 1990), kteří napadají epiteliální buňky (Valigurová a kol. 2008). Poté se sporozoiti přemění na jednojaderné trofozoity. Jejich jádra se rozdělí a dojde k nepohlavnímu rozmnožování (merogonie).

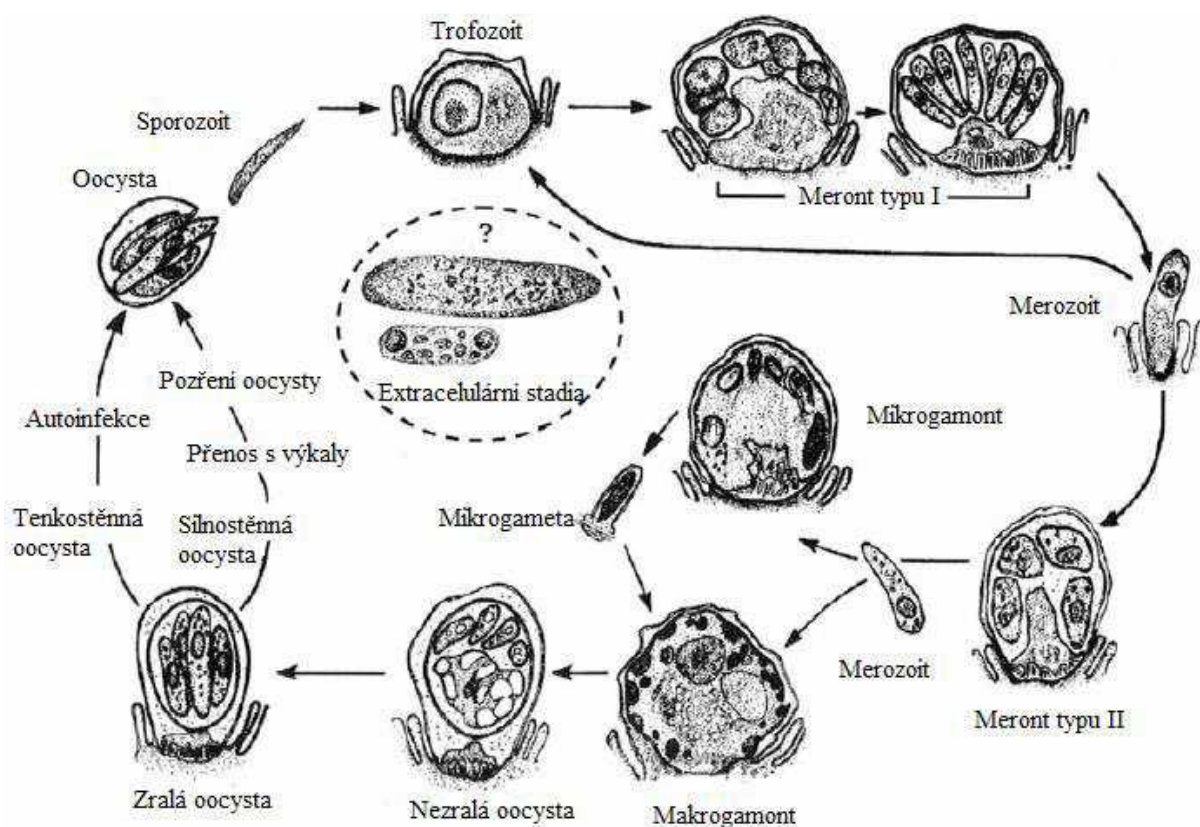
Výsledkem nepohlavního rozmnožování jsou meronti. Zatímco *C. baileyi* má tři typy merontů, tak *C. parvum* a *C. muris* má dva (Current a kol. 1986; Valigurová a kol. 2008).

Meront I. typu má šest až osm jader a ty vytváří šest až osm merozoitů. Každý zralý merozoit opustí meront a infikuje další hostitelské buňky. Z merozoita I. typu se stane meront II. typu a ten produkuje čtyři merozoity. Merozoiti z meronta II. typu napadnou nové hostitelské buňky, v kterých se transformují na pohlavní stádia a dojde u nich k pohlavnímu rozmnožování (gametogonie). V další fázi, která se nazývá gametogonie vznikají gamonti, kteří se dělí na samčí mikrogamety a samičí makrogamety. Z mikrogamet se uvolní pohyblivé mikrogamety, které oplodní makrogamety, které vznikly z makrogamontů a dochází k formování zygoty. Vzniklá zygota prochází sporogonií. Ve sporogonii se formují čtyři sporozoiti (Fayer a Ungar 1986).

Ze zygoty vznikne oocysta s jednou tetrazoickou sporocystou. Konečnou fází je zralá oocysta, která se dělí dle typu na silnostěnné a tenkostěnné. Silnostěnné oocysty, jsou schopny přežít v nepříznivých podmínkách vnějšího prostředí. Jejich vnější vrstva se skládá z kyselého glykoproteinu, střední je lipoproteinová a vnitřní je glykoproteinová. Každý ze 4 sporozoitů v oocystě má haploidní jádro s 8 chromozomy. Ty obsahují 10,1-10,4 milionů párových bází DNA s nepočetnými introny. Cytoplazma obsahuje přibližně tisíc kopií od každé ze dvou typů dvouvláknové RNA pocházející z viru čeledi Partiviridae. Oocysty opouštějí tělo hostitele nejčastěji s trusem a slouží k přenosu infekce na další hostitele. Z hostitele odchází oocysty plně infekční, toto je další rozdíl od většiny kokcií. Tenkostěnné oocysty excystují ještě v těle hostitele a jsou obklopeny pouze sérií jednotkových membrán. Tenkostěnné oocysty nejsou schopny dlouhodobě přežít ve vnějším prostředí a tak slouží k infekci dalších úseků trávicího traktu. Sporozoiti se aktivně uvolní z oocyst a velmi rychle pronikají do zatím neinfikovaných mikrokloků střeva, tomuto jevu říkáme autoinfekce (Blunt a kol. 1997; Current a Resse 1986; Widmer 1998). Všechny fáze vývojového cyklu jsou uvedeny na obrázku 1.

Až do nedávna se toho moc nevědělo o vývojovém cyklu kryptosporidií ryb. Tito paraziti byli zjištěni jak u sladkovodních, tak u mořských druhů ryb. Stádia kryptosporidií byla lokalizována v žaludku, střevech nebo obou místech (Ryan a Xiao 2014; Ryan a kol. 2015).

**Obrázek 1:** Schématické znázornění životního cyklu rodu *Cryptosporidium* (Fayer a Xiao 2007, upraveno)



### 3.4 Přenos a průběh infekce

Díky všudypřítomnosti kryptosporidií v životním prostředí a velkému počtu hostitelů je možností přenosu mnoho. Infekční stádia se přenáší buď přímým kontaktem z jedince na jedince nebo požitím kontaminované potravy nebo vody a v neposlední řadě vzdušným přenosem. Většina lidských infekcí je způsobena zoonotickým přenosem (Fayer a kol. 2000; Fayer a Xiao 2007).

Oocysty kryptosporidií jsou velmi odolné a mohou přežít různé filtrace pitné vody a chemické ošetření, jako je např. chlorování (Dolejš 2004). Z toho důvodu je možnost přenosu přes pitnou i rekreační vodu považován za jednu z nejvýznamnějších

(Bednářská a kol. 2007). Ke kontaminaci surovin pro výrobu potravin může dojít při zavlažování kontaminovanou vodou (Thurston-Enriquez a kol. 2002). Další problém je s hygienou při zpracování potravin v rozvojových zemích (Sutthikornchai a kol. 2005).

Prepatentní perioda je doba uplynulá od pozření infekčních oocyst po vyloučení oocyst do vnějšího prostředí. Délka prepatentní periody je závislá na druhu hostitele, genotypu kryptosporidie a infekční dávce (Hijjawi a kol. 2002). Prepatentní doba se pohybuje od 3 do 24 dní a inkubační doba trvá 5–7 dní (Fayer a kol. 2005). Patentní doba, doba vylučování oocyst do vnějšího prostředí, trvá nejčastěji od 1 do 20 dní, nicméně je ovlivněna různými faktory jako je imunitní stav, věk, druh hostitele, druh a genotyp kryptosporidie (Anderson 1987; Enemark a kol. 2003; Fayer a kol. 2005; Hijjawi a kol. 2002; Iseki 1979; Kváč a kol. 2007, 2013, 2014; Lindsay a kol. 2000; Masuno a kol. 2006; Matsui a kol. 2001; Pospischil a kol. 1987; Tzipori a Ward 2002).

### **3.5 Diagnostika**

V dřívějších dobách se k diagnostice kryptosporidií používala metoda biopsie střevní tkáně (Keusch a kol. 1995). Tato metoda se nejevila jako nejvhodnější, tak byla vyvinuta metoda na detekci a identifikaci oocyst přímo z trusu. Nejčastěji se používá jednoduchá metoda barvení trusu (Miláček a Vítovec 1985). Než byly vyvinuty molekulární metody, tak se používaly k detekci oocyst mikroskopická vyšetření, která zahrnovala flotaci, nátěr a barvení. Použití mikroskopu k diagnostice bylo dosti zdlouhavé a bylo zapotřebí zkušeného laboratorního pracovníka. Z důvodu, že se oocysty jednotlivých druhů kryptosporidií od sebe morfologicky signifikantně neliší, byla identifikace druhu zcela nemožná.

V současné době se k diagnostice kryptosporidií využívají především metody molekulární a imunodiagnostické. Molekulární metody jsou založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR) s následnou sekvencí PCR produktu. K imunodiagnostickým metodám se využívají komerčně vyráběné testy jako je ELISA nebo IFAT.



### 3.6 Obecná charakteristika řádu letouni (Chiroptera)

Letouni jsou skupinou evolučně dosti starobylou. O vývoji letounů neexistuje žádný konkrétní doklad. Zatím ani nevíme, do které skupiny hmyzožravců jejich předek patřil. Na základě paleontologických podkladů můžeme říci, že nejstarší známý netopýr (*Icaronycteris index*) byl nalezen v lokalitě Fossil Lake nejstaršího eocéanu formace Green River ve Wyomingu v USA. Byl již dokonalým zástupcem řádu se všemi charakteristickými znaky, nacházíme u něj i znaky, které dnešním letounům chybí. Můžeme to říci, protože *Icaronycteris index* je šťastnou náhodou jednou z nejdokonaleji zachovaných oecénních fosilií. *Icaronycteris index* byl o něco menší než náš netopýr velký (*Myotis myotis*). *Icaronycteris index* je z období před 50–55 milióny let.

Lépe jsme na tom se znalostí letounů v době středního eocéanu před 45 milióny lety. Dvě významná naleziště jsou v Německu. Dochovaly se i trávicí trakty těchto zvířat, takže můžeme určit, jaká byla jejich potrava. Specializovali se na lov motýlů a brouků. Pravděpodobně rodili dvě mláďata. Nelze zjistit zřetelnější vztahy k některému z dnešních řádů.

Před 30 milióny let se objevuje dnešní rod *Myotis*. V miocénu je pak doložena již většina ostatních rodů naší současné netopýří fauny. Z evropského oligocénu a miocénu je známo několik nálezů i v místech, kde nebyli netopýři hojní a z toho usuzujeme, že jejich výskyt byl dříve neobyčejně značný.

Skutečnost, že podstatnou část dnešní fauny tvoří rody, objevované před 20–30 milióny let, je u savců něčím zcela výjimečným (Anděra a Horáček 2005; Horáček 1986).

Řád letouni tvoří více než pětinu savcům na světě. Popsáno je přes 1 000 druhů v 18 čeledích. Většinu této čeledi tvoří savci, kteří jsou schopni aktivního letu. Končetiny jsou přeměněny v křídla, pomocí tenké a pružné kožní blány, napjaté k bokům těla, přední končetině, zadní končetině a obvykle i k ocasu. Vrápencovití na rozdíl od jiných netopýřů nejsou schopni se pohybovat po zemi a prolézat skulinami.

Letouni jsou výhradně soumravná a noční zvířata, která žijí v koloniích. V České republice žijí v koloniích matky s mláďaty. Některé druhy volí raději otevřené prostředí, jiné jen les a v současné době se několik druhů přizpůsobilo životu v blízkosti lidských obydlí. V oblastech se střídáním ročních období netopýři hibernují

v zimních úkrytech např. jeskyních, štolách a sklepích. Během hibernace sníží tělesné pochody a v naprosté ztuhlosti přežívají zimní období. Dokáží se aktivně probudit, aniž by se zvýšila teplota v okolí. Úspornost metabolismu pravděpodobně přispívá i k dlouhověkosti letounů.

Páření nastává koncem léta a z počátku podzimu. Samičky, ale zabřezávají až na jaře po zimním spánku, kdy dojde k uvolnění vajíčka, oplození a vývoji zárodku. Spermie si uchovává ve svých vejcovodech po celou dobu zimního spánku v aktivní formě.

Echolokaci využívají k lapání drobného létajícího hmyzu a jiných bezobratlých, některé druhy dokážou lovit ryby, měkkýše, sát krev, ale tahové druhy u nás nežijí. Netopýři vydávají ultrazvukové výkřiky a při letu se orientují dle jejich ozvěny a při lovu kořisti se též orientují podle odrazu zvukových vln. Takto získávají podrobnou prostorovou informaci a dokáží rozlišit i nejrůznější detaily sebedrobnější kořisti. Většinu echolokačních signálů nejsme schopni slyšet, k rozluštění těchto signálů jsou zapotřebí detektory ultrazvuku.

Do podřádu kaloňů patří největší létající savci, živící se pylem a nektarem z ovoce (Anděra a Horáček 2005; Clutton – Brocková 2005; Dungel a Gaisler 2002).

### **3.7 Druhy a genotypy kryptosporidií infikující letouny**

O infekcích kryptosporidií u letounů toho zatím víme jen velmi málo. Do současné doby byly na toto téma provedeny pouze čtyři studie. Kryptosporidie byly zjištěny u *Eptesicus funus* (netopýr hnědý) v Oregonu v USA (Dubey a kol. 1998). *Cryptosporidium* sp. bylo nalezeno u *Myotis adversus* v Austrálii (Morgan a kol. 1999). Další nález *Cryptosporidium* sp. byl popsán u *Eptesicus fuscus* (netopýr hnědý) v New Yorku v USA (Ziegler a kol. 2007). První molekulárně potvrzený popis kryptosporidií pochází z Číny, kde popsali výskyt *Cryptosporidium* bat genotype I u *Rhinolophus sinicus* (vrápenec čínský) a *Aselliscus stoliczka* (pavrápenec Stoličkův) a *Cryptosporidium* genotype II u *Rhinolophus sinicus* (vrápenec čínský), *Hipposidros fulvus* (pavrápenec žlutohnědý) a *Rousettus leschenaultii* (kaloň Leschenaultův) (Wang a kol. 2013).

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření

V této bakalářské práci byly použity dvě metody odběru vzorků:

- Při kontrole letních kolonií byl trus odebírán z několika míst pod kolonií
- Při odchytu netopýrů byl každému jedinci odebrán trus individuálně

Letní kolonie: Kolonii tvoří desítky až stovky samic, které jako úkryt využívají půdy budov a dutiny stromů.

Odchyt netopýrů: Probíhal před vstupem do jeskyně, kde se natáhla síť a netopýr se do ní zachytil, opatrně byl vyndán a byl uložen do textilního pytlíku. Poté byl určen druh, pohlaví, přibližný věk, hmotnost a tělesné míry. Trus byl odebrán z pytlíku (viz vlastní odběr) a netopýr byl vypuštěn.

Vlastní odběr:

- Nasadit ochranné rukavice
- Nabrat čerstvý trus pomocí špejle do mikrozkušavky (1,5 ml)
- Označit zkumavky datem, druhem netopýra a lokalitou
- Skladovat při teplotě 4–5 °C

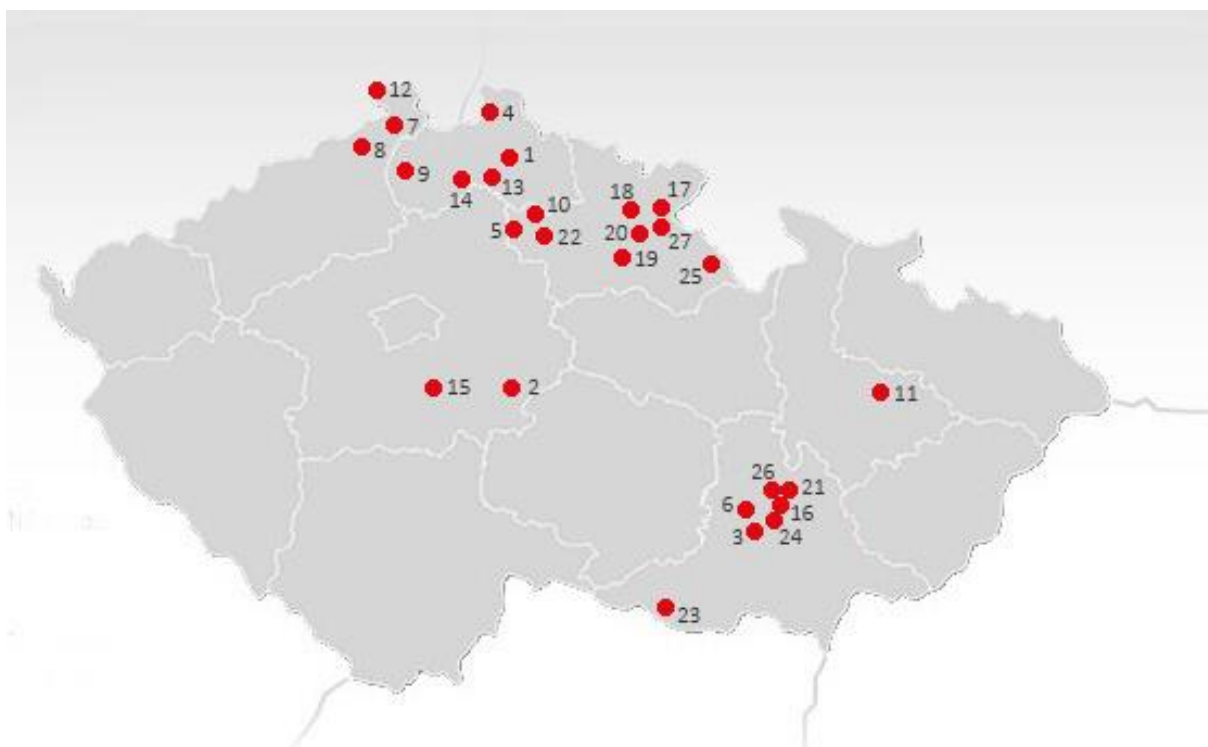
První metoda kontrola letních kolonií, kde bylo odebráno 148 vzorků na těchto lokalitách (obrázek 2):

- |                |                       |                          |
|----------------|-----------------------|--------------------------|
| 1. Alšovice    | 7. Chřibská           | 12. Lobendava            |
| 2. Bernartice  | 8. Jílové u<br>Děčína | 13. Semily               |
| 3. Brno        | 9. Kvítkov            | 14. Turnov               |
| 4. Frýdlant    | 10. Libuň             | 15. Týnec nad<br>Sázavou |
| 5. Hrad Kost   | 11. Lipina            |                          |
| 6. Hrad Veveří |                       |                          |

Druhou metodou sčítání netopýrů bylo odebráno 114 vzorků na těchto lokalitách (obrázek 2):

- |                            |                        |                              |
|----------------------------|------------------------|------------------------------|
| 16. Býčí skála u Brna      | 19. Hradec Králové     | 24. Ochoz u Brna             |
| 17. Červený Kostelec       | 20. Jaroměř            | 25. Orlické hory             |
| 18. Dvůr Králové nad Labem | 21. Jeskyně Hladomorna | 26. Sloupsko-šoňvské jeskyně |
|                            | 22. Jičín              | 27. Zlích                    |
|                            | 23. NP Podyjí          |                              |

**Obrázek 2:** Mapa ČR s lokalitami sběru vzorků



## 4.2 Barvení trusu dle Miláčka a Vítovce (1985)

Oocysty kryptosporidií byly barveny pomocí roztoku anilin-karbol-methyl-violeti.

Složení zásobních roztoků:

*Roztok anilin-karbol-methyl-violet:*

- 0,6 g methyl violeti
- 1 ml anilinu
- 1 g fenolu
- 30 ml 96% alkoholu
- 70 ml deionizované vody

*Roztok tartrazinu:*

- 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

*Kyselina sírová:*

- 2% kyselina sírová

Pracovní postup:

- Vzorek trusu tence rozetřít na podložní sklíčko, zafixovat metanolem v plameni
- Obarvit anilin-karbol-methyl-violetí po dobu 30 min.
- Omýt pod tekoucí vodou
- Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 2 min.
- Omýt pod tekoucí vodou
- Dobarvit tartrazinem po dobu 2 min.
- Omýt pod tekoucí vodou
- Nechat uschnout při laboratorní teplotě
- Vyšetřit světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje
- Vždy prohlédnout celý preparát

### **4.3 Izolace DNA**

Extrakce DNA z čerstvého trusu pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA kit (Invitek).

Součásti kitu:

- Elution Buffer D 200 µl/l vzorek
- Lysis Buffer P
- Proteinase K lyofilizát (rozpustit přidáním 1,5 ml deionizované vody, skladovat při -20 °C)
- Promývací pufry Wash I a Wash II
- Binding Buffer P
- Kolony se sběrnými zkumavkami
- InviAdsorb zkumavky

*Materiál:*

- 200 mg čerstvého trusu

Pracovní postup:

- K 200 mg trusu přidat skleněné 0,5 mm kuličky; 0,8–1,2 ml Lysis Buffer P a rozbít 1 min. při rychlosti 5,5 m/s v přístroji FastPrep - 24
- Inkubovat v termobloku po dobu 10 min. při teplotě 95 °C
- Centrifugovat 1 min. při 13 400 g
- Veškerý supernatant převést do InviAdsorb zkumavek, zvortexovat a 1 min. inkubovat při laboratorní teplotě
- Centrifugovat 3 min. při 13 400 g
- Supernatant napipetovat do čistých 1,5 ml mikrozkušavek a centrifugovat 3 min. při 13 400 g
- Do čistých 1,5 ml mikrozkušavek napipetovat 25 µl Proteinase K a přidat 400 µl supernatantu, zvortexovat
- Inkubovat v termobloku po dobu 10 min. při teplotě 70 °C
- Připipetovat 400 µl Binding Buffer P, zvortexovat
- Převést veškerý objem na kolony se sběrnými mikrozkušavkami a inkubovat 1 min. při laboratorní teplotě
- Centrifugovat 1 min. při 13 400 g
- Vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, napipetovat na kolonu 500 µl Wash I, centrifugovat 1 min. při 13 400 g
- Vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, napipetovat na kolonu 800 µl Wash II, centrifugovat 1 min. při 13 400 g
- Vylít odpad a znova centrifugovat 3 min. při 13 400 g
- Kolonu vložit do čisté mikrozkušavky, napipetovat 200 µl přehřátého Elution Buffer D na kolonu
- Inkubovat 3 min. při laboratorní teplotě
- Centrifugovat 1 min. při 8 000 g
- Skladovat v mrazicím boxu při teplotě -20 °C

## 4.4 Molekulární detekce kryptosporidií

Vzorky vyizolované DNA byly testovány na přítomnost specifické DNA kryptosporidií.

### 4.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Amplifikace variabilního úseku části genu kódující malou ribozomální podjednotku rRNA (SSU) a části genu kódující aktin byla provedena z vyizolované DNA za pomoci nested PCR s použitím rodově specifických primerů (Jiang a kol. 2005; Sulaiman a kol. 2002). Objem reakční směsi pro jednotlivé polymerázové reakce byl 20  $\mu$ l (tabulka 1).

#### Složení reakční směsi:

- Deoxyribonukleosid trifosfáty (200  $\mu$ M dNTP's, 10 mM roztok, Top – Bio, ČR)
- 10 $\times$  koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top – Bio, ČR)
- Taq purple DNA polymeráza (1 U/ $\mu$ l, Top – Bio, ČR)
- PCR voda (Top – Bio, ČR)
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Top – Bio, ČR)
- Bovinní sérový albumin (BSA 10 mg/ml, Sigma – Aldrich, ČR)
- Primery (10  $\mu$ M, Generi Biotech, ČR)

#### Primery pro amplifikaci SSU

Primární primery:

- F 5' - TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG -3
- R 5' - CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA -3'

Sekundární primery:

- F5' - GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG -3'
- R5' - CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A -3'

## Primery pro amplifikaci aktinu

Primární primery:

- F5' - ATG RGW GAA GAA GWA RYW CAA GC -3'
- R5' - AGA ARC AYT TTC TGT GKA CAA T -3'

Sekundární primery:

- F5' - CAA GCW TTR GTT GAY AA -3'
- R5' - TTT CTG TGK ACA ATW SWT GG -3'

**Tabulka 1.** PCR protokol pro amplifikaci SSU rRNA a aktinu

Primární reakce			Sekundární reakce		
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-----	11,3 µl	<b>H<sub>2</sub>O</b>	-----	12,1 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	3 mM	1,2 µl	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	3 mM	1,2 µl
<b>10x buffer</b>	-----	2,0 µl	<b>10x buffer</b>	-----	2,0 µl
<b>dNTP</b>	200 uM	0,4 µl	<b>dNTP</b>	200 uM	0,4 µl
<b>Forward</b>	200 nM	0,4 µl	<b>Forward</b>	200 nM	0,4 µl
<b>Reverse</b>	200 nM	0,4 µl	<b>Reverse</b>	200 nM	0,4 µl
<b>BSA</b>	10 g/l	0,8 µl	-----	-----	-----
<b>Taq</b>	1 U	0,5 µl	<b>Taq</b>	1 U	0,5 µl
<b>DNA</b>	-----	3,0 µl	<b>DNA</b>	-----	3,0 µl
<b>celkem</b>	-----	<b>20 µl</b>	<b>celkem</b>	-----	<b>20 µl</b>

Protokol pro amplifikaci SSU a aktinu se skládal z počáteční denaturace po dobu 3 min. při 94 °C, 35 cyklů zahrnujících denaturaci 45 s při 94 °C, nasedací teploty primerů – 45 s při 55 °C pro primární i sekundární reakci pro amplifikaci SSU a 50 °C a 45 °C pro aktin. Extenze 60 s při 72 °C a finální extenze 7 min. při 72 °C.

### 4.4.2 Gelová elektroforéza

Produkty ze sekundární PCR byly vizualizovány gelovou elektroforézou. Detekce proběhla na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření při vlnové délce 302 nm.



#### Použité chemikálie:

- 50× TAE pufr (242g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA; pH=8,00)
- Agaróza (Serva Electrophoresis, Německo)
- Ethidium bromid (Fermentas International, Kanada)
- 100 bp DNA Ladder (Biogen, ČR)

#### Pracovní postup:

- 1× TAE pufr smíchat s agarózou (120 ml TAE pufru + 1,2 g agarózy)
- Nechat agarózu rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou přibližně na teplotu 50 °C
- Přidat 3 µl ethidium bromidu a promíchat
- Do předem připravené formy nalít gel, vložit hřeben a nechat ztuhnout
- Po ztuhnutí vyjmout hřeben a vložit gel do elektroforetické vany s 1× TAE pufrem
- Do jamek vzniklých po vyjmutí hřebenu, napipetovat sekundární PCR produkt
- Nastavit napětí na 70 V a spustit do doby separace fragmentů DNA
- Pro vizualizaci DNA fragmentů použít UV transiluminátor

#### **4.4.3 Izolace z gelu**

Izolace z gelu byla provedena u pozitivních vzorků z gelové elektroforézy. Produkty byly izolovány pomocí QIAquick Gel Extraction kitu.

#### Pracovní postup:

- Vyříznout pozitivní fragmenty DNA z gelu skalpelem
- Vložit do mikrozkušavky 1,5 ml se 400 µl QG pufru
- Inkubovat 10 min. při 50 °C
- Přepipetovat veškerý objem na kolonu, centrifugace 1 min. při 13 400 g
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky, přidat 500 µl QG
- Vylít odpad a promýt 700 µl PE pufrem, inkubovat 5 min.

- Vylít odpad, centrifugovat 3 min. při 13 400 g, otočit zkumavku v centrifuze o 180°, centrifugovat 3 min. při 13 400 g
- Kolonu dát na čistou 1,5 ml mikrozukmavku a připipetovat 30 µl PCR vody předeřáté na 50 °C, centrifugovat 3 min. při 13 400 g

#### **4.4.4 Sekvence vzorků**

Byla provedena přímá sekvence PCR produktů pomocí sekundárních primerů v komerčních laboratořích. Získané nukleotidové sekvence každého genu byly analyzovány Chromas Pro 1. 7. 5. a navzájem byly porovnány s referenčními sekvencemi uloženými v GenBank.

#### **4.4.5 Fylogenetická analýza**

Nejvhodnější fylogenetický model byl vybrán v programu MEGA 6. Fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií byly vypočteny na základě vybraného modelu. Bootstrapový konsenzus výsledného stromu byl získán na základě 1 000 opakování. Na konstrukci fylogenetických stromů byl použit program MEGA 6.

## 5 Výsledky

Odběry vzorků byly zahájeny na podzim 2013 a pokračovaly v létě 2014. Počet odebraných vzorků byl 262 z 27 lokalit. Z toho 233 vzorků od netopýrovitých a 29 vzorků od vrápenců.

### 5.1 Výskyt a prevalence kryptosporidií netopýrovitých a vrápenců

Všech 262 vzorků trusu získaných pro tuto studii bylo mikroskopicky vyšetřeno na přítomnost oocyst kryptosporidií. V žádném z testovaných vzorků nebyly detekovány oocysty kryptosporidií. Následně byly všechny vzorky podrobeny detekci specifické DNA kryptosporidií. Z celkového počtu 262 vzorků trusu ze 17 druhů letounů shromážděných z 27 lokalit po celé České republice (tabulka 2) byla specifická DNA kryptosporidií detekována pouze u tří jedinců *Pipistrellus pipistrellus* (netopýr hvízdavý). Celková prevalence kryptosporidií byla velmi nízká (1,1 %).

**Tabulka 2.** Vyšetřované druhy netopýrovitých a vrápenců, počet lokalit a výsledky mikroskopické a molekulární detekce kryptosporidií

Čeleď	Druh	Počet lokalit	Pozitivní/ Vyšetřené	Genotypizace
Rhinolophidae	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	5	0/29	
	<i>Myotis bechsteinii</i>	4	0/6	
	<i>Myotis brandtii</i>	2	0/6	
	<i>Myotis daubentonii</i>	3	0/5	
	<i>Myotis emarginatus</i>	2	0/17	
	<i>Myotis myotis</i>	15	0/89	
	<i>Myotis mystacinus</i>	4	0/5	
	<i>Myotis nattereri</i>	2	0/3	
	<i>Vespertilio murinus</i>	3	0/12	
	<i>Eptesicus nilssonii</i>	1	0/1	
	<i>Eptesicus serotinus</i>	5	0/13	
	<i>Nyctalus noctula</i>	3	0/53	
	<i>Hypsugo savii</i>	1	0/4	
	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	2	3/11	1× <i>C. parvum</i> 2× bat genotype III
Vespertilionidae	<i>Barbastella barbastellus</i>	3	0/3	
	<i>Plecotus auritus</i>	2	0/3	
	<i>Plecotus austriacus</i>	1	0/2	

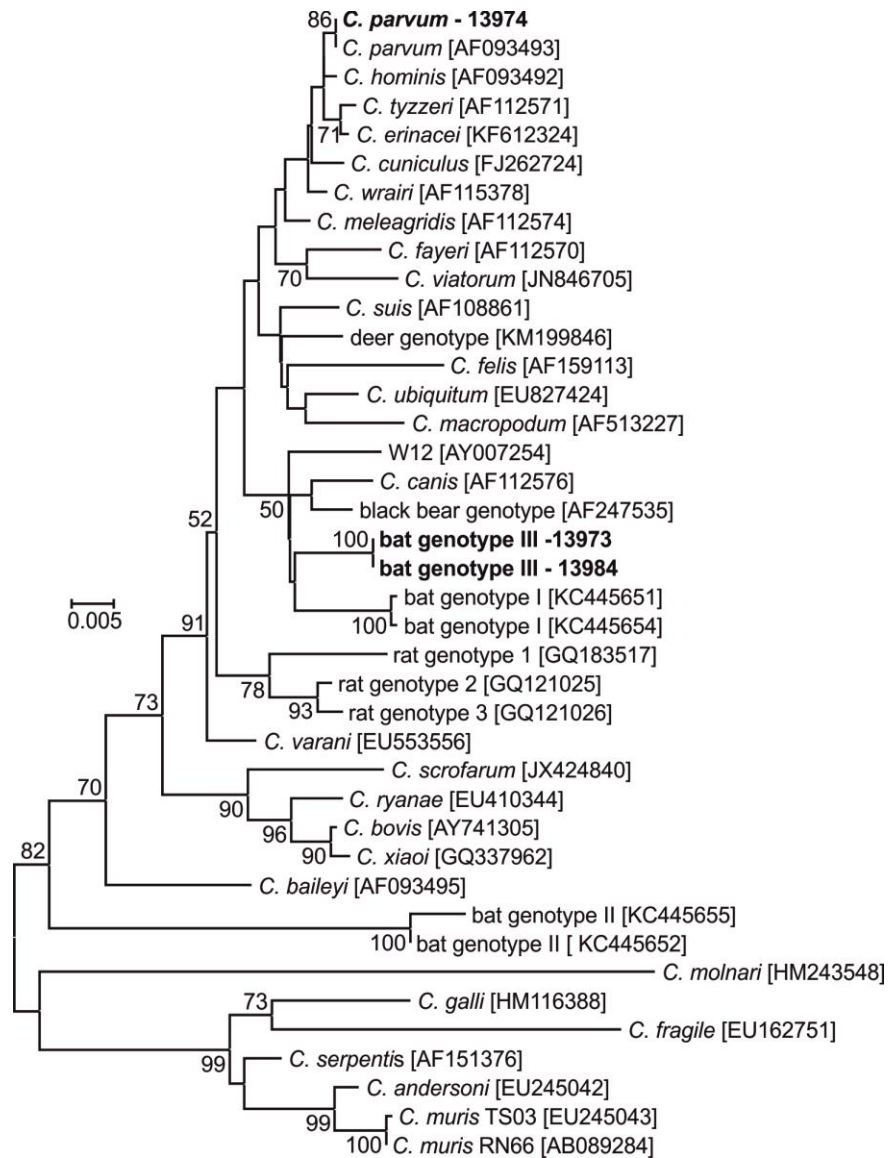
## 5.2 Genotypizace kryptosporidií vrápenců a netopýrovitých

PCR analýza všech vzorků odhalila přítomnost specifické DNA kryptosporidií ve třech vzorcích. Ze 17 druhů netopýrovitých a vrápenců byl pozitivní na kryptosporidií jen jeden druh (tabulka 2).

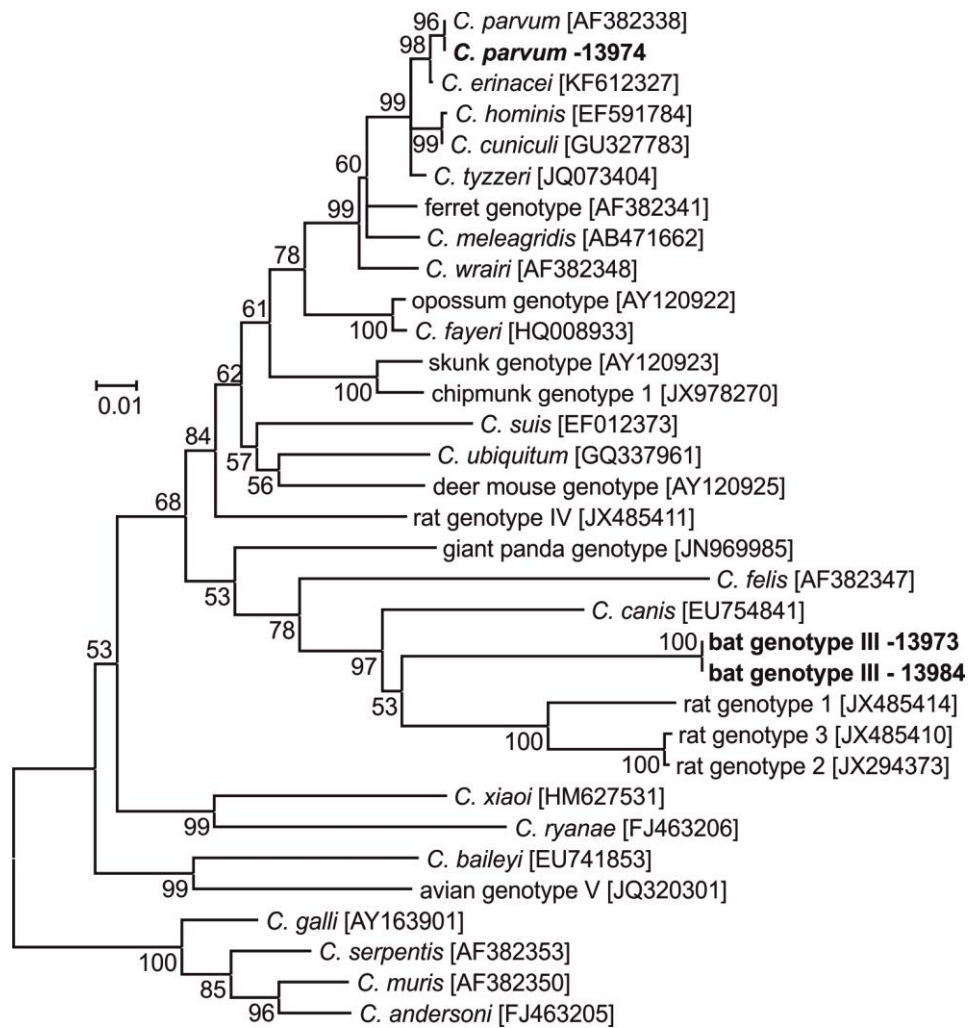
Všechny tři vzorky byly úspěšně sekvenovány na obou genech (SSU a aktin). Sekvence genu kódující malou ribosomální podjednotku prokázala přítomnost dvou odlišných sekvencí. V jednom případě byl trus *P. pipistrellus* pozitivní na přítomnost *C. parvum* (type A) a ve dvou případech byl detekován nový, dosud neidentifikovaný genotyp pojmenovaný *Cryptosporidium* bat genotype III (obrázek 3). Fylogenetická analýza SSU prokázala příbuznost námi identifikovaného genotypu k *Cryptosporidium* bat genotype I.

Sekvence části genu kódujícího aktin prokázala přítomnost dvou odlišných kryptosporidií. Sekvence aktinu ze vzorku určeného na základě sekvence SSU jako *C. parvum* potvrdila přítomnost toho druhu (obrázek 4). Taktéž zbylé dvě sekvence potvrdily fylogenetickou pozici nově detekovaného *Cryptosporidium* bat genotype III (obrázek 4).

**Obrázek 3.** Fylogenetický strom (vytvořený metodou neighbor-joining v programu MEGA6; 1000× bootstrap) izolátů kryptosporidií detekovaných v této studii (vyznačeno tučně) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU).



**Obrázek 4.** Fylogenetický strom (vytvořený metodou neighbor-joining v programu MEGA6; 1000× bootstrap) izolátů kryptosporidií detekovaných v této studii (vyznačeno tučně) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího aktin.



## 6 Diskuze

Tato práce poskytuje další kousek do obrovské skládačky rozmanitosti kryptosporidií obratlovců. Ve většině předchozích studiích zaměřených na kryptosporidie a kryptosporidiózu letounů nebyla provedena molekulární charakterizace izolátů. V letech 1998-2007 byly detekovány oocysty kryptosporidií u *E. funus* a *M. adversus* v USA a Austrálii (Dubey a kol. 1998; Morgan a kol. 1999; Ziegler a kol. 2007).

V roce 2013 byly v Číně popsány *Cryptosporidium* bat genotype I a II. Genotyp I byl nalezen u druhů *Rhinolophus sinicus* (vrápenec čínský) a *Aselliscus stoliczkanus* (pavrápenec Stoličkův, tyto druhy se v České republice nevyskytují) a genotyp II byl nalezen u druhů *R. sinicus*, *Hipposideros fulvus* (pavrápenec žlutohnědý) a *Rousettus leschenaultii* (kaloň Leschenaultův, tyto druhy se v České republice nevyskytují) (Wang a kol. 2013).

Kromě široce hostitelsky specifického *C. parvum* byl v této práci detekován další genotyp kryptosporidií, který je pravděpodobně adaptován na netopýry a byl pojmenován *Cryptosporidium* bat genotype III. Vzorky pozitivní na tento genotyp byly získány v České republice v lokalitě Brno u druhu *P. pipistrellus*. Dle osobního sdělení McEvoy (2015) byl v USA detekován další jiný genotyp nazvaný *Cryptosporidium* bat genotyp IV. Tento genotyp je fylogeneticky příbuzný *Cryptosporidium* black bear genotype. Na základě naší a předešlých studií lze konstatovat, že netopýři z USA a Evropy hostí odlišné kryptosporidie, než netopýři v Číně. Evropští netopýři hostí *Cryptosporidium* bat genotype III, který je příbuzný s *Cryptosporidium* bat genotypem I popsaném v Číně (Wang a kol. 2013). Vzhledem k velmi malému počtu studií na toto téma by však bylo předčasné vyvozovat jakékoliv závěry.

Prevalence kryptosporidiových infekcí u netopýrů je poměrně nízká (<10%), ale tyto výsledky mohly být ovlivněny nízkým počtem vzorků a velikostí vzorků na kolonii v provedených studiích. Na druhou stranu, prevalence kokcií z rodu *Eimeria* u netopýrů, kteří mají podobný životní cyklus jako kryptosporidie, je také většinou pod 20 % (McAllister a kol. 2014).

V dnešní době není znám způsob přenosu infekce kryptosporidií u letounů, ale vzhledem k tomu, že *Cryptosporidium* bat genotyp II popsaný v Číně, který je bazálním

taxonem střevních kryptosporidií, byl nalezený u různě potravinově zaměřených netopýrů ve stejné oblasti, je jak přenos mezi jednotlivci v kolonii, tak přenos pozřením kontaminované potravy pravděpodobně možný.

Výsledky této práce a poznatky z USA a Číny ukazují, že je zde stále mnoho, co nevíme ohledně této skupiny parazitů, zejména ve vztahu k letounům.



## 7 Závěr

- Prevalence kryptosporidií u letounů v České republice je velmi malá.
- Byl detekován zoonotický druh *Cryptosporidium parvum*.
- Byl popsán nový genotyp - *Cryptosporidium* bat genotype III.

## 8 Přehled použité literatury

**Anděra M., Horáček I. 2005:** Poznáváme naše savce, ISBN 80-86817-08-3, 66–73.

**Anderson B. C. 1987:** Abnormal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.* 24: 235–238.

**Bednářská M., Bejer A., Siński E., Giourarda S., Tamang L., Graczyk T. K. 2007:** Fluorescent in situ hybridization as a tool to retrospectively identify *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in samples from terrestrial mammalian wildlife. *Parasitol. Res.* 100: 455–460.

**Blagburn B. L., Current W. L. 1983:** Accidental infection of a researcher with human *Cryptosporidium*. *J. Infect. Dis.* 148: 772–773.

**Blunt D. S., Khramtsov N. V., Upton S. J., Montelone B. A. 1997:** Molecular karyotype analysis of *Cryptosporidium parvum*: evidence for light chromosomes and a low-molecular-size molecule. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 4: 11–13.

**Carreno R. A., Martin D. S., Barta J. R. 1999:** *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as show on by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85: 899–904.

**Clutton-Brocková J. 2005:** Savci, ISBN 80-242-1547-0, 84.

**Current W. L., Reese N. C. 1986:** A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J. Protozol.* 33: 98–108.

**Current W. L., Upton S. J., Haynes T. B. 1986:** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozol.* 33: 289–296.

**Dolejš 2004:** *Cryptosporidium* a *Giardia*: přehled vodárenské problematiky za první desetiletí po událostech Milwaukee (USA). *Vodní hospodářství* 54: 271–273.

- Dubey J. P., Hamir A. N., Sonn R. J., Topper M. J. 1998:** Cryptosporidiosis in a bat (*Eptesicus fuscus*). *J. Parasitol.* 84: 622–623.
- Dungel J., Gaisler J. 2002:** Atlas savců České a Slovenské republiky, ISBN 80-200-1026-2, 24–26.
- Enemark H. L., Ahrens P., Bille-Hansen V., Heegaard P. M., Vigre H., Thamsborg S. M., Lind P. 2003:** *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the 'porcine' genotype. *Parasitology* 126: 407–416.
- Fayer R. 2007:** General biology. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Second edition, CRC Press, FL, pp. 1–42.
- Fayer R., Morgan U. M., Upton S. J. 2000:** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30: 1305–1322.
- Fayer R., Santin M., Trout J. M. 2008:** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156: 191–198.
- Fayer R., Santin M., Xiao L. 2005:** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91: 624–629.
- Fayer R., Speer C. A., Dubey J. P. 1990:** General biology of *Cryptosporidium*, in cryptosporidiosis of Man and Animals, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–29.
- Fayer R., Speer C. A., Dubey J. P. 1997:** The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R. (Ed.) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRS Press. pp. 2–33.
- Fayer R., Trout J. M., Jenkins M. C. 1998:** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocyst stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 84: 1165–1169.
- Fayer R., Ungar B. L. P. 1986:** *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50: 458–483.
- Fayer R., Xiao L. 2007:** *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press. 560.

- Goodstein R. F., Colombo C. S., Illfelder M. A., Shaggs R. F. 1989:** Bronchial and gastrointestinal cryptosporidiosis in AIDS. *J. Am. Ostiopath. Assoc.* 89: 195–197.
- Guselle N. J., Appelbee A. J., Olson M. E. 2003:** Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet. Parasitol.* 113: 7–18.
- Hijawi N. S., Meloni B. P., Ryan U. M., Olson M. E., Thompson C. A. 2002:** Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* 32: 1719–1726.
- Hinnant K., Swartz A., Rotterdam H., Rudsk C. 1989:** Cytomegaloviral and cryptosporidial cholecystitis in two patients with AIDS. *Am. J. Surg. Pathol.* 13: 57–60.
- Horáček I. 1986:** Létající savci, Academia Praha, 11–24.
- Iseki M. 1979:** *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cap. *Jp. J. Parasitol.* 28: 285–307.
- Jeníková M., Němejc K., Sak B., Květoňová D., Kváč M. 2011:** New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. *Vet. Parasitol.* 176: 120–125.
- Jiang J., Alderisio K. A., Xiao L. 2005:** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4446–4454.
- Kahn D. G., Garfinkle J. M., Kionoff D. C., Pembroke L. J., Morrow D. J. 1987:** Cryptosporidial and cytomegaloviral hepatitis and cholecystitis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 111: 879–881.
- Keusch G. T., Hamer D., Joe A., Kelley M., Griffiths J., Ward H. 1995:** "Cryptosporidia- - who is at risk?" *Schweiz. Med. Wochenschr.* 125: 899–908.

- Kváč M., Hofmannová L., Hlásková L., Květoňová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B. 2014:** *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Vet. Parasitol.* 201: 9–17.
- Kváč M., Kestránová M., Pinková M., Květoňová D., Kaliková J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B. 2013:** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet. Parasitol.* 31: 218–227.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. 2007:** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 143: 229–233.
- Lasser K. H., Lewin K. J., Ryning F. W. 1979:** Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Hum. Pathol.* 10: 234–240.
- Lindsay D. S., Upton L. J., Owens D. S., Morgan U. M., Mead J. R., Blagburn B. L. 2000:** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukar. Microbiol.* 47: 91–95.
- MacKenzie W. R., Hoxie N. J., Proctor M. E., Gradus M. S., Blair K. A., Peterson D. E., Kazmierczak J. J., Addiss D. G., Fox K. R., Rose J. B. 1994:** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *Engl. J. Med.* 331: 161–167.
- Masuno K., Yanai T., Hirata A., Yonemaru K., Sakai H., Satoh M., Masegi T., Nakai Y. 2006:** Morphological and immunohistochemical features of *Cryptosporidium andersoni* in cattle. *Vet. Pathol.* 43: 202–207.
- Matsui T., Fujino T., Kajima J., Tsuji M. 2001:** Infectivity and oocyst excretion patterns of *Cryptosporidium muris* in slightly infected mice. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 319–320.

- McAllister C. T., Seville R. S., Arlen R., Connior M. B. 2014:** A new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from tri-colored bats, *Perimyotis subflavus* (Chiroptera: Vespertilionidae), from the Ouachitas of Arkansas. *Acta Parasitol.* 59: 690–693.
- Meisel J. L., Perera D. R., Meligro C., Rubin C. E. 1976:** Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70: 1156–1160.
- Meuntin D. J., Van Kruiningen H. J., Kein D. H. 1974:** Cryptosporidiosis in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165: 914–917.
- Miláček P., Vítovec J. 1985:** Differential staining of Cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32: 50.
- Morgan U.M., Sturdee A. P., Singleton G., Gomez M. S., Gracenea M., Torres J., Hamilton S. G., Woodside D. P., Thompson R. C. 1999:** The *Cryptosporidium* "mouse" genotype is conserved across geographic areas. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1302–1305.
- Morgan U. M., Xiao L., Monis P., Irwin P. J., Fayer R., Fall A., Denholm K. M., Limor J., Lal A. A., Thompson R. C. A. 2000:** *Cryptosporidium* in domestic dogs-the dog genotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2220–2223.
- Nime F. A., Burek J. D., Page D. L., Holscher M. A., Yardley J. H. 1976:** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70: 592–598.
- O'Donoghue P. J. 1995:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25: 139–195.
- Pancieria R. J., Thomassen R. W., Garner F. M. 1971:** Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 479–484.

- Pospischil A., Stiglmaier-Herb M. T., Hegel G., Wiener H. 1987:** Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Vet. Rec.* 112: 379–380.
- Ryan U., Papparini A., Kaising T., Yang R., Gibson.Kueh S., O' Hara A., Lymbery A., Xiao L. 2015:** *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp. Parasitol.* 31–35.
- Ryan U. M., Xiao L. 2014:** Taxonomy and molecular taxonomy. In: Caccio S. M., Widmer G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, New York, pp. 1–22.
- Slavin D. 1955:** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.) *J. Comp. Pathol.* 65: 262–266.
- Sulaiman I. M., Lal A. A., Xiao L. 2002:** Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J. Parasitol.* 88: 388–394.
- Sutthikornchai C., Jantanavivat C., Thongrunkiat S., Hamroongroj T., Suthana Y. 2005:** Protozoal contamination of water used in Thai frozen food industry. *SE Asian J. Trop. Med. Pub. Health* 36: 41–45.
- Šlapeta J. 2013:** Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* sp. in animals and humans: a thirty colour rainbow. *Int. J. Parasitol.* 43: 957–970.
- Thurson-Enriquez J. A., Watt P., Dowd S. E., Enriquez R., Pepper I. L., Gehra C. P. 2002:** Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J. Food Prot.* 65: 378–382.
- Tyzzar E. E. 1907:** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 5: 12–13.
- Tyzzar E. E. 1910:** An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23: 487–511.
- Tyzzar E. E. 1912:** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394–412.

- Tyzzer E. E. 1929:** Coccidiosis in gallinaceous birds. *Am. J. Hyg.* 10: 269–383.
- Tzipori S., Ward H. 2002:** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes. Infect.* 4: 1047–1058.
- Valigurová A., Jirků M., Koudela B., Gelnar M., Modrý D., Šlapeta J. 2008:** Cryptosporidia: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *Int. J. Parasitol.* 38: 913–922.
- Wang W., Cao L., He B., Li J., Hu T., Zhang F., Fan Q., Tu C., Liu Q. 2013:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* in bats from Yunnan province, south western China. *J. Parasitol.* 99: 1148–1150.
- Widmer G. 1998:** Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* 40: 223–239.
- Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S. J. 2004:** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and applications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 72–97.
- Xiao L., Ryan U. 2014:** Taxonomy and molecular taxonomy. In: Caccio S. M., Widmer G. (Eds.): *Cryptosporidium: parasite and disease*. Wien, Springer Wien Heidelberg. pp. 3–41.
- Ziegler P. E., Wade S. E., Schaaf S. L., Chang Y. F., Mohammed H. O. 2007:** *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York City watershed. *J. Wildl. Dis.* 43, 586–596.