

Česká zemědělská univerzita v Praze  
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů  
Katedra zoologie a rybářství

Kryptosporidie zajíců  
Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. Ing. Iva Langrová CSc.

Autor práce: Marie Kudrnáčová

2010

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Kryptosporidie zajíců vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mojí diplomové práce prof. Ing Ivě Langrové CSc. za téma a odborné vedení práce.

## Souhrn

Práce se zabývá výskytem rodu *Cryptosporidium* spp. u zajíců v České republice. Tímto tématem se zatím žádná odborná práce nezabývala. Ze všech druhů rodu *Cryptosporidium* spp. u zajíců považují za nejpravděpodobnější *Cryptosporidium parvum*, dále podle posledních zpráv je možný také jelení genotyp (cervine genotype) či králičí genotyp (rabbit genotype). Práce shrnuje dosavadní poznatky o kryptosporidiích a především o *Cryptosporidium parvum*. Pokouší se najít jeho dalšího hostitele v podobě zajíce polního (*Lepus europaeus*). *Cryptosporidium parvum* je kosmopolitní, obligátní, intracelulární parazit. Vývoj je endogenní a končí produkcí oocysty vyloučené ve výkalech hostitele. Stádium oocysty je primárně významné pro rozšíření, přežití a jejich nakažlivost. Dezinfekční prostředky je neničí. Naopak nesnášejí vysoké teploty, zmrazení a vysušení. V diagnostice těchto prvoků se dnes používají různé molekulární a serologické metody. Ale mikroskopické metody jsou levnější a časově výhodnější. Léčba je zatím jen symptomatická. Závažnost kryptosporidií je individuální. Někdy jsou nákazy asymptomatické, ale mohou způsobovat i průjem. Jsou velmi nebezpečné pro lidi a zvířata s deficitem imunity, u kterých mohou způsobit smrt.

142 vzorků výkalů bylo sebráno z deseti různých lokalit v okolí města Mělník v České republice. Za metodu diagnostiky byla zvolena metoda barveného nátěru podle Ziehl – Neelsena. Poté byla sklíčka s obarvenými vzorky prohlédnuta pod mikroskopem. Kryptosporidie byly nalezeny jen u třech vzorků.

Klíčová slova

*Cryptosporidium parvum*, zajíc polní, výskyt, diagnóza, léčba, genotypy, Ziehl – Neelsen, Česká republika

## Summary

Study is concerned with occurrence of genus *Cryptosporidium* spp. in hare in Czech Republic. The theme has not been studied by some work yet. From all species of genus *Cryptosporidium* spp. I considered as the most probable in hare *Cryptosporidium parvum*, further based on recent studies is possible cervine genotype or rabbit genotype, too. Study summarises actual knowledge about *Cryptosporidium* spp. and first of all about *Cryptosporidium parvum*. It tries to find its host in brown hare (*Lepus europaeus*). *Cryptosporidium parvum* is cosmopolitan, obligate, intracellular parasite. Development is endogenous and it ends in production of oocysts secreted in host faeces. Stadium of oocyst is primarily significant for expansion, survival and their infectivity. The Disinfectants don't kill them. On the other side they don't survive at very high temperatures and desiccation. In diagnose of the protozoa today we begin to use various molecular and serological methods. But microscopic methods are cheaper and more flexible. Treatment is so far only symptomatic. Relevance of cryptosporidium is individual. Sometimes the infections may be asymptomatic, but they can induce diarrhea too. It is very dangerous for animals and people with immune deficiency where they can cause death.

142 samples were collected from ten different ranges near by town Mělník in Czech Republic. As method of diagnose was chosen Acid - fast bacteria – Ziehl - Neelsen stain. Then the glasses with stained samples were explored by microscope. *Cryptosporidium* was discovered only in three samples.

## Keywords

*Cryptosporidium parvum*, brown hare, occurrence, diagnose, treatment, genotypes, Ziehl – Neelsen, Czech republic

## **Obsah**

1. Úvod.....	9
2. Literární rešerše .....	10
2.2. Zajíc polní ( <i>Lepus europaeus</i> ).....	10
2.3. <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	12
2.3.1. Genotypy možné u zajíců - <i>C. parvum</i> , jelení genotyp, králíčí genotyp.....	13
2.3.2. <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	15
2.3.2.1. Rozšíření .....	15
2.3.2.3. Popis.....	16
2.3.2.4. Přenos, lokalizace a vývojový cyklus .....	17
2.3.2.5. Klinické projevy .....	19
2.3.2.6. Diagnóza .....	20
2.3.2.7. Prevence a léčba.....	26
2.3.2.9. Zoonóza .....	29
3. Materiál a metody .....	32
4. Výsledky .....	33
5. Diskuse.....	40
6. Závěr .....	42
7. Použitá literatura .....	43
8. Přílohy.....	50



## 1. Úvod

Téma práce bylo vybráno pro zjištění výskytu kosmopolitního parazita rodu *Cryptosporidium* spp. u běžně se vyskytujícího zajíce, v našich podmínkách zajíce polního (*Lepus europaeus*). Prozatím se žádný výzkum tímto tématem nezabýval. Zprávy o výskytu *Cryptosporidium* spp. u zajíců tudíž nejsou. Za jeden z druhů, který by se u zajíců mohl vyskytovat, považují *Cryptosporidium parvum*. Ostatní kryptosporidie mají větší specifitu. V poslední době se objevují také různé genotypy rodu *Cryptosporidium* spp., které bychom také mohli teoreticky najít u zajíců. Například jelení genotyp (cervine genotype) objevený u divokých placentálů nebo králičí genotyp (rabbit genotype) u králíků. *Cryptosporidium parvum* může nakazit nejen skot, koně, lidi, ale i další savce. Tato práce se tedy jinými druhy nezabývá. Vzhledem k tomu, že v posledních letech dochází k úbytku zajíců, mohli bychom uvažovat za příčinu i tohoto parazita. *Cryptosporidium parvum* je kosmopolitní parazit a zoonóza, která by mohla při epidemiích ohrozit nejen zvířata, ale i člověka. Jak píše Jex a Gasser (2009), toto onemocnění, přenášené především fekálně - orální cestou (vodou či jídlem), má globální socioekonomický význam. Diagnóza kryptosporidiózy, včetně genetické charakteristiky různých druhů, genotypů a subgenotypů (populačních variant) je rozhodující pro prevenci a kontrolu, zvláště v oblastech, kde není žádné ekonomické ošetření proti tomuto onemocnění. I když Feng (2010) uvádí, že silná hostitelská adaptace prokázaná u většiny druhů a genotypů kryptosporidií u divokých placentálních savců ukazuje, že tato zvířata nejsou významnými druhy pro patogenitu u člověka. Riziko v podobě vysoké prevalence je podle Ordoneze a kol. (2009) následkem rezistence oocyst chemicky čištěným vodám, špatnou účinností aktuálně užívaných léků a nedostatkem efektivní vakcíny. V přirozených podmínkách pro život zajíce není však možné ani tato opatření provádět.

Cílem práce bylo získat nové poznatky o parazitech zajíců u populací zajíců polních v České republice. Současně zjistit, zda se může u zajíců, kromě jiných kokcidií, objevit i kryptosporidióza. Pokud by došlo k objevu kryptosporidií u zajíce, rozšířil by se tím hostitelský okruh tohoto parazita.

## **2. Literární rešerše**

### **2.2. Zajíc polní (*Lepus europaeus*)**

Rada a Škoda (2001) uvádějí, že zajíc polní je velmi významnou lovnou zvěří. Počty ulovených kusů se proto již po léta pečlivě sledují. Existuje domněnka, že současné způsoby zemědělství mění pole v životní prostředí pro zajíce stále nepříznivější. Mnoho zajíců hyne hladem, když ve vrcholném létě náhle začne sklizeň obilí a během několika málo dnů se obrovské plochy změny v lada bez potravy. Zvířata jsou nucena se tísnit na zbylých plochách. Často to jsou kukuřičná pole, v nichž zajíc nalezne sice úkryt, ale už žádnou potravu. Zbývající plochy jsou v té době častěji navštěvovány a tak se zvyšuje nebezpečí infekce a mladí zajíci v pozdním létě hynou na epidemii kokcidiózy. Zbylí jedinci jsou sice imunní, avšak přenášejí infekci na potomstvo. V mnoha revírech se proto člověk pokouší chránit populace zajíců proti této nemoci návnadami obsahujícími léky. Obzvláště náchylní k nákaze jsou zajíci při vlhkém počasí. Je to způsobeno tím, že pocházejí ze suchých a teplých stepí a polostepí Východu.

#### Výskyt a způsob života zajíce

V Evropě je obyvatelem kulturní krajiny, zejména luk, křovinatých strání polí, méně hojný je v souvislých lesích, v horách vystupuje do nadmořské výšky 1600 m. U nás je rozšířen na celém území, v souvislosti se změnami v hospodaření se však jeho stavy výrazně snížily a místy je už jen velmi řídký. Anděra a Hanzal (1995) píše, že zajíc polní byl jako druh hlášen ze všech 624 mapovaných čtverců pokrytých, dotazníkovou akcí (99,4 % území ČR). Dále Anděra a Hanzal (1995) uvádějí, že populační pád zajíce je připisován celkovému zhoršení podmínek přírodního prostředí a dalším antropickým tlakům včetně nevhodného lovu. Byl doprovázen výrazným poklesem koeficientu reprodukce z hodnot 0,90 – 1,19 v první polovině 70. let na 0,31 – 0,61 v letech 1981 – 1985 (MOTT, 1987). Podle Kučery a Kučerové (2002) v celém areálu svého rozšíření tvoří zajíc celou řadu geografických ras. Na našem území se vyskytuje poddruh zajíce polního středoevropského (*Lepus europaeus europaeus*).

Dále Rada a Škoda (2001) uvádějí, že zajíci jsou na rozdíl od králíků samotáři. Páry nebo malé skupinky lze vidět jen v době rozmnožování. Zpravidla jsou věrni svému stanovišti. Zjistilo se však, že se vydávají na více či méně dlouhé cesty.

Vrchol doby rozmnožování spadá do února, března a dubna. Zaječice má mláďata dvakrát až třikrát do roka. Podle Kučery a Kučerové (2002) počet vrhů v průběhu jednoho rozmnožovacího období udávaný jednotlivými autory bývá mezi 3 až 4 vrhy v roce, např. Martimetrová (1977) zaznamenala jako maximum 6 vrhů. Mláďata se rodí venku a ne v podzemní noře jako u králíků. Malí zajíci již krátce po narození vidí a mohou utéci. Hustá srst je chrání proti podchlazení, jsou však citliví na vlhko.

Potravu tvoří traviny, výhonky, obilí, byliny, v zimě i pupeny. Polní byliny hrají důležitou roli ve výživě zajíců, a proto tam, kde v důsledku intenzivního zemědělského využití chybějí, se stavy zmenšují. Přitom původně právě zemědělstvím vytvářením kulturní stepi otevřelo zajícům nový životní prostor.

### Cekotrofie (koprofagie)

Podle Kučery a Kučerové (2002) je cekotrofie (dřívější název korprofagie) zvláštní adaptací zaječího organismu k využití těžko stravitelné potravy. Slepé střevo zajíců vylučuje polostrávenou potravu, která vychází z těla jako zeleně zbarvený měkký mazlavý trus, který zajíci zpět požírají. Tento výměšek obsahuje nejen výživné látky, ale i některé vitamíny, které ve slepém střevě vytvářejí bakterie. Dále obsahuje i bakterie potřebné pro rozklad celulózy při trávení rostlinné potravy. Pro zajíce je vylučování a požívání tohoto výměšku životně důležité. Zajíc si ho odebírá přímo u řitního otvoru, odkud vychází ve formě kuliček, které bez kousání polyká. Po požití cekotrofních bobků se jejich obsah vrací do trávicího procesu. Část je strávena a zbytek je řitním otvorem definitivně vyloučen ve formě tvrdého trusu. Trus zajíce má podobu bobků a jeho velikost je závislá na věku jedince. Barva trusu je většinou tmavohnědá až černá. Po oschnutí nabývá šedohnědé barvy.

Pokud se jedinec vlivem nepřiměřeného rušení nemůže v odpovídající míře věnovat trávení, jehož je cekotrofie nezbytnou součástí, může u něj dojít k hnisavým zánětům střevní sliznice se smrtelnými následky.

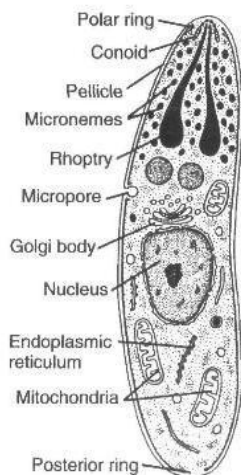
### Výzkum

Podle Anděry a Hanzala (1995) byl na rozdíl od našich jiných savců střední velikosti zajíc předmětem četných výzkumů. Byly sledovány jak populační parametry (např. NOVÁKOVÁ & HANZL, 1967; NOVÁKOVÁ, 1980; SEMIZOROVÁ, 1984), tak prenatalní a postnatalní

vývoj (ŠTĚRBA, 1981; SEMIZOROVÁ, 1983), vliv zatížení životního prostředí (BUKOVJAN & al., 1990; NOVÁKOVÁ & PAUKERT, 1982) a v poslední době i aspekty ekologického charakteru (např. HOMOLKA, 1982; 1983; 1985A; 1987 a další). Taxonomické zhodnocení bylo provedeno pouze u slovenských populací (HELL, 1967; 1968).

### 2.3. *Cryptosporidium* spp.

Podle Fayera a kol. (2000) rod *Cryptosporidium* je klasifikován jako eukaryota kmene Apicomplexa. Všechny druhy kryptosporidií jsou obligátní, intracelulární, protozoální parazité, kteří snášejí endogenní vývoj vyvrcholený v produkci encystovaného stádia vyloučeného ve výkalech hostitele. Pro většinu druhů v kmeni je stádium oocysty primárně významné pro rozšíření, přežití a jejich nakažlivost. Podle Taylora, Coopa a Walla (2007) je vývoj intracelulární, ale extracytoplazmatický a oocysty nemají sporocysty. Sporulace probíhá v hostiteli, takže oocysty jsou okamžitě infekční.



Obr. 1 Struktura kmene Apicomplexa

Schmidt a Roberts (2005) uvádějí, že čeleď Cryptosporidiidae zahrnuje jediný rod *Cryptosporidium*, parazity kartáčového epitelu mnoha druhů savců, ptáků, plazů a ryb. Podle Volfa a kol. (2007) mají kryptosporidie specifickou tkáňovou lokalizaci, a to v zóně mikrokloků epitelu trávicího traktu a epitelu dýchacích cest, některé druhy parazitují v epitelu vystylající žaludeční stěnu. Atypicky se však mohou vyskytnout i v jiných orgánech. K pojmenování bylo navrženo nejméně 19 druhů, ale podle Schmidta a Robertse (2005) Fayer a kol. jich vzali v úvahu pouze deset. Dle Ryanové a kol. (2003) je v současnosti pokládáno za platné 13 druhů kryptosporidií a to na základě rozdílů morfolgie oocyst, místa

infekce, specifického zaměření na třídu obratlovců a genetických rozdílů: *Cryptosporidium muris*, které infikuje hlodavce; *Cryptosporidium andersoni*, které infikuje dobytek; *Cryptosporidium parvum*, jež infikuje dobytek (skot, koně), lidi a jiné savce; *Cryptosporidium hominis*, které infikuje člověka; *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* a *Cryptosporidium galli* u ptáků; *Cryptosporidium serpentis* u hadů a ještěrek; *Cryptosporidium saurophilum* u hadů a ještěrek; *Cryptosporidium molnari* u ryb; *Cryptosporidium wrairi* z guinejských prasat; *Cryptosporidium felis* u koček; a *Cryptosporidium canis* u psů. Podle Xiaoa a kol. (2002) je pravděpodobné, že existuje více druhů. Dále Xiao a kol. (2004) uvádí, že v organizaci systému pro jmenování *Cryptosporidium* druhů a dostupnosti nových systematických nástrojů, by měl být menší zmatek spojený s taxonomií rodů *Cryptosporidium*. Objasnění taxonomie kryptosporidií je také užitečné pro porozumění biologie *Cryptosporidium* spp., ohodnocování významu veřejného zdraví u zvířat a v životním prostředí, charakteristice přenosových dynamikách, a sledování infekce a zdroje znečištění.

Volf a kol. (2007) se zmiňují při popisu třídy Cryptosporidea (kryptosporidie) o tom, že zařazení rodu *Cryptosporidium* do samostatné třídy apikomplex si vyžádaly některé zvláštní vlastnosti jeho zástupců, kteří se sice podobají kokcidiím (ke kterým byli původně řazeni), ale jejichž nejbližší příbuzní, jak ukazuje molekulární fylogenetika, jsou zřejmě gregariny. Oproti greagrínám, které jsou veliké v řádech stovek mikrometrů, jsou ale kryptosporidie organismy velmi drobné, v řádech několika mikrometrů. Rozměry jsou u různých druhů 5 – 7 mikrometrů. V oocystě jsou čtyři sporozoiti, není však vytvořena sporocysta.

Podle Kváče (2003) jsou v současné době kryptosporidie řazeny do dvou skupin na základě jejich lokalizace v hostiteli, a to na druhy infikující a parazitující ve žláznatém žaludku některých savců a plazů a druhy infikující střevo hostitele. Volf a kol. (2007) uvádějí, že významnou vlastností kryptosporidií je, že některé druhy mají nízkou hostitelskou specifitu. S tím se shoduje i Taylor. Coop, Wall (2007), když uvádějí, že jejich životní cyklus je monoxenní, ale některé druhy jsou schopné infikovat řadu obratlovců.

### **2.3.1. Genotypy možné u zajíců - *C. parvum*, jelení genotyp, králíčí genotyp**

Ryan a kol (2003) uvádějí, že *C. parvum* je velmi rozšířený studovaný druh a máme nyní důkazy, že je množství geneticky odlišných genotypů u *C. parvum* skupiny, které jsou

pravděpodobně ještě neprozkoumané. Podle Dawsona (2003) v případě kryptosporidií je nyní vytvořen rozdíl mezi typem 1 lidským izolátem a typem 2 zvířecím/lidským izolátem (bovinní genotyp). V poslední době je navrhováno, že oocysty typu 1 představuje separát druhu pojmenovaný *C. hominis*. Volf a kol. (2007) toto potvrzuje, když píše, že *Cryptosporidium hominis* bylo původně považováno za lidský genotyp *C. parvum*. Dle Ryana a kol. (2003) jsou *C. parvum* bovinní genotyp a *C. hominis* zodpovědní za hlavní infekci lidí; nicméně, stále více nových genotypů kryptosporidií je identifikováno a zdá se, že dynamika přenosu kryptosporidií je komplikovanější, než se dříve předpokládalo. Dawson (2003) uvádí, že společný význam dvou typů *C. parvum* v případě lidské nemoci není znám, i když typizace izolátů z mnoha nedávných epidemií vodou šířící se nemoci ukazuje, že alespoň některé byly způsobeny výhradně typem 1 lidským izolátem. Jiné epidemie, byly přičítány ke kontaminaci od faremních a divokých zvířat (nejspíš typ 2). Podle Huntera a Thompsona (2005) se zdá, že *Cryptosporidium hominis* je striktně lidský patogen. Tomu nasvědčuje studie, kde v lidském izolátu z 37,8% byl genotyp 1 (H - lidský) a z 61,5% genotyp 2 (C - bovinní), zbytek byl *Cryptosporidium meleagridis*. Na rozdíl od toho všechny izoláty zvířat měly genotyp 2 (C).

Kromě rozdělení na dva typy uvádějí Fayer a kol. (2000), že mikrosatelitní analýza 94 *C. parvum* lidských a zvířecích izolátů rozlišuje lidské genotypy do dvou subgenotypů a dobytčí genotyp do čtyř subgenotypů. Některé subgenotypy vykazují široké geografické rozšíření, zatímco jiné jsou omezeny ke specifickým místům. Millar a kol. (2002), ale uvádějí, že mezi téměř 50 subgenotypy *C. parvum* lidského genotypu je identifikováno doposud jen několik subgenotypů. Podobně mezi 30 subgenotypy *C. parvum* bovinního genotypu je identifikován jen jeden nebo dva.

Podle Fenga (2010) se u divokých placentárních savců vyskytuje *Cryptosporidium* jelení genotyp (cervine genotype), který má pravděpodobně největší účast na veřejném zdraví díky jeho široké hostitelské specifitě a zvýšeném výskytu u lidí u industrializovaných národů (Xiao a Feng, 2008). Byl hlášen u divokého křečka dlouhoocasého (1), veverky popelavé (3), veverky obecné (1), čipmanka východního (2), bobra kanadského (2), sviště (1), mývala (1), jelence běloocasého (4) a mnoha druhů ochočených přežvýkavců, jako je jelen sika (2), kozorožec (1), antilopa (1), kudu (1) a u ochočeného sifaka (*Propithecus verreauxi coquereli*) (4).

Dále Feng (2010) píše o *Cryptosporidium* králíčím genotypu (rabbit genotype), který byl ohlášen u čtyř evropských králíků v Číně a České republice (Xiao et al., 2002; Ryan et al., 2003)

### **2.3.2. *Cryptosporidium parvum***

Kváč (2003) uvádí, že *Cryptosporidium parvum* patří spolu s některými dalšími druhy do skupiny napadající střevo hostitele.

Dle Schmidta a Robertse (2005) je mnoho lidských izolátů nyní přiřazováno k *C. parvum*. Nedostatek hostitelské specifity je jedna z hlavních charakteristik, která staví *C. parvum* stranou od jiných kokcií. Tento druh, nebo jakýsi nerozeznatelný od tohoto, byl popsán nejméně ve sto padesáti druzích savců.

Až donedávna byla kryptosporidióza považována za nákazu pouze u zvířat, jinou než u lidí. Od roku 1907, kdy byla kryptosporidióza poprvé popsána Tyzzerem, až do roku 1975, bylo publikováno pouze 15 zpráv popisujících infekci kryptosporidii u osmi druhů zvířat. Od roku 1989 do roku 1997 bylo napsáno přibližně 1000 zpráv do Biological Abstracts, mnoho z nich pojednávalo o infekcích u lidí nebo domestikovaných zvířat nebo o výzkumech, které se snažili zlepšit diagnostiku a léčbu. O kryptosporidii u zajícovitých se zmiňuje Feng (2010), který píše, že u zajícovitých, oocysty podobné *C. parvum* byly nalezeny u 7 % (2/28) živě chycených Evropských králíků v Norfolku ve Velké Británii (Sturdee et al., 1999). Kryptosporidie byly také nahlášeny u Evropských králíků v Austrálii, České republice a Číně (Xiao et al., 2002; Ryan et al., 2003; Cox et al., 2005). Kryptosporidie byly také detekovány u divokých amerických králíků (Ryan et al., 1986).

#### **2.3.2.1. Rozšíření**

Doposud se všichni autoři shodují na tom, že je *C. parvum* kosmopolitně rozšířené. Šířit se může vodou, vzduchem, potravou, zdrojem infekce jsou infikované výkaly. Podle Chrousta a kol. (1998) povrchové a odpadní vody, jímky i pastviny, v některých zemích sezónní záplavy, napomáhají šíření infekce. Šíření vzdušnou cestou bylo popsáno ojedinele u člověka, např. při manipulaci s infekčním materiálem.

Podle Kváče (2003) se druh *C. parvum* vyznačuje nízkou hostitelskou specifitou a je pravděpodobně infekční pro všechny druhy savců. Schmidt a Roberts (2005) uvádí, že infekce byly popsány u morčat, krocanů, kuřat, telat, jehňat a širokém rozsahu domácích mazlíčků a

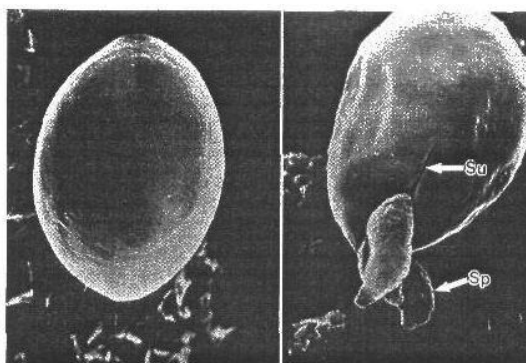
zvířat ze zoologických zahrad. Nyní je *C. parvum* známé jako příležitostný parazit člověka, především malých dětí a lidí, kteří jsou imunodeficitní a imunokompetentní. Podle Fayera a kol. (2000) jsou v mnoha populacích specifické skupiny, ve kterých je větší riziko infekce. Tyto skupiny zahrnují děti, podvyživené osoby a řadu imunokompromisních jedinců, zejména pacienty s AIDS, příjemce transplantátů, pacienty podstupujících chemoterapii po rakovině, pacienty v ústavech a pacienty s imunosupresivní infekcí.

### 2.3.2.3. Popis

#### Oocysty

Fayer (2004) uvádí, že oocysta je jediné stádium nalezené mimo hostitele. Podle Schmidta a Robertse (2005) jsou malinké kulovité oocysty od 4 mikrometrů do 5 mikrometrů široké, velice křehké a obsahují od jedné do osmi nápadných granulí, obvykle v malých skupinách nedaleko buněčného okraje. Sporocysty chybí. Podle Chrousta a kol. (1998) je velikost oocyst *C. parvum* 5,4 x 4,5 mikrometrů. Hajdušek, Ditrich a Šlapeta (2004) při výzkumu kryptosporidií v České republice, zkoumali tři izoláty *C. parvum* bovinní genotyp z koní, jež měli oocysty velké 4,8 (+/-0,4) x 4,1 (+/-0,4). Velikost oocyst nalezených u dětí v této studii byla 4,9 x 4,7 mikrometrů (s možným rozdílem velikosti plus mínus 0,3 x 0,3). Chrousta a kol. (1998) uvádějí, že stěna oocyst je téměř bezbarvá a oocysty jsou silně světlolomné. Podle Dawsona (2003) oocysty obsahují čtyři poloměsíčitě infekční struktury – sporozoity. Schmidt a Roberts (2005) uvádějí, že každá oocysta obsahuje čtyři sporozoity, které jsou útlé a vřetenovitého tvaru. Jurášek a kol. (1993) uvádí, že tyto čtyři sporozoity vytvoření v průběhu endogenní sporulace leží volně v cytoplasmě a obklopují reziduální tělísko oocysty. Novější studie Chatterjeeho a kol. (2010) ale uvádí, že mucinu podobné glykoproteiny, které jsou spojené s povrchem sporozoitu, tvoří vlákna či globuly, jež vážou sporozoity ke vnitřnímu povrchu stěny oocysty. Podle Chrousta a kol. (1998) oocysty mají charakteristickou suturu na jednom pólu (pozorovatelná jen s využitím SEM – skanovací elektronový mikroskop), kterou sporozoity opouštějí oocystu během excitace.

Obr. 2 *Cryptosporidium parvum*



(a) Oocysta. (b) Tři sporozoité (Sp) se uvolňují ze sutury (Su) v oocystě získané z telat a excystované experimentálně in vitro.

(a)

(b)



Následující vývojová stádia jsou dle Fayera (2004) vnitrobuněčná, ale extracytoplazmatická, obvykle nalezená v mikrovílech povrchu epiteliálních hostitelských buněk.

#### **2.3.2.4. Přenos, lokalizace a vývojový cyklus**

##### Přenos

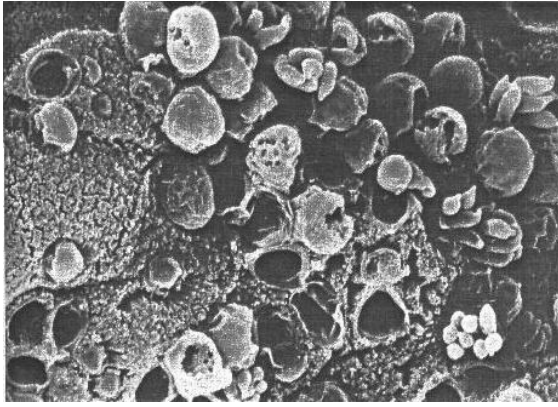
Podle Kváče (2003) se kryptosporidióza přenáší fekálně orální cestou prostřednictvím infekce schopných oocyst. Zdrojem infekce je 1. přímý kontakt dvou jedinců (zvíře - zvíře, zvíře - člověk), 2. příjem oocyst kontaminovaným krmivem (potravou – maso, ovoce, zelenina), 3. vodou (zavlažovací, pitnou, užitkovou), 4. vzdušná cesta a 5. u lidí popisován i přenos při sexuální aktivitě. Jak uvádí Fayer a kol. (2000) počet zpráv celosvětově poskytuje velmi podrobnou evidenci, že kontaminovaná voda je vysoce rizikový faktor pro kryptosporidiózu. Zpráv o jídle související s epidemiemi je málo, jsou velmi málo hlášené a je důležité je dokumentovat.

O mechanice přenosu Fayer a kol. (2000) píše, že výkaly položené na zemi jsou podrobeny větru a vodě, pomocí větru a vody se transportují oocysty do nebo skrz půdu. V některých případech k pohybu oocyst přispívají lidé a zvířata.

##### Vývoj a lokalizace

Podle Juráška a kol. (1993) jsou kryptosporidie monoxény (*geoprotisté*) s přímým vývinem eimeriidózního typu (*sporogonie*, *schizogonie* a *gamogonie*), jen s tím rozdílem, že sporogonie je úplně endogenní (v těle hostitele).

Dawson (2003) uvádí, že po příjmu oocysty excystují v tenkém střevě, uvolňují sporozoity. Podle Chrousta a kol. (1998) sporozoity pronikají epiteliálními buňkami gastrointestinálního traktu. Podle Schmidta a Robertse (2005) narušují epitelové buňky buď dýchacího systému nebo střeva (od ilea do tlustého střeva). Jak uvádí Chroust a kol. (1998) jejich schopnost uvolňovat se z oocysty i spontánně, částečně vysvětluje proč kryptosporidie mohou infikovat extraintestinální místa lokalizace, např. spojivku oka a dýchací trakt. Jurášek a kol. (1993) u lokalizace uvádí, že u mnoha savců, ryb, plazů a u člověka se kryptosporidie vyskytují v kaudální třetině jejunu, v ileu, céku a rektu. Zjištěné jsou i v epitelových buňkách žlučovodů, oční spojivce, v nosních dutinách a v trachejích.



Obr. 3 Oocysty *Cryptosporidium* v různých stádiích vývoje na epitelu střeva

Volf a kol. (2007) píší, že se kryptosporidie podobají lokalizaci na povrchu infikovaných buněk gregarinám, ale na rozdíl od gregarin se vývoj kryptosporidií odehrává v růstové komůrce (parazitoformní vakuole) vznikající obrůstáním invadujícího zoitu výběžky hostitelské buňky. Vzniká tak tenkostěnný vakuolární útvar vyčnívající do dutiny invadovaného orgánu a uvnitř tohoto útvaru pak probíhá merogonie a další vývoj kryptosporidie. Tato lokalizace bývá popisována jako lokalizace „intracelulární extracytoplazmatická“.

Podle Kváče (2003) merogonie, tedy asexuální množení, probíhá ve dvou fázích, při nichž dochází ke vzniku dvou morfologicky odlišných typů merontů. Schmidt a Roberts (2005) píší, že meronti jsou okolo 7 mikrometrů širocí a produkují osm merozoitů banánovitěho tvaru a malá rezidua. Kváč (2003) je přesněji popisuje tak, že první typ merontů obsahuje 6 - 8 merozoitů a druhý typ 4 merozoity. Tento typ vzniká v druhé fázi merogonie.

V následné gametogonii (sexuální fáze) vznikají samčí mikrogamonty a samičí makrogamonty. Podle Schmidta a Robertse (2005) mikrogamonti produkují 16 kyjovitých mikrogamet bez bičíků, které jsou od 1,5 mikrometrů do 2,0 mikrometrů dlouhé. Kváč (2003) dále píše, že mikrogamety vzniklé z mikrogamontů oplodňují samičí makrogamety (vzniklé z makrogamontů) a dochází ke zformování zygoty. Zygota prochází meiosou (sporogonií) a uvnitř se formují 4 sporozoiti. Výsledkem sporogonie je zralá oocysta. Oocysty jsou dvojího druhu, silnostěnné a tenkostěnné. Silnostěnné oocysty opouští spolu s exkrementy tělo hostitele. Tenkostěnné oocysty excystují již v zažívacím traktu hostitele a dochází k autoinfekci. Sporulace probíhá v obou případech ještě v hostiteli. Oocysty, které se dostávají do vnějšího prostředí, jsou plně infekce schopné. Podle Schmidta a Robertse (2005) se oocysty objevují již pět dnů po nákaze. Virulence je nejspíš specifická; u telat

experimentálně infikovaných různými lidskými izoláty se objevily infekce, které byly jednoznačně rozdílné v jejich závažnosti.

Podle Chrousta a kol. (1998) je u různých druhů zvířat doba prepatence různě dlouhá. Fayer (2004) píše, že prepatentní doba, od přijetí potravou nakaženou oocystami do vyměšování oocyst, po kterém následuje dokončení životního cyklu, může být dokončeno asi jen po 3 až 5 dnech nebo může trvat až 2 týdny. U imunokompetentních osob nebo zvířat patentní doba, kdy jsou oocysty vylučované, může trvat od jednoho až několik týdnů, s tím, že oocysty se objevují jen přerušovaně během některých dnů. Podle Dawsona (2003) není každé z těchto stádií životního cyklu tohoto organismu zpozorováno uvnitř buňky, ale vně cytoplasmy a po inkubační periodě 2 - 10 dní, patogen dává vznik symptomům u člověka. Neprodukuje žádné specifické toxiny.

### **2.3.2.5. Klinické projevy**

Nemoc, kterou kryptosporidie způsobují, se nazývá kryptosporidióza. Podle Juráška a kol. (1993) jejich trofozoiti, schizonti a gamety vytvářejí na povrchu epitelových buněk parazitoformní vakuoly s lamelou, které zprostředkovávají látkovou výměnu s cytoplazmou buňky. Sliznice postižených orgánů jsou intraepiteliálně infiltrované lymfocyty, monocyty, neutrofilny a makrofágy. Vytvářejí se eroze narušující resorpční funkci epitelu, způsobují jeho odlupování a vytvářejí tak mikroléze (drobná poranění) dostupné pro viry a bakterie. Chroust a kol. (1998) toto potvrzují, když píší, že průběh onemocnění bývá současně ovlivněn synergickým působením dalších enteropatogenních původců – virů (rotaviry, koronaviry) a bakterií (*E. coli*, *Salmonella* spp.).

Jako primární patogen podle Chrousta a kol. (1998) kryptosporidie způsobují zploštění kartáčového lemu, atrofii střevních klků a následnou malabsorpci. Postupnou dilatací střevních krypt, dochází ke snížení enzymatické aktivity střevní mukózy. Objevují se poruchy trávení, růstu a vývoje, především u mláďat. Hypersekrece tekutin a elektrolytů v proximální části tenkého střeva se klinicky manifestuje vodnatými průjmy s anorexií, dehydratací a bolestmi břicha. Kromě zažívacího traktu postihují tyto prvoci i přilehlé orgány (pankreas, játra, žlučník apod.) a respirační cesty. Jurášek a kol. (1993) uvádějí, že u koťat, štěňat, hříbat, králíků, opic, hlodavců, kuřat, krůt, housat, plazů a různých exotů zoologických zahrad se průjem nemusí vyskytnout.

Podle Chrousta a kol. (1998) v roce 1982 bylo v USA prokázáno, že profúzní průjmy u pacientů s AIDS souvisejí téměř výlučně s druhem *Cryptosporidium parvum*. Dle Hobstové a kol. (2003) je klinickým projevem u imunokompetentních pacientů spontánně mizející průjem s nevolností, u imunokompromisních osob dlouhotrvající průjem s malabsorpcí a ztrátou hmotnosti. Podle Dawsona (2003) u imunokompromisních jedinců, může být nemoc častější a trvalejší, s napadením jiných orgánů včetně plic a žlučovodu a může je ohrožovat na životě. Kořínková (2006) rozděluje onemocnění na za a) u imunokompetentních dospělých, kde je asymptomatické forma a imunokompetentních dětí, kde se nachází manifestní forma s příznaky: 14 dní trvající vodnaté průjmy, zvracení, teplota, bolesti břicha, po ukončení vývojového cyklu prvoka nastává spontánní uzdravení a za b) u imunodeficientních pacientů (zejména AIDS), kde představuje jednu z oportunních parazitóz – příznaky: chronické, život ohrožující těžké vodnaté průjmy, horečka, bolesti břicha, hubnutí, někdy průnik do plic a plicní komplikace. Pilarczyk a Balicka - Ramisz (2002) uvádějí, že příznačná kryptosporidióza u lidí s imunologickým nedostatkem způsobuje chronické hubnoucí průjmy, které jsou přímou příčinou smrti u 3 – 15 % pacientů s AIDS. Podle Schmidta a Robertse (2005) četnost stolice je v rozsahu od 6 do 25 za den a maximální objem stolice je v rozsahu od 1 do 17 litrů za den. Hobstová a kol. (2003) uvádějí, že žlučové cesty jsou infikovány přibližně u 10 % pacientů a výsledkem je bolest v horní části žaludku, nevolnost a zvracení. Podle Dawsona (2003) má nemoc delší symptomatické periody než mnohé bakteriální gastrointestinální infekce, jsou obvykle 1 - 2 týdny. U lidí jejichž imunitní systém je plně funkční se dokončí uzdravení normálně. Wang a kol. (2009) zkoumali spojení kryptosporidiózy se zhoršeným antioxidačním systémem a dospěli k závěru, že buněčná odolnost je ovlivněna stavem selenu po infekci *C. parvum* z důvodu kinetických změn různých bílých krvinek a cytokininů.

### **2.3.2.6. Diagnóza**

Metody diagnostiky lze podle Kváče (2003) rozdělit podle různých hledisek. Jedním z nich je, jsou-li zvířata (jejich tkáně, vzorky trusu atd.) vyšetřovány za živa nebo po smrti. Dále lze metody dělit podle použité techniky.

## Koncentrační metody

### Flotačně - koncentrační metody

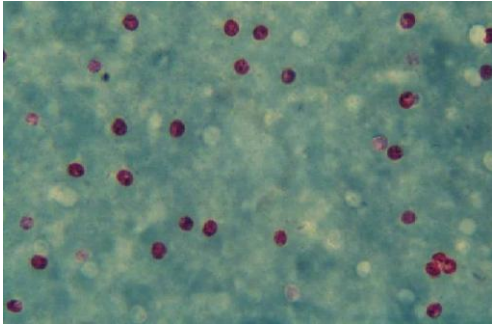
Chrousta a kol. (1998) uvádějí, že intravitální diagnostika se provádí ze vzorků trusu (resp. stolice u lidí), hojně se využívá koncentrační metody dle Sheathera. Kromě Seatherova roztoku dle Kváče (2003) se používají pro flotačně - koncentrační metody také Brezův roztok  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , Füllebornův roztok, roztok podle Kozáka a Mágrové /KOMA/, Faustův roztok, nativní preparáty s použitím glycerinu. Dále se používají kombinace více metod: flotačně - sedimentační metoda – cesium chlorid (CsCl), sedimentace voda – ether s následnou flotací cukerným roztokem. Kuczynska a Shelton (1999) píší, že v jejich výzkumu flotační metoda NaCl obecně vykazovala nejvyšší procenta objevů ve výkalech telat; navíc, doba na zpracování touto metodou byla relativně krátká (<3 h). Tato metoda byla nejlevnější testovanou metodou.

### Sedimentačně - koncentrační metody

Podle Kváče (2003) sem patří metoda Formol - ether.

### Metody barveného nátěru

Podle Juráška a kol. (1993) se poměrně dobrých výsledků dosáhne zbarvením anilin - karbolmetylvioletí a tartrazínem. Henriksovou modifikací Ziehl - Neelsenova barvení se velmi dobře daří identifikace kryptosporidií ponořených do klků, ale také mimo epitelu střeva na povrchu nekrotických hmot. Stejně tak Taylor, Coop a Wall (2007) uvádějí u diagnózy, že oocysty mohou být demonstrovány použitím Ziehl – Neelsenového barvení, kde sporozoit se jeví jako světlá červená granula. Dále Jurášek a kol. (1993) píší, že u živých mláďat se používá flotační metoda s roztokem NaCl a nebo  $ZnCl_2$ . Nejčastěji se používá Heineho metoda, při které se dělají roztěry průjmových výkalů na podložním sklíčku a barví se karbolfuchsinem, nebo se roztěry výkalů fixují metanolem a barví Giemsou. Podobným způsobem se barví také nátěrové preparáty ze sliznice střední třetiny tenkého a tlustého střeva. Mezi metody barveného nátěru Kváč (2003) řadí, kromě zmíněných, také metodu AFT (Acid – Fast - Trichome), modrý nátěr Safranin - methylenem a barvení fluorochromem. Z negativních barvení lze použít barvení pomocí nigrosinu, světlé zeleně, merbromidu, malachitové zeleně. Podle Fayera a kol. (2000) jsou tato barvení rozdílná, nicméně jsou také zdoluhavá a proměnlivá v senzitivitě a specifitě. Mnoho s těchto barvení vyžaduje zkušeného pracovníka s mikroskopem. Jsou pracovně náročná.

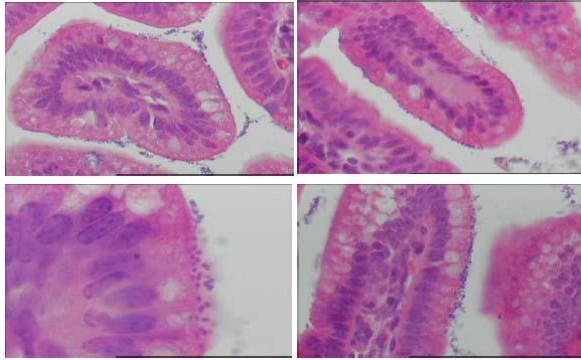


Obr. 4 Metoda barveného nátěru

### Histologické metody

Dle Chrousta a kol. (1998) u uhynulých nebo poražených kusů zvířat oocysty diagnostikujeme v histologických řezech nebo seškrabech sliznice tenkého střeva. Podle Juráška a kol. (1993) jsou kryptosporidie ve střevě morfologicky prokazatelné do 6 hodin po uhynutí zvířete. Chroust a kol. (1998) píší, že po barvení v hematoxylin – eozinu se kryptosporidie jeví jako drobná, sférická tělíska o velikosti 2 - 5 mikrometrů, nacházející se v zóně kartáčového lemu enterocytů tenkého střeva, kde se barví bazofilně. Dle Juráška a kol. (1993) při barvení hematoxylin - eozinem se slabě bazofilně zbarví jen některé oocysty. Dobrých výsledků je možné dosáhnout prodloužením barvení hematoxylin - eozinem na 1 hodinu a dobarvením tartrazínem. Kryptosporidie jsou gramnegativní. Podle Kváče (2003) je dále používáno barvení toulinidovou modří (toluidine blue) nebo barvení metodou PAS (Periodic Acid a Schiffovo reagens). Jurášek a kol. (1993) uvádějí, že reakcí PAS a metodou podle Grocotta se dosáhne dobré viditelnosti oocyst a části jejich plazmatického granulovaného obsahu.

Pilarczyk a Balicka – Ramisz (2002) uvádějí, že mikroskopické metody často selžou při diagnóze bezpříznakových infekcí, které jsou mírně intenzivní (50 000 oocyst v 1 g fekálií představují zjiztitelný limit).



Obr. 5 Histologické vyšetření

### Molekulární metody

Podle Kváče (2003) z molekulárních technik jsou používány různé obměny PCR testů jako alternativa běžných diagnostických metod pro vyšetření vzorků z tkání i z prostředí. I když PCR je podle Fayera a kol. (2000) rychlá, velmi citlivá a přesná, má mnoho omezení. Millar a kol. (2002) píše, že prázdné oocysty nejsou objevené pomocí PCR, protože postrádají DNA, ale DNA může být uchována na týden nebo i více v oocystách neschopných života, takže PCR samo nemůže zajistit, že jsou objeveny jen životaschopné oocysty. Přesto Fayer a kol. (2000) uvádějí, že významná výhoda molekulárních technik je, že poskytují nejenom přesnou a citlivou detekci kryptosporidií, ale také poskytují informaci o genetické proměnlivosti izolovaných kryptosporidií. Nedávný molekulární výzkum měl ukázat, že *C. parvum* není uniformní druh, ale shodují se na mnoha odlišných genotypech nebo tajných (zakódovaných) druzích.

Shahiduzzaman a kol. (2009) potvrzují spolehlivost PCR při svém výzkumu metody kombinace buněčné kultury a kvantitativní PCR a zjistili, že metoda má potenciál snadno a spolehlivě ohodnotit anticryptosporidialní sloučeniny v adekvátně vybavených obvyklých laboratořích. Shahiduzzaman a kol. (2010) uvádějí ke své metodě cc-qPCR, že je jednoduchá a silná pro obvyklé prověřování dezinfekčních prostředků proti *C. parvum*. Skotarczak (2009) naproti tomu hodnotí PCR tak, že pokrok v molekulových metodách dovoluje přesněji rozlišit druhy nebo simultánně odhalit několik parazitárních druhů, přesto metody nejsou ještě stále užívané a potřebují standardizaci. Ovšem Bakheit (2008) zjistil ve své studii o LAMP ((loop-mediated isothermal DNA amplification) zkoušce, že všechny vzorky byly záporné při použití PCR, zatímco až do jedné třetiny vzorků byly pozitivní u LAMP zkoušky. Podle něj je použití LAMP navrhováno jak účinný a efektivní nástroj pro epidemiologická průzkumná studia včetně prověřování zdravých zvířat, u kterých je vylučování oocyst kryptosporidií

velmi malé. Další molekulární metodou je Whole genom amplification (WGA) podle Bouzida a kol. (2010), což je cenná technika pro zesílení genomového materiálu. Tato technika je vhodná pro genotypizaci a archivaci izolátů kryptosporidií.

Proteomovou analýzou se zabývali Madri-Aliste a kol. (2009), kteří ve své práci uvádějí, že vysoká výkonnost hmotnostní spektrometrie je objevující se účinná metoda směrem ke komplexní, proteomové analýze organismu, která je důležitý krok ve zjišťování identifikace proteinových vztahů, studování vyjádření úrovně (stupně) proteinu, objasňování alternativního spojení místa, nebo předpovídající potenciální chemoterapeutické cíle.

Madrid-Aliste a kol. (2009) píší o jejich proteomické databázi pro studium apicomplex: EPICDB je veřejně přístupná, dotazovací, relační databáze, která dává dohromady a zobrazuje experimentální, vysokou výkonnost proteomických dat pro *Toxoplasma gondii* a *Cryptosporidium parvum* a připojuje mnoho rysů, které počítají s analýzou všech proteomů a záznamy specifických sekvencí proteinu. EPICDB je komplementární k dalším genomickým databázím těchto organismů prostřednictvím nabídky kompletní hromadné spektrometrické analýzy s komplexní sadou veškerých dostupných sekvencí proteinu. Primárním zájmem EPICDB je poskytovat komplexní proteome popis vybraných patogenů. Toto ho rozlišuje od dalších genomových databází, které existují pro různé apicomplexní a další organismy, jako, například, ToxoDB <http://www.toxodb.org> webcite, CryptoDB <http://www.cryptodb.org> webcite, nebo TrichDB <http://www.trichdb.org> webcite.

Murugkar a kol. (2009) zkoumali koherentní anti-Stokesovu Ramanovu spektroskopii, kde chemicky vybrané obrazy o kryptosporidiích byly získané jen v několika sekundách použitím koherentní anti-Stokesově Ramanově mikroskopii, což demonstruje její způsobilost pro rychlé odhalení kryptosporidií v jednotlivých stádiích oocyst.

### Sérologické metody

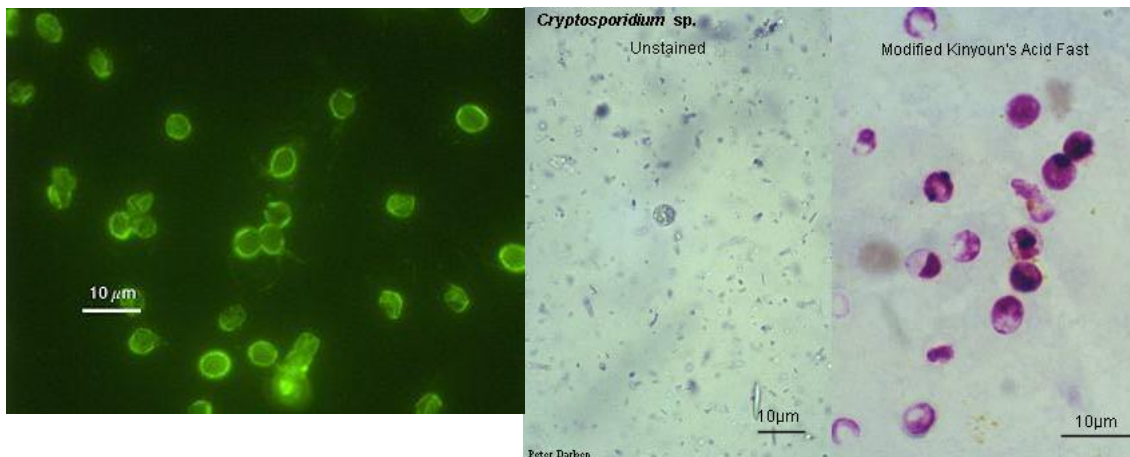
Podle Juráška a kol. (1993) se ze sérologických metod osvědčuje latexový aglutinační test. Kváč (2003) kromě tohoto, uvádí dále ještě polyklonální fluorescenční protilátkový test, imunofluorescenci (IF) s monoklonálními protilátkami (MAb), ELISA test (enzyme - linked immunosorbent assays), zpětnou pasivní hemaglutinaci. Fayer a kol. (2000) uvádí, že nespecifita základních protilátkových metod v důsledku zkřížené reaktivnosti s jinými mikroorganismy, může být problematičtější.



Cole a kol. (1999) porovnávali ve svém studiu metody acid - fast staining (AF), immunofluorescent antibody (IFA) a flow cytometry. Metoda IFA byla trochu citlivější než AF, ale nedetekovala spolehlivě v koncentracích oocyst pod  $5 \times 10^5$  /g fekálií. Koncentrace oocyst požadovaná pro 100% citlivosti ( $5 \times 10^5$  oocyst /g fekálií) byly stejné pro IFA a AF. IFA nedetekovala v jejich studiu tak dobře, jako bylo hlášeno v jiných studiích. Není vyloučeno, že vyšší obsah různých vláken u fekálních vzorků dospělého býložravce, vzhledem k lidským vzorkům stolice, komplikuje odhalení oocyst IFA technikou. Přesto Lalancette, Di a Prevost (2010) píší o své metodě, kdy s dvojitou přímou detekcí na buněčné kultuře s imunofluorescenční zkouškou, je nyní možné určit počty celkových a infekčních oocyst pro daný vzorek v jedné analýze. To potvrzují i Bialek a kol. (2002), kde podle nich je EIA (enzyme immunoassay) a DFA (direct fluorescent-antibody) postačující pro obvyklé prověřování vzorků výkalů na kryptosporidie. Stejně tak je pro imunofluorescenci Joachim a kol. (2003), kteří tuto metodu porovnávali s PCR a tvrdí, že imunofluorescence je snadná a dává kvantitativní výsledky, zatímco PCR-based metoda, ačkoliv je možná, vyžaduje použití důmyslnějších nástrojů pro počítání.

Cole a kol. (1999) dále uvádějí, že flow cytometry reprezentovala nejcitlivější metodu pro odhalení, detekovala  $5 \times 10^4$  oocyst /g fekálního materiálu, což se shoduje s jinými zprávami. Metoda flow cytometry byla desetkrát citlivější než IFA a AF techniky. Opět, vysoký obsah vláken (fiber) koňských fekálních vzorků nejspíš omezoval citlivost této metody. Fayer a kol. (2000) píší, že potíže u této metody přicházejí s neschopností charakterizovat *C. parvum* od druhů kryptosporidií a rozpoznat živé od mrtvých oocyst. Cole a kol. (1999) ve své studii zjistili nadřazenou citlivost FC ve srovnání s AF a IFA, které vykazovala, že tato metoda může být vhodnější pro epidemiologické studie. Pro diagnózu akutní kryptosporidie AF představuje nejúčinnější metodu pro veterinární klinické praxe, protože je nejjednodušší.

Koompaong, Sutthikornchai a Sukthana (2009) píší ještě o Immunomagnetické separační (IMS) metodě, která byla nedávno široce používaná kvůli její efektivitě, ale jak uvádějí, je drahá.



Obr. 6 Použití imunofluorescence

Obr. 7 Použití AF

### Výzkum

O kultivacích kryptosporidií in vitro pro výzkum píše Hijjawi (2010), kdy uvádí, že jedním z hlavních cílů mnoha laboratoří je vyvinout model kultivace schopný reprodukce pro tohoto důležitého cizopasníka. Novodobý výzkum měl za následek dlouhodobou kultivaci kryptosporidií v buněčné kultuře při použití pH modifikace, přeočkování a gama ozáření. Další pokračuje v kultuře kryptosporidií in vitro, který odhalil, že tento cizopasník může dokončit svůj životní cyklus v živné půdě při překonání problému použití hostitelských buněk, protože tak jak hostitelská buňka bujně roste a stárne, výsledkem je omezení životního cyklu kryptosporidií před jeho dokončením.

### Uskladnění a přeprava vzorků výkalů

Zajac a Conboy (2006) uvádějí, že jestli sebrané výkaly nemohou být prozkoumané během několika hodin, vzorky by měli být ochlazeny do té doby, než mohou být testovány. Výkaly by neměli být zmrzlé, protože mrazení může deformovat vajíčka parazitů.

### **2.3.2.7. Prevence a léčba**

Podle Dawsona (2003) oocysty (obsahující nakažlivé sporozoity) jsou odolné proti chladným a vlhkým podmínkám a mohou zůstat životaschopné až 18 měsíců. Jsou velmi rezistentní k dezinfekčním prostředkům; běžné chlorování vody není efektivní. Fayer (2004) uvádí, že oocysty přežívají také v mořské vodě po dlouhé časové období.

Gomez-Couso a kol. (2009) zkoumali sluneční dezinfekci vody (SODIS) a její vliv na excitaci *Cryptosporidium parvum* ve vodě. Cíl přítomné studie byl ohodnocen efektem teplot, které

mohou být dosažené během vystavení vodních vzorků přírodnímu slunečnímu světlu (37 - 50 °C), na výskytu oocyst *C. parvum* ve vnějším prostředí za nepřítomnosti dalších popudů. Ve vzorcích vystavených 40 - 48 °C, bylo pozorované postupné zvýšení procenta výskytu excystace a jak se doba vystavení zvyšovala, při maximu byl získán výskyt excystace 53-81% při vystavení vody teplotě 46 °C po 12 h (versus 8 - 80% počátečních izolátů). Za takových podmínek, nakažlivost oocyst ohodnocená v modelech novorozených myších se statisticky snížila s ohledem na počáteční izoláty (19 - 38% versus 100%). Výsledky demonstrují důležitý efekt teploty na výskytu excystace oocysty *C. parvum* a proto i na jejich životaschopnosti a nakažlivosti. Li a kol. (2010) zkoumali vliv výkyvů teplot během dne na infekčnost *Cryptosporidium parvum*. Oocysty byli neinfekční až po čtrnácti 24 - h cyklech s teplotou 30 °C v režimu dne a po sedmdesáti 24 - h cyklech s teplotou 20 °C v režimu. Odhadované množství dnů potřebných pro snížení o 1 – log (10) nakažlivosti *C. parvum* oocyst byla 4,9; 28,7 a 71,5 dnů pro 30, 20 a 10 °C v tepelných režimech, v tomto pořadí.

Dle Chrousta a kol. (1998) oocysty kryptosporidií spolehlivě ničí peroxid vodíku a chlordioxid, vysoké teploty (65 °C za 20 min.) a zmrazení. Ozonizace vody rovněž napomáhá devitalizaci oocyst kryptosporidií. Jejich vitalitu také ovlivňuje UV záření a náleží tak k významnému asanačnímu faktoru při dezinfekci vnějšího prostředí. Podle Betancourta a Roseové (2004) jsou nyní nejvíce zkoumány jako alternativní dezinfekční prostředky oxid chloričitý, ozón a ultrafialové (UV) záření. Jak uvádí Dawson (2003) velký vliv na životnost oocyst má také vysoušení: 95% bylo zabito během 4 hodin při pokojové teplotě. V jiné studii bylo 10<sup>6</sup> oocyst zničeno během 4 hodin, a to sušením na vzduchu při 18 – 22 °C. Podle Juráška a kol. (1993) nejúčinnějším způsobem jejich zničení je pasterizace horkou párou (55 °C), zmrazení a vysušení nebo fermentace hnoje biotermií. Prevencí je pouze důsledná zoohygiena spojená s dokonalou dezinfekcí prostředí. Veterináři, ošetřovatelé, pracovníci jatek, laboranti a další musí dodržovat směrnice o práci v infekčním prostředí a chránit se před nakažením.

### **Léčba**

Chroust a kol. (1998) píší, že k terapii se využívá podpurná a symptomatická léčba. Aplikace rehydratačních roztoků je nezbytná k zamezení dehydratace postiženého organismu. U zvířat často včasné podávání kolostra od hyperimunizovaných krav může symptomy onemocnění zmírnit. U imunokompetentních jedinců dochází často k samovyzdruvení (fenomén „self -

cure“). K preventivní aplikaci i k terapii onemocnění u lidí i zvířat byly ověřovány salinomycin, sulfaquinoxalin, amprolium, dinitolamid a paromomycin.

V roce 1991 zkoumali Perryman a Bjorneby vliv monoklonálních protilátek (MAb) na infekci *C. parvum* u hřibát. Perryman a Bjorneby (1991) uvedli, že dvě hřibata byla ústně léčena MAb 18.44 a imunním sérem, obojí zneutralizovalo sporozoity a merozoity *C. parvum*.

Při výzkumu vlivu látky oryzalinu (dinitroanilin) na antikryptosporidiální efekt a průvodní zlepšení histologických změn ve střevě novorozených krys se střevní kryptosporidiózou Armson a kol. (2002) zjistily, že ošetření s oryzalinem zdvojnásobilo VC (VC = střevní vilusy/ krypty) v duodenu, lačniku a ileu následujícími dávkami 5 mg, 50 mg a 200 mg/kg. Mnohem větší dávka byla požadovaná k návratu VC procenta k normálnímu stavu v ileu (200 mg/kg) ve srovnání s duodenem (6,25 mg/kg), zdálo se, že to odráží sníženou koncentraci drogy v distálním tenkém střevě.

U lidí Hobstová a kol. (2003) uvádí, že žádná léčba není prokázána jako účinná; u imunokompromisních pacientů může být vyzkoušený paromomycin, spiramycin, azithromycin nebo octreotid (Somastatin), jinak léčba je pouze symptomatická.

Podle Schmidta a Robertse (2005) je efektivní vůči průjmu z kryptosporidiózy zřejmě nitazoxadine, včetně AIDS pacientů, stejně jako vůči množství jiných intestinálních parazitů, včetně améb, tasemnic (hlístů) a nematod. Experimentálně používané zvířecí modely vykazovali, že orální léčba monoklonálními protilátkami a hiperimunním kolostrem byli efektivní, ale jedna studie při demonstraci, že antigeny u lidského mateřského mléka snižují vážnost infekce, selhala. *Cryptosporidium parvum* nemá typické mitochondrie a máme doklad, že její energetický metabolismus je hlavně fermentační. Proto 5 - nitrothiazolové směsi působící vůči anaerobním bakteriím jsou také experimentálně používány proti *C. parvum*. Navzdory dobré informovanosti o významu buněčné imunity a mnoha pokusům o identifikaci antigenů, které by stimulovali ochrannou odpověď organismu na antigen, podle Fayera (2004) není schválena žádná imunoterapie ani vakcíny pro prevenci a léčbu kryptosporidiózy u zvířat či lidí. Podobný názor má i Volf a kol. (2007), který uvádí, že účinná léčba kryptosporidiózy dosud není známá. Přesto Taylor, Coop a Wall (2007) píší, že podpůrná léčba, ve formě protiprůjmových léčiv a tekutin, je obvykle dostačující.

Ordóñez a kol. (2009) uvádějí, že během posledních deseti let bylo testováno víc než sto antibiotik a antiparazitik proti *C. parvum* infekcím a to s malým nebo žádným efektem.

Paromomycin, aminoglykosidické antibiotikum, a v novější době nitazoxanide bylo označeno jako slibné agens k léčení kryptosporidiálních infekcí u získaných imunodeficitních (AIDS) pacientů. Obě sloučeniny ukázaly účinnost ve zvířecích modelech a paromomycin byl účinný u novorozenců telat, jehňat a koz. Na druhé straně, nitazoxanide - nitazoxazole benzamid - má široký okruh antimikrobiální aktivity proti hlístovým parazitům. Více pozoruhodné je drastické snížení prevalence oportunistických *Cryptosporidium* spp. infekcí přidružených u AIDS pacientů léčených vysoce aktivní antiretrovirální terapií (HAART). Podle Rossignola (2010) byl však v posledních letech nitazoxanide licencovaný ve Spojených státech pro léčbu kryptosporidiózy u neimunodeficitních dětí a dospělých, stal se tak prvním léčivem schváleným pro léčbu tohoto onemocnění.

Ordóñez a kol. (2009) ve svém studiu DNA – Topoisomerazy IB dále píše, že *C. parvum* obsahuje aktivní TopIB enzym, který je pravděpodobně spojený s rozřešením strukturálních problémů v DNA během replikace, přepisu, a opravných procesů. Na rozdíl od jiných prvoků, enzym zahrnuje jedinečný protein zakódovaný jednotlivým genem, který obsahuje všechny konstrukční detaily definující plně aktivní TopIB. Porozumění zřetelných molekulových charakteristických rysů CpTopIB a regulace výrazu enzymu během životního cyklu cizopasnika může být užitečný pro vývoj nových selektivních inhibitorů CpTopIB jako slibných antikryptosporidiálních agens.

Benitez, Arrowood a Mead (2009) uvádějí ve své práci o *Cryptosporidium parvum* CpABC4 přenašeči (iron-sulfur cluster transporter homolog), že CpABC4 může být přímo nebo nepřímo spojené s ovlivňováním metabolismu navzájem mezi hostitelem a cizopasníkem, a to v odpovědi na ošetření léky a může být zapojen do skutečné rezistence v chemoterapii (léčbě).

Podle Gissota a kol. (2009) porozumění mechanismů exprese genu, které řídí celulární změny, jež jsou nutné k dokončení jejich životních cyklů, bude rozhodující v boji s infekcí a onemocněním.

### **2.3.2.9. Zoonóza**

Přenos ze zvířat na člověka

Podle Juráška a kol. (1993) závažným zoonotickým druhem přenosným na člověka je *C. parvum* z telat. Člověk se může nakazit od psů a koček. Kořata, štěňata, jehňata a myši jsou vnímavé na nákazu lidskými izoláty *C. parvum*. Dle Millara a kol. (2002) je nejběžnější příčinou lidské kryptosporidiózy pět druhů kryptosporidií, zahrnující *C. parvum* lidské a

bovinní genotypy, *C. meleagridis*, *C. felis* a *C. canis*. Kryptosporidie by podle Schmidta a Robertse (2005) měla být považována za zoonózu a ve skutečnosti může být docela běžným případem krátkodobého průjmu volně v populaci. Zoonotický potenciál *C. parvum* je popsán na výzkumech u skotu. V jiných studiích byly častým zdrojem infekce plavecké bazény. Chroust a kol. (1998) uvádějí, že největší riziko přijetí oocyst je syrovým mlékem, masem nebo jinou nevařenou potravou. Dle Huntera a Thompsona (2005) jedno studium ohlásilo zvětšené riziko u HIV pozitivních pacientů, kteří vlastnili psy. Majewska a kol. (1999) uvádí, že ačkoliv role infikovaných koní v zoonotickém přenosu není známa, propuknutí kryptosporidiozy, které se nedávno vyskytlo v jedné veterinární nemocnici, indikovalo rozmanité druhy hostitelů, zahrnující pony a skupinu veterinárních studentů zapojených v léčbě těchto zvířat. Takže, koně infikované kryptosporidii by mohli jednoznačně být zdrojem parazitů pro jiná zvířata, včetně člověka a pro životní prostředí. Dodávají, že koňské výkaly používané pro hnojení půdy také zvyšuje možnost kontaminace jídla a vodních zdrojů.

#### Přenos z člověka na člověka

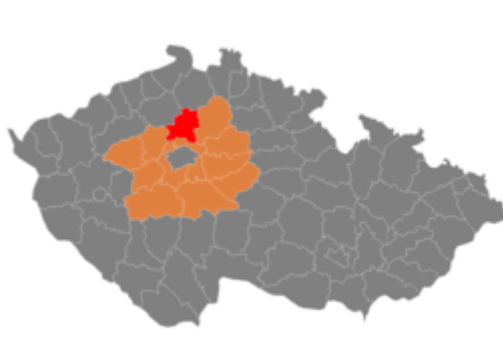
Fayer a kol. (2000) uvádí, že zelenina může být kontaminována z hnojiva zvířat nebo lidských výkalů; kontaminace se děje vodou při závlaze; pomocí špinavých rukou farmářů, produktů vyráběných ručně, nebo jídla pracovníků; a z kontaminovaných ploch, kde je zelenina balena, uskladněna, prodávána a připravována. Podobně jako u zeleniny Fayer a kol. (2000) popisují případ nákazy z kuřecího salátu, který připravovala žena, jež předtím měnila plenky dítěti. Podobným případem je nákaza z ovoce a zeleniny, kterou připravoval kuchař, jež měl doma děti nakažené kryptosporidii. Další možnost přenosu je rekreačně využívanou vodou. Frekvence fekální kontaminace je spojená s rezistencí oocyst k chlorované vodě, menší infekční dávce a díky vysoké hustotě lázeňských hostů má usnadněný přenos. Běžné používání rekreačně využívané vody nezdrženlivých lidí, zahrnující kojence a batolata, zvyšuje možnost pro přenos vodou. Uvažuje se také o přenosu kryptosporidií sexuální cestou. Data porovnávající HIV/AIDS pacienty, homosexuální muže a ty co požívají intravenózní drogy, ukázaly vyšší prevalenci kryptosporidiozy u homosexuálních mužů.

Podle Fayera (2004) prakticky všechny epidemie v lidské populaci byly způsobeny chybami v čistících zařízeních odpadních vod. Avšak v USA, jak uvádí Feltus a kol. (2006), byli sporadické případy kryptosporidiozy ve Wisconsinu častěji způsobené zoonoticky přenášenými druhy kryptosporidií. Tuto část kapitoly je možné uzavřít tvrzením Xiaa (2010), který píše ve své práci, že přenos *C. parvum* u lidí je většinou anthroponotický v rozvojových

zemích, zoonotické infekce hrají důležitou roli v zemích rozvinutých. Konkrétně *Cryptosporidium parvum* podle Chaka a kol. (2010) odpovídá za více případů u lidí v Evropě a zvláště ve Velké Británii.

### **3. Materiál a metody**

Vzorky zaječích výkalů byly sbírány v lednu a únoru roku 2009. Z různých lokalit Středočeského kraje v okrese Mělník bylo sebráno 142 vzorků. Konkrétně to byla myslivecká sdružení, společnosti či honitby: MS KLY Tuhaň (dvakrát), MS Obříství – Libiš (dvakrát), MS Všetaty – Přivory oblast Mikov (dvakrát), Čečelice, MS Nová ves (Myslivecké sdružení DIANA), MS Cítov, MS Velký Borek, Myslivecká společnost Kostelec nad Labem – Jiřice, honitba Dolní Beřkovice (uživatel honitby DENDROM), honitba Ovčáry – Nedomice.



Obr. 8 Sledovaná oblast vyznačená červeně

Označené vzorky byly uchovány v chladu až do barvení, které proběhlo v březnu až květnu 2009. Byla použita metoda barveného nátěru modifikovaná podle Ziehl – Neelsena.

#### Postup metody diagnostiky

Z každého vzorku bylo naváženo a odebráno 0,5 g výkalů a rozetřeno na odmaštěném sklíčku. Takto připravený vzorek se 5 minut fixoval 96 % metylalkoholem. Poté se krátce fixoval nad plamenem. Po fixaci proběhlo barvení koncentrovaným karbolfuchsinem 30 minut. Následovalo opláchnutí destilovanou vodou a vložení do 10 % roztoku kyseliny sírové, která působila 30 sekund. Znova vzorek prošel opláchnutím v destilované vodě. Pak byl diferenciatně dobarven v 5 % malachitové zeleni po dobu pěti minut. Nakonec byl vzorek opláchnut pod proudem destilované vody a vysušen.

V létě 2009 proběhlo mikroskopování všech vzorků při zvětšení 100 x za pomoci imerzního oleje a proměřovacího okuláru. Byly hledány pouze kryptosporidie, které by se měly jevit jako červené uniformní kulaté útvary o rozměrech 4 - 5 x 4 - 5 mikrometrů na zeleném podkladě bez zjevné stěny.



## 4. Výsledky

Ze 142 vzorků byly pravděpodobně nalezeny ojedinělé kryptosporidie u dvou vzorků (č. 1, č. 10) z oblasti MS Velký Borek, datum sběru 24. 1. 2009 a u jednoho vzorku (č. 1) z oblasti MS Všetaty – Přívory, datum sběru 25. 1. 2009. Pozitivní byly tedy 3 vzorky, u ostatních vzorků byly výsledky jednoznačně negativní.

Tab. 1. Výsledky zkoumání *Cryptosporidium* spp. u zajíců

Výsledky zkoumání <i>Cryptosporidium</i> spp. u zajíců	
Oblasti	Výsledek
KLY TUHAŇ 15	0
ČEČELICE	0
Myslivecká společnost - Kostelec nad Labem - JIŘICE	0
MS KLY TUHAŇ	0
MS NOVÁ VES (Myslivecké sdružení DIANA)	0
Honitba DOLNÍ BEŘKOVICE (už. honitby DENDROM)	0
MS OBŘÍSTVÍ - LIBIŠ	0
MS VŠETATY - PŘÍVORY 21. 2. 2009 OBLAST MIKOV	0
Obříství Libiš, 24. 1. 2009	0
MS Cítov, 24. 1. 2009	0
MS VELKÝ BOREK, 24. 1. 2009	++ (5 x 5 mikrometrů)
MS Všetaty - Přívory, 25. 1. 2009	+ (5 x 5 mikrometrů)
HONITBA - OVČÁRY - NEDOMICE MS Dřísy - Ovčáry, 25. 1. 2009	0

Tab. 2. Výsledky v oblasti MS Velký Borek

MS VELKÝ BOREK, z 24. 1. 2009		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1	Skuhrov	+ (5x5 mikrometrů)
2	Rybník	0
3	Trafika	0
4	Velký Borek	0
5	Dolík	0
6	Předplatilov	0
7	Vrutice	0
8	Obrázek	0
9	Bílá Břeha	+ (5x5 mikrometrů)
10	Trojúhelník	0

Tab. 3. Výsledky v oblasti MS Všetaty – Přívory (25. 1. 2009)

MS Všetaty - Přívory, z 25. 1. 2009		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1	U lesíka	+ (5x5 mikrometrů)
2	Vítový trní	0
3	Střelnice	0
4	Míkov	0
5	Pod hřbitovem	0
6	Pod kvohýnkami	0
7	Na dobech	0
8	U jezírka	0
9	Prasečák	0
10	Soutok	0
11	Amerika	0
12	Přívory-Míkov	0
13	Stráň	0
14	Stráň (žlutý štítek)	0
15	Záblat'	0
16	U kanálu	0
17	Oblast u kanálu	0
18	Oblast u kanálu	0
19	Oblast u kanálu	0
20	Oblast u kanálu	0
21	Oblast u kanálu	0
22	Oblast u kanálu	0
23	Oblast u kanálu	0
24	Oblast u kanálu	0

Tab. 4. Výsledky v oblasti MS Všetaty – Přívory (21. 2. 2009)

MS VŠETATY - PŘÍVORY 21. 2. 2009 OBLAST MIKOV		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1		0
2		0
3		0
4		0
5		0
6		0
7		0
8		0
9		0
10		0

Tab. 5. Výsledky v oblasti Kly Tuhaň 15

KLY TUHAŇ 15		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1		0
2		0
3		0
4		0
5		0
6		0
7		0
8		0
9		0
10		0
11		0
12		0
13		0
14		0
15		0
16		0
17		0
18		0
19		0
20		0
21		0
22		0
23		0
24		0

Tab. 6 Výsledky v oblasti Kly Tuhaň

MS KLY TUHAŇ		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1	Kelštice	0
2	Travní cesta	0
3	Travní cesta	0
4	Travní cesta	0
5	Travní cesta	0
6	Travní cesta	0
7	Travní cesta	0
8	Travní cesta	0
9	Travní cesta	0
10	Travní cesta	0
11	Travní cesta	0
12	Travní cesta	0

Tab. 7 Výsledky v oblasti MS Obříství Libiř

MS OBŘÍSTVÍ - LIBIŘ		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1	Amorák	0
2	U trati	0
3	Vackův vrh	0
4	Bažantnice	0
5	Sempre	0

Tab. 8 Výsledky v oblasti t Obříství Libiř (24. 1. 2009)

Obříství Libiř, 24. 1. 2009		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1	U tratě	0
2	Sempre	0
3	U slepičárny	0
4	U dubku	0
5	U amoráku	0
6	Pod šibeníkem	0

Tab. 9 Výsledky v oblasti Čečelice

ČEČELICE		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1		0
2		0
3		0
4		0
5		0
6		0
7		0
8		0
9		0
10		0

Tab. 10 Výsledky v oblasti MS Nová Ves

MS NOVÁ VES (Myslivecké sdružení DIANA)		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1	Mez u cesty	0
2	Halačka	0
3	Vepř. Hora	0
4	Za luka	0
5	Škarecernov	0

Tab. 11 Výsledky v oblasti Honitby Dolní Beřkovice

Honitba DOLNÍ BEŘKOVICE (už. honitby DENDROM)		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1	Vlíněves - pole	0
2	Vlíněves - baraba	0
3	Vlíněves - kukuřice u kůlny	0
4	Vlíněves - od kůlny k domku	0
5	D. Beřkovice JOSEFKA	0
6	D. Beřkovice PODJEZD	0
7	Počaply KOVAŠTA 2	0
8	D. Beřkovice CUKROVAR	0
9	D. Beřkovice LIPOVÁ ALEJ	0
10	STROSKOVIŠTĚ 1	0
11	1) POLE D. BEŘ. - P. SRBA	0
12	2) POLE D. BEŘ. - P. SRBA	0

Tab. 11 Výsledky v oblasti MS Cítov (24. 1. 2009)

MS Cítov, 24. 1. 2009		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1		0
2	lokalita ZA DVOREM	0
3		0
4		0
5	lokalita POD VSÍ	0
6		0
7	lokalita K MEZODOLŮM	0
8		0
9		0
10	lokalita K LIBKOVICŮM	0

Tab. 12 Výsledky v oblasti Honitby Ovčáry Nedonice

HONITBA - OVČÁRY - NEDONICE		
MS Dřísy - Ovčáry, 25. 1. 2009		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1	na dálnici	0
2	na dálnici	0
3	u domku	0
4	u domku	0
5	pod Zvonkovými	0
6	pod Zvonkovými	0
7	za Cikánem	0
8	za Cikánem	0
9	za Cikánem	0
10	nad kravínem	0

Tab. 13 Výsledky v oblasti MS Kostelec n. Labem

Myslivecká společnost - Kostelec nad Labem - JIŘICE		
číslo vzorku	pojmenování vzorku	nález (velikost)
1	Rybníčka - strouha	0
2	Opičák - topinambury	0
3	Topolák - zásyp	0
4	Za nádražím - Koleje	0
5	Opičák - sloh	0
6	Melingrác - kravína	0
7	Rybníčka - zásyp	0
8	Melingrác - koleje	0
9	Za nádražím - zásyp	0
10	Rybníčka - zahrada	0
11	Melingrác - střed	0
12	Vinice 2	0
13	Skládka - Mratín	0
14	Vinice 1	0
15	Melingrác - zásyp	0
16	Rabníčka - můstek	0
17	Rákos - Mr. Potok	0
18	Opičák - kazatelna	0
19	Truky	0
20	Melingrác - triangl	0

### Statistické hodnocení

Relativní četnost hodnoceného znaku (výskyt *Cryptosporidium* spp.) u výběrového souboru je spočtena podle vzorce:

$$f_1 = \frac{n_1}{n} \quad \text{vz. 1} \quad f_1 = \frac{3}{142} \quad f_1 = 0,02113$$

Relativní četnost výskytu kryptosporidií u zkoumaných zajíců je 0,02113, tedy 2,113%.

## 5. Diskuse

Kryptosporidie byly nalezeny jen ve třech vzorcích. Je to velmi malé množství. Důvodem by mohlo být nedostačující obarvení.

Chyby by mohly být v jakékoliv části postupu. Jeden z důvodů by mohl být v dlouhém uskladnění vzorků. Vzorky byly odebírány v průběhu ledna a února 2009 a barvení bylo provedeno až od března do května. Některé vzorky byly při barvení velmi tuhé a vyschlé. S těmito výkaly bylo těžké pracovat, protože se dali jen velmi špatně rozetřít na podložní sklíčko. Podobné problémy byly se vzorky, kde se nacházely částičky písku či jiného materiálu. Další chyba by mohla být ve špatném obarvení vzorků. I když roztoky použité při barvení byly většinou čerstvé, chyba se mohla stát v samotném procesu barvení, při nepřesném dodržení doby, či v neodborné manipulaci. Dalším faktorem chyb může být má nezkušenost při mikroskopování tak malých a hůře rozpoznatelných organismů.

Použitá metoda patří mezi jednodušší, co se týče techniky, a tudíž i mezi finančně méně náročné metody. Na druhou stranu je při ní potřeba určitá zkušenost a dovednost přesně rozpoznat mikroorganismy. Nejspíš by bylo lepší použití elektronového mikroskopu a imunofluorescenčních metod. To je ale sporné díky špatné kvalitě některých vzorků.

Doposud nebyly zveřejněny žádné zprávy o výskytu rodu *Cryptosporidium* spp. u zajíců. Tato práce tudíž nemůže být konfrontována s jinými podobnými pracemi.

Je vůbec otázkou, zda by výskyt kryptosporidií u zajíců nějak výrazně ovlivňoval jejich stavy. Jak již bylo uvedeno, největší problémy znamenají pro populace zajíce, a to nejen u nás, antropogenní zásahy do krajiny. Infekce kryptosporidií u zajíců by zřejmě neměla takové následky, jako má již zjištěná kokcidióza. Významná by byla nejspíš, stejně jako u ostatních hostitelských zvířat, u mláďat, starších či oslabených jedinců.

Myšlenka, že by se *Cryptosporidium* spp. mohlo vyskytovat u zajíců je celkem logická. Vzhledem ke kosmopolitnímu rozšíření tohoto rodu a malé specifitě *Cryptosporidium parvum*, kde mohou být hostiteli i volně žijící zvířata včetně vysoké zvěře, se zdá, že by přenos na zajíce byl možný. Nasvědčují tomu i jednoduché způsoby přenosu a životaschopnost tohoto parazita. Zajíc jako samotář, který tvoří páry či malé skupinky v době rozmnožování, by byl dobrým přenašečem kryptosporidiózy. Usuzuji tak z toho, že bylo



zjištěno i přes jeho věrnost svému stanovišti, že se občas vydává na kratší i delší vzdálenosti. Vzhledem k výskytu zajíců téměř po celé České republice, by pak mohla být tato nákaza velmi rozšířena.

## **6. Závěr**

Kryptosporidie u zajíců byly nalezeny ve velmi malém množství, pouze ve 3 vzorcích z celkového počtu 142. *Cryptosporidium* spp. je velice rozšířený rod s dostatečnou rezistencí vůči dezinfekcím, vlhku a chladu. I když ohrožuje především mladé či imunodeficitní jedince, jeho projevy v podobě průjmů jsou pro ostatní také nepříjemné. Pokud by se potvrdil výskyt u zajíců, pak by přišly na řadu otázky, jak moc tento parazit zajíce ohrožuje. Vzhledem k tomu, že výskyt byl velmi malý a nebyly zjišťovány druhy ani genotypy kryptosporidií u zajíců, je nutné ještě další zkoumání.

## **7. Použitá literatura**

**Anděra M., Hanzal V. (1995):** ATLAS ROZŠÍŘENÍ SAVCŮ V ČESKÉ REPUBLICE, PŘEDBĚŽNÁ VERZE, I. SUDOKOPYTNÍCI (ARTIODACTYLA), ZAJÍCI (LAGOMORPHA), Národní muzeum, Praha, ISBN 80-7036-024-0

**Dawson D.(2003):** Foodborne protozoan parasite, International Life Sciences Institute Europe, Avenue E. Mounier 83, Box 6, B- 1200 Brussels, Belgium,40s., ISBN 1-57881-159-7

**Hobstová and collective of authors (2003):** Infection diseases, Charles University in Prague, The Karolinum Press, Prague 1, Ovocný trh 3, 257s., ISBN 80-246-0552-X

**Chroust K., Lukešová D., Modrý D., Svobodová V. (1998):** Veterinární protozoologie, Veterinární a farmaceutická Univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství, Ústav parazitologie, Brno, vydání 1., 113s., ISBN 80-85114-27-5

**Jurášek V., Dubinský P., Bírová V., Borošková Z., Breza M., Csizsmárová G., Čorba J., Goldová M., Hanzelová V., Juriš P., Kruciper I., Laciak V., Letková V., Nevole M., Peťko B. (1993):** Veterinárna parazitológia, Príroda a.s., Bratislava, vydání 1., 382s., ISBN 80-07-00603-6

**Kořínková K. (2006):** Obecná parazitologie: význam a biologie parazitů, Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Ústí nad Labem, vydání 1., 91 s., ISBN 80-7044-798-2

**Kučera O., Kučerová J. (2002):** Zajíc v přírodě a chov v zajetí, Matice lesnická, spol. s.r.o., Písek, vydání 1.,163s., ISBN 80-86271-10-2

**Kváč M. (2003):** Výskyt endoparazitóz u mladého skotu masných plemen, Disertační práce, Jihočeská Univerzita České Budějovice, Zemědělská fakulta.

**Rada R., Škoda L. (2001):** Zoologická encyklopedie, Savci, Ptakořitní, vačnatci, bércouni a hmyzožravci, letouni a letuchy, tany, primáti, chudozubí, luskáni, hrabáči a zajíci, Euromedia Group k. s., Praha, 160 s., vydání 1., ISBN 80-242-0481-9

**Schmidt G. D. a Roberts L. S. (2005):** Foundations of parasitology, McGraw-Hill, a business unit of The McGraw - Hill Companies, Inc., 1221 Avenue Americas, New York, NY 10020, ISBN 0-07-234898-4

**Taylor M. A., Coop R. L., Wall R. L. (2007):** Veterinary parasitology, Oxford; Ames, Iowa: Blackwell, vydání 3., 874 s., ISBN 978-1-4051-1964-1

**Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J., Votýpka J. (2007):** Paraziti a jejich biologie, Nakladatelství TRITON, vydání 1., ISBN 978-80-7387-008-9

**Zajac A. M., Conboy G. A. (2006):** Veterinary clinical parasitology, Blackwell Publishing, vydání 7., ISBN-13: 978-0-8138-1734-7

### **Elektronické zdroje**

**Armson A., Menon K., O'Hara A., MacDonald L. M., Read C.M., Sargent K., Thompson R. C. A., Reynoldson J. A. (2002):** Efficacy of oryzalin and associated histological changes in *Cryptosporidium*-infected neonatal rats, PARASITOLOGY, 125, s. 113 - 117, UNIV PRESS, 40 WEST 20TH ST, NEW YORK, NY 10011-4221 USA, ISSN: 0031-1820

**Bakheit M. A., Torra D., Palomino L. A., Thekiso O. M., Mbatia P. A., Ongerth J., Karanis P. (2008):** Sensitive and specific detection of *Cryptosporidium* species in PCR-negative samples by loop-mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated LAMP products by sequencing, Vet Parasitol., 158, s. 11 – 22, staženo z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (26.2.2010)

**Benitez A. J., Arrowood M. J., Mead J. R. (2009):** Functional characterization of the nucleotide binding domain of the *Cryptosporidium parvum* CpABC4 transporter: An iron-sulfur cluster transporter homolog, MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, Volume: 165, Issue: 2, Pages: 103-110, ELSEVIER SCIENCE BV, PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS, <http://www.elsevier.com>, ISSN: 0166-6851

**Betancourt W. Q., Rose J. B. (2004):** Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*, Veterinary Parasitology, 126, s. 219 – 234, staženo z [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)

**Bialek R., Binder N., Dietz K., Joachim A., Knobloch J., Zelck U. E. (2002):** Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimen, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 43, s. 283 – 288, ISSN: 0732 - 8893

**Bouzid M., Heavens D., Elwin K., Chalmers R. M., Hadfield S. J., Hunter P. R., Tyler K. M. (2010):** Whole genome amplification (WGA) for archiving and genotyping of clinical isolates of *Cryptosporidium* species, Parasitology, CAMBRIDGE UNIV PRESS, 32 AVENUE OF THE AMERICAS, NEW YORK, NY 10013-2473 USA, 137, s. 27 – 36, ISSN: 0031 - 1820

**Cole D. J., Snowden K., Cohen N. D., Smith R. (1999):** Detection of *Cryptosporidium parvum* in horses: thresholds of acid-fast stain, immunofluorescence assay, and flow cytometry, Journal of Clinical Microbiology, 37(2), s. 457-60, staženo z <http://www.PubMed.com>, 3. 11. 2007

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

**Fayer R. (2004):** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite, Veterinary Parasitology, 126, s. 37 – 56, staženo z [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)

**Fayer R. (2010):** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*, Experimental Parasitology, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA, 124, s. 90 - 97

**Feltus D. C., Giddings C. W., Schneck B. L., Monson T., Warshauer D., McEvoy J. M. (2006):** Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin, J Clin Microbiol., 44, s. 4303 – 8, staženo z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (26. 2. 2010)

**Gissot M., Kim K., Schaap D., Ajioka J. W. (2009):** New eukaryotic systematics: A phylogenetic perspective of developmental gene expression in the Apicomplexa. International journal for parasitology, Volume: 39, Issue: 2, Pages: 145-151, ISSN: 0020-7519

**Gomez - Couso H., Fontan-Sainz M., Fernandez - Alonso J., Ares - Mazas E. (2009):** Excystation of *Cryptosporidium parvum* at temperatures that are reached during solar water disinfection, PARASITOLOGY, Volume: 136, Issue: 4, Pages: 393-399, ISSN: 0031-1820

**Hajdušek O., Ditrich O., Šlapeta J. (2004):** Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic, *Veterinary Parasitology*, 122, s. 183 – 192

**Hijjawi N. (2010):** *Cryptosporidium*: New developments in cell culture, *Experimental parasitology*, 124, s. 54 – 60, Academic press inc Elsevier science, 525 B ST, STE 1900, San Diego, CA 92101-4495 USA, ISSN: 0014-4894

**Hunter P. R., Thompson R. C. A. (2005):** The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*, *International Journal for Parasitology*, 35, s. 1181–1190, staženo z [www.elsevier.com/locate/ijpara](http://www.elsevier.com/locate/ijpara)

**Chako C. Z., Tyler J. W., Schultz L. G., Chiguma L., Beerntsen B. T. (2010):** Cryptosporidiosis in People: It's Not Just About the Cows, *Journal of veterinary internal medicine*, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA, 24, s. 37 – 43, ISSN: 0891 - 6640

**Chatterjee A., Banerjee S., Steffen M., O'Connor R. M., Ward H. D., Robbins P. W., Samuelson J. (2010):** Evidence for Mucin-Like Glycoproteins That Tether Sporozoites of *Cryptosporidium parvum* to the Inner Surface of the Oocyst Wall, *Eukariotic cell*, AMER SOC MICROBIOLOGY, 1752 N ST NW, Washington, DC 20036-2904 USA, 9, s. 84 – 96, ISSN: 1535 - 9778

**Jex, A. R., Gasser R. B. (2009):** Diagnostic and analytical mutation scanning of *Cryptosporidium*: utility and advantages , *EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS*, EXPERT REVIEWS, UNITEC HOUSE, 3RD FL, 2 ALBERT PLACE, FINCHLEY CENTRAL, LONDON N3 1QB, ENGLAND, <http://www.expert-reviews.com>, 9, s. 179-185, ISSN: 1473-7159

**Joachim A., Eckert E., Petry F., Bialek R., Dauschies A. (2003):** Comparison of viability assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts after disinfection, *Vet Parasitol.*, 111, s. 47 – 57, staženo z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (26.2.2010)

**Koompapong K., Sutthikornchai, C., Sukthana Y. (2009):** *Cryptosporidium* Oocyst Detection in Water Samples: Flootation Technique Enhanced with Immunofluorescence Is as

Effective as Immunomagnetic Separation Method, Korean journal of parasitology, KOREAN SOC PARASITOLOGY, SEOUL NATL UNIV COLL MEDI, 47, s. 353 - 357

**Kuczynska E, Shelton D. R. (1999):** Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils, Appl Environ Microbiol. 65(7), s. 2820 – 6, staženo z <http://www.PubMed.com>, 3. 11. 2007

**Lalancette C., Di Giovanni G. D., Prevost M. (2010):** Improved Risk Analysis by Dual Direct Detection of Total and Infectious *Cryptosporidium* Oocysts on Cell Culture in Combination with Immunofluorescence Assay, Applied and environmental mikrobiology, AMER SOC MICROBIOLOGY, 1752 N ST NW, Washington, DC 20036-2904 USA, 76, s. 566 – 577, ISSN: 0099 - 2240

**Li X., Atwill E. R., Dunbar L. A., Tate K. W. (2010):** Effect of Daily Temperature Fluctuation during the Cool Season on the Infectivity of *Cryptosporidium parvum*, Applied and enviromental mikrobiology, AMER SOC MICROBIOLOGY, 1752 N ST NW, Waschingon, DC 20036-2904 USA, 76, s. 989 – 993, ISSN: 0099 - 2240

**Madrid-Aliste C. J., Dybas J. M., Angeletti R. H., Weiss L. M., Kim K., Simon I., Fiser A. (2009):** EPIC-DB: a proteomics database for studying Apicomplexan organisms, staženo z <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/38>, 27.10.2009

**Majewska A. C., Werner A., Sulima P., Luty T. (1999):** Survey on equine cryptosporidiosis in Poland and the possibility fo zoonotic transmission, Ann Agric Environ Med, 6, s. 161 – 165

**Millar B. Ch., Finn M., Xiao L., Lowery C. J., Dooley J. S. G., Moore J. E. (2002):** *Cryptosporidium* in foodstuffs — an emerging aetiological route of human foodborne illness, Trends in Food Science &Technology, 13, s. 168 – 187, staženo z [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com)

**Murugkar S., Evans C. L., Xie X. S., Anis H. (2009):** Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites, INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY, Volume: 39, Issue: 2, Pages: 175-189, ELSEVIER SCI LTD, THE BOULEVARD, LANGFORD LANE, KIDLINGTON, OXFORD OX5 1GB, OXON, ENGLAND, <http://www.elsevier.com>, ISSN: 0020-7519

- Ordóñez C., Alfonso J., Balaña-Fouce R, Ordóñez D (2009):** Functional Expression of a DNA-Topoisomerase IB from *Cryptosporidium parvum*, Departamento de Ciencias Biomédicas (INTOXCAL), Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain, Journal of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2009 (2009), Article ID 837608, 9 pages doi:10.1155/2009/837608 Research Article
- Perryman L. E., Bjorneby J. M. (1991):** Immunotherapy of cryptosporidiosis in immunodeficient animal-models, JOURNAL OF PROTOZOOLOGY, 38 (6), s. 98 - 100, SOC PROTOZOOLOGISTS, 810 E 10TH ST, LAWRENCE, KS 66044, ISSN: 0022-3921
- Pilarczyk B., Balicka-Ramisz A. (2002):** Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in farm animals in Western Pomerania, Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, ISSN 1505-0297
- Rosignol J. F. (2010):** *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment options and prospects for new drugs, Experimental parasitology, 124, s. 45 – 53, Academic press inc Elsevier science, 525 B ST, STE 1900, San Diego, CA 92101-4495 USA, ISSN: 0014 - 4894
- Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A. A., Pavlasek I. (2003):** Identification of Novel *Cryptosporidium* Genotypes from the Czech republic, Applied and Environmental Microbiology, s. 4302 – 4307
- Shahiduzzaman M., Dyachenko V., Obwaller. A., Unglaube S., Dauschies A. (2009):** Combination of cell culture and quantitative PCR for screening of drugs against *Cryptosporidium parvum*, VETERINARY PARASITOLOGY, svazek 162, č. 3-4, s. 271 - 277, ELSEVIER SCIENCE BV, PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS, <http://www.elsevier.com>, ISSN: 0304-4017
- Shahiduzzaman M., Dyachenko V., Keidel J., Schma"schke R., Dauschies A. (2010):** Combination of cell culture and quantitative PCR (cc-qPCR) to assess disinfectants efficacy on *Cryptosporidium* oocysts under standardized conditions, Veterinary Parasitology, 167, s. 43 – 49, staženo z [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar) (26.2.2010)
- Skotarczak B. (2009):** Methods for parasitic protozoans detection in the environmental samples, Parasite, Department of Genetics, University of Szczecin, al. Piastów 40b, 71-065



Szczecin, Poland, 16, s 183 – 190, staženo z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (26.2.2010)

**Wang C. M., Wu Y. Y., Qin J. H., Sun H. X., He H. X. (2009):** Induced Susceptibility of Host Is Associated with an Impaired Antioxidant System Following Infection with *Cryptosporidium parvum* in Se-Deficient Mice, PLOS ONE, 4, číslo článku e4628, PUBLIC LIBRARY SCIENCE, 185 BERRY ST, STE 1300, SAN FRANCISCO, CA 94107 USA, ISSN: 1932 - 6203

**Xiao L., Sulaiman I. M., Ryan U. M., Zhou L., Atwill E. R., Tischler M. L., Zhang X., Fayer R., Lal A. A. (2002):** Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health, International Journal for Parasitology, 32, s. 1773 – 1785

**Xiao L. H., Fayer R., Ryan U., Upton S. J. (2004):** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health, Clin Microbiol Rev. , 17(1), s. 72-97, staženo z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (26. 2. 2010)

**Xiao L. H. (2010):** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update, Experimental parasitology, Academic press inc Elsevier science, 525 B ST, STE 1900, San Diego, CA 92101-4495 USA, 124, s. 80 – 89, ISSN: 0014 - 4894

## 8. Přílohy

Tab. 1 Taxonomie kryptosporidií podle Fayera (2010).

<i>Cryptosporidium</i>	hostitel	druh hostitele	potvrzené primární umístění	autor
Ryby				
<i>Piscicryptosporidium cichlidis</i>	Tilapia	<i>Oreochromis niloticus and Tilapia zill</i>	žaludek	Paperna and Vilenken (1996)
<i>Piscicryptosporidium reichenbachklinkei</i>	Gourami	<i>Trichogaster leeri</i>	žaludek	Paperna and Vilenken (1996)
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Gilthead sea bream European sea brass	<i>Sparus auratus</i> <i>Dicentrarchus labrax</i>	žaludek	Alvarez-Pellitero and Sitjà-Bobadilla -2002
<i>Cryptosporidium scophthalmi</i>	Platýz	<i>Scophthalmus maximus</i>	střevo	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
Obojživelníci a plazy				
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Užovka červená	<i>Elaphe guttata</i>	žaludek	Levine (1980)
<i>Cryptosporidium varanii</i>	Varan smaragdový	<i>Varanus prasinus</i>	žaludek	Pavlásek et al. (1995)
<i>Cryptosporidium fragile</i>	Black- spined toad	<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	žaludek	Jirku et al. (2008)
Ptáci				
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Krocán	( <i>Meleagris gallopavo</i> )	střevo	Slavin (1955)
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Kur domácí	( <i>Gallus gallus</i> )	střevo	Current et al. (1986)
<i>Cryptosporidium galli</i>	Kur domácí	( <i>Gallus gallus</i> )	žaludek	Pavlásek (1999)
Savci				
<i>Cryptosporidium muris</i>	Myš ( <i>Mus musculus</i> )		žaludek	Tyzzler (1907)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Myš ( <i>Mus musculus</i> )		střevo	Tyzzler (1912)
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Morče ( <i>Cavia porcellus</i> )		střevo	Vetterling et al. (1971)
<i>Cryptosporidium felis</i>	Kočka ( <i>Felis catis</i> )		střevo	Iseki (1979)
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Tele ( <i>Bos taurus</i> )		žaludek	Lindsay et al. (2000)
<i>Cryptosporidium canis</i>	Pes ( <i>Canis familiaris</i> )		střevo	Fayer et al. (2001)
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Člověk ( <i>Homo sapiens</i> )		střevo	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>Cryptosporidium suis</i>	Prase ( <i>Sus scrofa</i> )		střevo	Ryan et al. (2004a)
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Tele ( <i>Bos taurus</i> )		neznámé	Fayer et al. (2005)
<i>Cryptosporidium fayeri</i>	Klokan ( <i>Macropus rufus</i> )		neznámé	Ryan et al. (2008)
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	Tele ( <i>Bos taurus</i> )		neznámé	Fayer et al. (2008)
<i>Cryptosporidium macropodum</i>	Klokan ( <i>Macropus giganteus</i> )		neznámé	Power and Ryan (2008)

Tab. 2 Druhy a genotypy kryptosporidií identifikované molekulárními metodami u chycených a divoce žijících placentálních savců podle Fenga (2010)

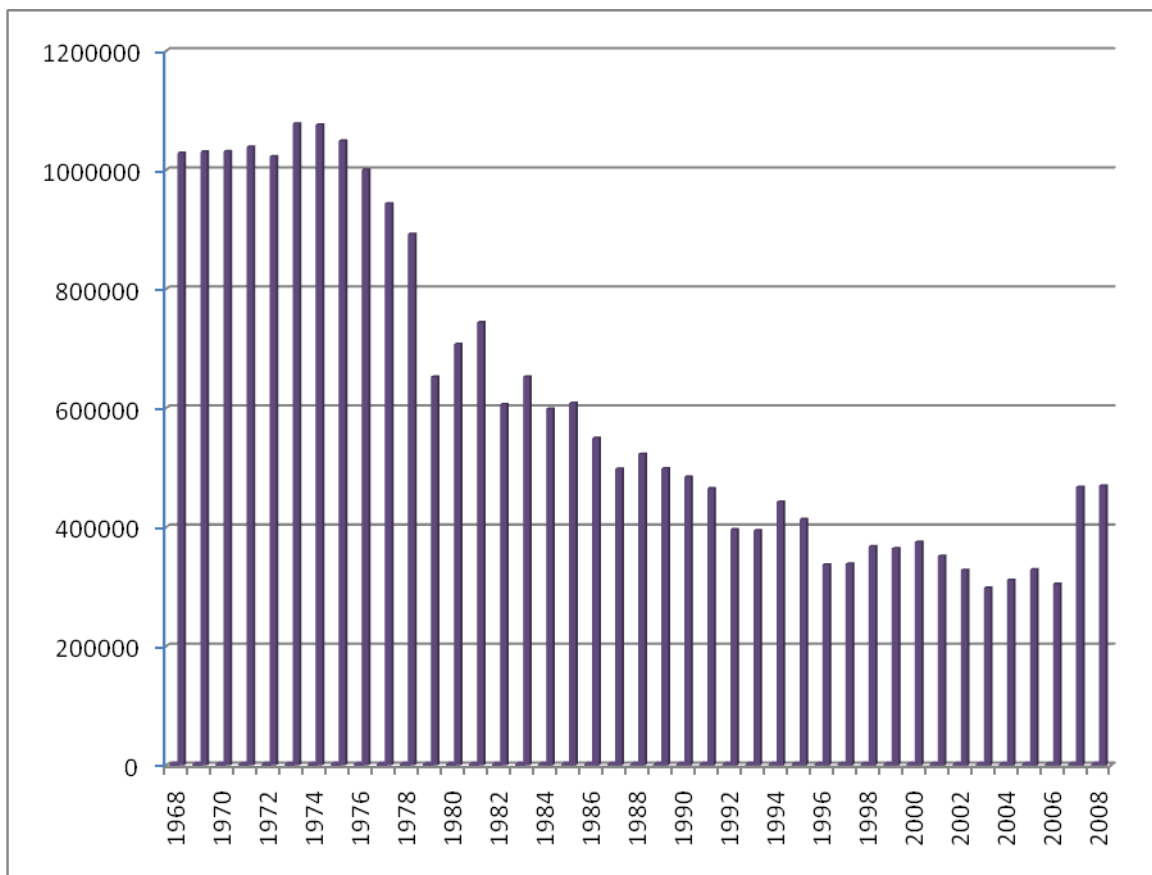
<i>Cryptosporidium</i> species and genotypes identified by molecular method in captive and wild placental mammals.		
Species/genotypes	Host speciesa	Reference
<i>C. parvum</i>	House mouse (5), wood mouse (2), eastern gray squirrel (1), Siberian chipmunk (1), nutria(1), capybara(8), raccoon dog (2), grey wolf (5), Prezewalski's wild horse (1), white-tailed deer (1), red deer (1), addax (3), Arabian oryx (4), gemsbok (3), sable antelope (1), mountain gorilla (4)	Morgan et al. (1999), Torres et al. (2000), Perz and Le Blancq (2001), Ryan et al. (2003), Hajdusek et al. (2004), Abe et al. (2006), Feng et al. (2007a), Meireles et al. (2007); Matsubayashi et al. (2004)
<i>C. muris</i>	House mouse (3), eastern gray squirrel (1), golden hamster (1), rock hyrax (1), large-footed mouse-eared bat (1), bactrian camel (1), Japanese field mouse (2), ringed seal (1), East Africa mole rat (1)	(Fayer et al., 1991; Morgan et al., 1999; Xiao et al., 1999, 2002; Nakai et al., 2004; Hikosaka and Nakai, 2005; Santin et al., 2005; Kvac et al., 2008b)
<i>C. andersoni</i>	Bobak marmota (3), European wisent (1), bactrian camel (2)	(Ryan et al., 2003)
<i>C. meleagridis</i>	Deer mouse (1)	(Feng et al., 2007a)
<i>C. canis</i> fox genotype	Fox (7)	(Zhou et al., 2004)
<i>C. canis</i> coyote genotype	Coyote (2)	(Xiao et al., 2002; Zhou et al., 2004)
<i>C. canis</i> dog genotype	Dog (2), fox (1)	(Xiao et al., 2002)
<i>C. bovis</i>	Yak (1)	(Feng et al., 2007b)
<i>C. hominis</i> monkey genotype	Rhesus monkey (2)	(Xiao et al., 2002)
Mouse genotype I	House mouse (21), yellow-necked mouse (9), bank vole (12), common vole (12), red panda (1), leopard (1), takin (1), prairie bison (1)	(Morgan et al., 1999; Xiao et al., 2002; Bajer et al., 2003; Alves et al., 2005; Foo et al., 2007; Karanis et al., 2007)
Mouse genotype II	House mouse (11)	(Foo et al., 2007)
Cervine genotype	Deer mouse (1), Eastern gray squirrel (3), red squirrel (1), eastern chipmunk (2), North American beaver (2), woodchuck (1), raccoon (1), white-tailed deer (4), sika deer (2), ibex (1), blesbok (1), nyala (1), Coquerel's sifaka (4)	(Perz and Le Blancq, 2001; da Silva et al., 2003; Ryan et al., 2003; Feng et al., 2007a; Karanis et al., 2007; Wang et al., 2008a)
Deer genotype	White-tailed deer (5)	(Xiao et al., 2002; Feng et al., 2007a)
Deer mouse genotype I	Deer mouse (13)	(Xiao et al., 2002; Feng et al., 2007a)

Deer mouse genotype II	Deer mouse (3)	(Xiao et al., 2002; Feng et al., 2007a)
Deer mouse genotype III (W1)	Deer mouse (22), eastern gray squirrel (5)	(Feng et al., 2007a)
Deer mouse genotype IV (W3)	Deer mouse (21)	(Feng et al., 2007a)
Shrew genotype	Northern short-tailed shrew (2), ermine (1), wildebeest (1)	(Alves et al., 2005; Feng et al., 2007a)
Muskrat genotype I	Muskrat (25), boreal red-backed vole (4)	(Xiao et al., 2002; Zhou et al., 2004; Feng et al., 2007a)
Muskrat genotype II	Muskrat (12), meadow vole (2), white-footed mouse (1), Siberian chipmunk (1), white-tailed deer (1)	(Perz and Le Blancq, 2001; Xiao et al., 2002; Zhou et al., 2004; Feng et al., 2007a)
Skunk genotype	Striped skunk (2), raccoon (5), eastern gray squirrel (1), river otter (1)	(Xiao et al., 2002; Zhou et al., 2004; Feng et al., 2007a)
Vole genotype (W5)	Meadow vole (1)	(Feng et al., 2007a)
Chipmunk genotype I (W17)	Eastern chipmunk (1), red squirrel (2), eastern gray squirrel (1), deer mouse (3)	(Feng et al., 2007a; Kvac et al., 2008a)
Chipmunk genotype II	Eastern chipmunk (1)	(Feng et al., 2007a)
Beaver genotype	Beaver (1)	(Feng et al., 2007a)
Mink genotype	American mink (7), river otter (9)	(Feng et al., 2007a; Gaydos et al., 2007; Wang et al., 2008b)
Mongoose genotype	Banded mongoose (1)	(Abe et al., 2004)
Squirrel genotype	Ground squirrel (26)	(Atwill et al., 2004; Xiao et al., 2004)
Seal genotype I	Ringed seals (4)	(Santin et al., 2005)
Seal genotype II	Ringed seals (5)	(Santin et al., 2005)
Bear genotype	Black bear (1)	(Xiao et al., 2002)
Ferret genotype	Albino ferret (4), black-footed ferret (1), red squirrel (15)	(Xiao et al., 2002; Abe and Iseki, 2003; Kvac et al., 2008a)
Rabbit genotype	European rabbit (4)	(Xiao et al., 2002; Ryan et al., 2003)
Horse genotype	Prezewalski's wild horse (1)	(Ryan et al., 2003)
New genotype	Yak (1)	(Karanis et al., 2007)
New genotype	Reindeer (3)	(Siefker et al., 2002)

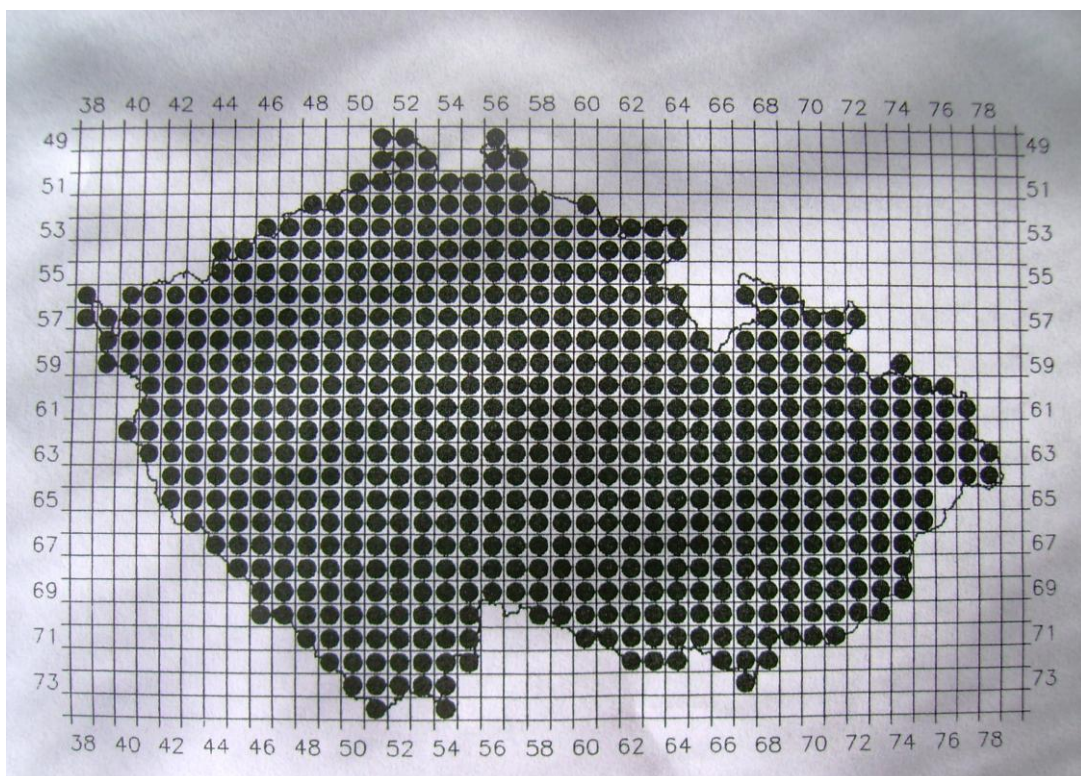
Tab. 3 Počty zajíců v ČR od roku 1968 do roku 2008, data stažena z <http://eagri.cz/>

Počet zajíců polních v ČR (1968 - 2008)	
1968	1028973
1969	1030858
1970	1031689
1971	1038935
1972	1023149
1973	1077831
1974	1076256
1975	1049101
1976	1000431
1977	943754
1978	892378
1979	652657
1980	707775
1981	744293
1982	606786
1983	652883
1984	598782
1985	608801
1986	549821
1987	498316
1988	523135
1989	498805
1990	484594
1991	465204
1992	396264
1993	394915
1994	442693
1995	413520
1996	337453
1997	338917
1998	368069
1999	364893
2000	375317
2001	351990
2002	328318
2003	298222
2004	311182
2005	329142
2006	304720
2007	467796
2008	469979

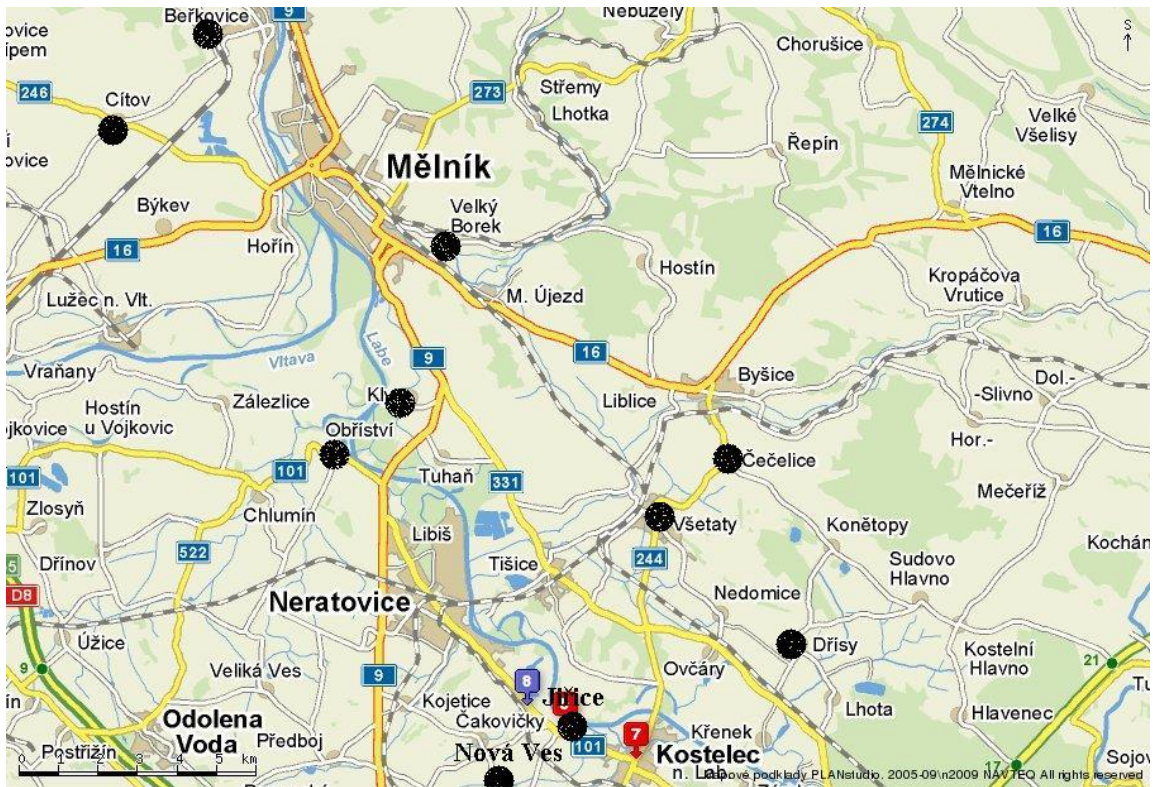
Graf. 1 Počty zajíců v ČR 1968 – 2008, data zpracovaná z <http://eagri.cz/>



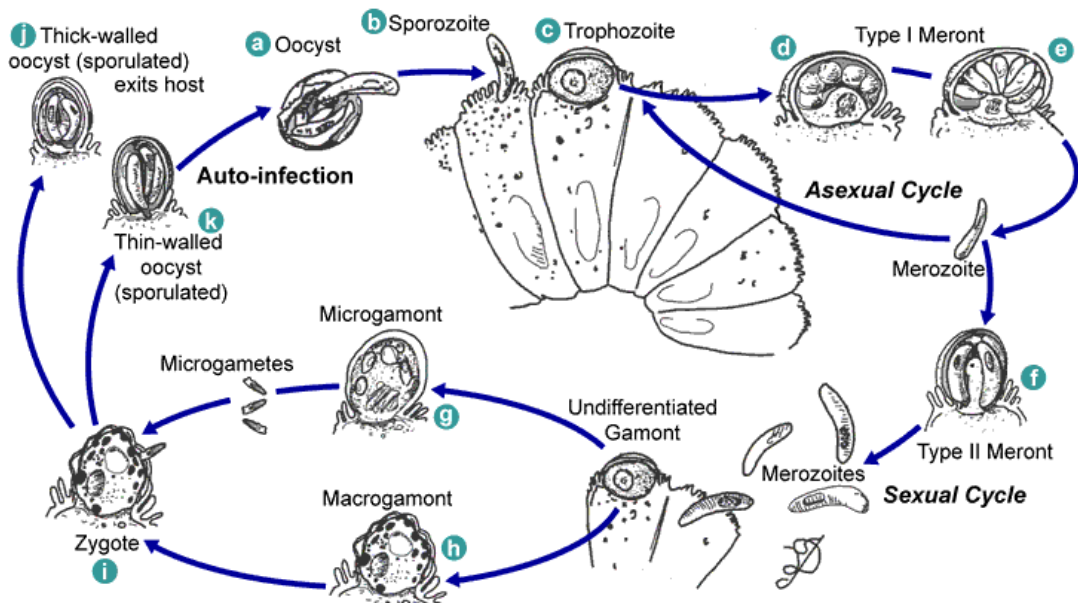
Obr. 1. Rozšíření zajíce polního (*Lepus Europaeus*) v ČR (Kučera, Kučerová 2002)



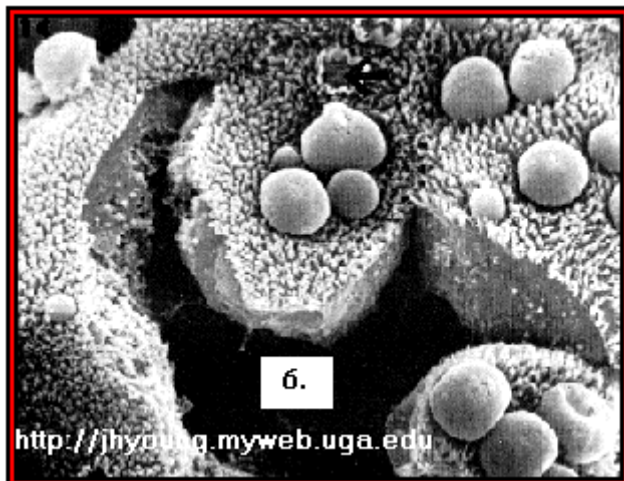
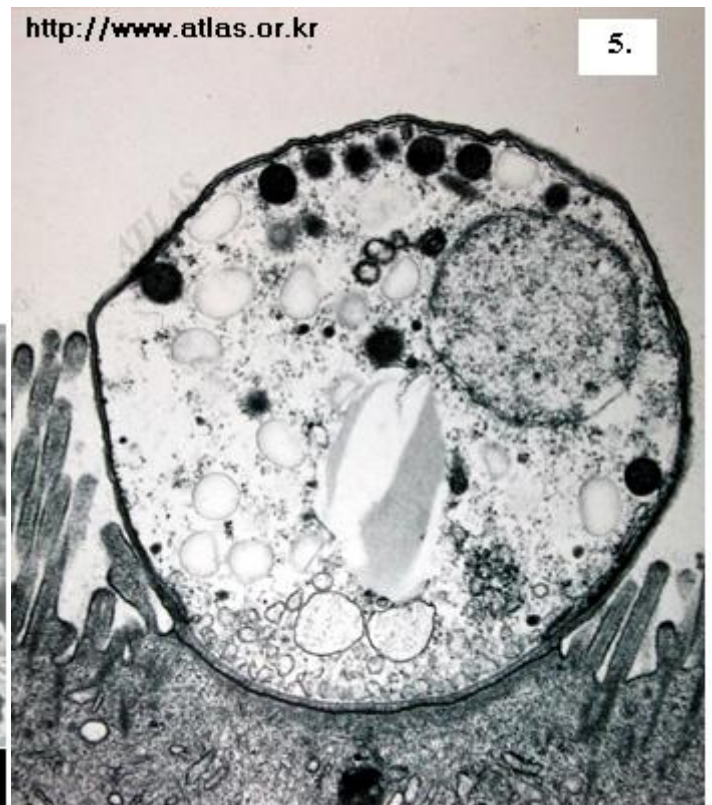
Obr. 2. Sledované oblasti v okolí města Mělník



Obr. 3. Vývoj kryptosporidií



Obr. 4., 5., 6., 7., 8. Oocysty kryptosporidií na epitelu střeva







Obr. 9., 10., 11. Sporozoiti uvolňující se z oocysty

