

MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDĚCKÁ FAKULTA

Ústav botaniky a zoologie



**Parazitární infekce kočkodanů v izolovaném ostrovním
ekosystému**

Bakalářská práce

Rok: 2007

Autor: Kateřina Heczková

Vedoucí : Doc. MVDr. David Modrý, PhD.

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce, doc. MVDr. Davidu Modrému, Ph.D. z Ústavu parazitologie FVL VFU v Brně za cenné odborné rady a připomínky, konzultantce Mgr. Kláře Petrželkové, PhD. Z Ústavu biologie obratlovců AV ČR za odbornou pomoc a trpělivost. V neposlední řadě patří dík celému kolektivu laboratoří na Ústavu parazitologie VFU v Brně, především MVDr. Janě Petrášové za odborné vedení v molekulárních technikách a Kateřině Pomajblíkové za ochotné vedení při mikroskopických technikách. Nakonec chci poděkovat celé své rodině, příteli Honzovi a Jiřímu Lýskovi za jejich podporu a trpělivost.

Prohlášení

Souhlasím s uložení této bakalářské práce v knihovně Ústavu botaniky a zoologie PřF MU v Brně, případně jiné knihovně MU, s jejím veřejným půjčováním a využitím pro vědecké, vzdělávací nebo jiné veřejně prospěšné účely, a to za předpokladu, že převzaté informace budou řádně citovány a nebudou využívány komerčně.

Datum:

Podpis:

SOUHRN

Bylo vyšetřeno 31 vzorků trusu od kočkodanů červenozelených (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*) volně žijících v izolovaném ostrovním ekosystému Rubondo s cílem determinovat přítomné intestinální parazity a potvrdit předpokládanou přítomnost *Blastocystis* sp. Použity byly koprologické postupy s mikroskopickým vyšetřením a molekulární vyšetření metodou PCR. Mikroskopicky byly nalezeny hlístice *Trichuris* sp. (35,5%), *Strongyloides* sp. (9,7%), blíže neurčená strongyloidní vajíčka (3,2%), *Ascaris* sp. (3,2%) a prvoci *Entamoeba* sp. (3,2%) a *Iodamoeba* (3,2%). Molekulárním vyšetřením PCR byla potvrzena přítomnost *Blastocystis* sp., přestože mikroskopicky se její přítomnost potvrdit nepodařilo. Zjištěné výsledky byly porovnány s daty o parazitech syntopicky žijících introdukovaných šimpanzů učenlivých (*Pan troglodytes*).

ABSTRACT

A total of 31 faecal samples of wild vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*) living in isolated island ecosystem of Rubondo (Tanzania) were examined. The aim was to determine intestinal parasites and to prove hypothetical presence of *Blastocystis* sp. Coprological methods with microscopic examination were used as well as the method of PCR molecular examination. By microscopic examination following helminths were found: *Trichuris* sp. (35,5%), *Strongyloides* sp. (9,7%), undetermined strongyloid eggs (3,2%), eggs of *Ascaris* sp. (3,2%) and protozoa *Entamoeba* sp. (3,2%) and *Iodamoeba* (3,2%). By molecular investigation PCR the presence of *Blastocystis* sp. was proved. Our results were compared with data on parasites of syntopic introduced chimpanzees (*Pan troglodytes*).

OBSAH

<u>1. ÚVOD</u>	1
<u>1.1. Parazité primátů</u>	1
<u>1.1.1. Jednobuňční parazité vyskytující se u primátů</u>	3
<u>1.1.2. <i>Blastocystis</i> sp.</u>	4
<u>1.1.3. Helminti vyskytující se u primátů</u>	4
<u>1.2. Parazité kočkodanů (rod <i>Cercopithecus</i> a <i>Chlorocebus</i>)</u>	5
<u>1.3. Využití kočkodanů pro vývoj vakcín v biomedicínském výzkumu</u>	6
<u>1.4. Charakteristika studovaného hostitele kočkodana obecného (<i>Chlorocebus aethiops</i>)</u>	7
<u>1.5. Parazité šimpanzů (rod <i>Pan</i>)</u>	8
<u>1.6. Přenosy parazitů mezi lidmi a ostatními primáty</u>	9
<u>1.7. Introdukce šimpanzů a dalších druhů na ostrov Rubondo</u>	11
<u>1.8. Cíle práce</u>	13
<u>2. MATERIÁL A METODIKA</u>	14
<u>2.1. Charakteristika studovaného území</u>	14
<u>2.2. Metodika sběru dat</u>	14
<u>2.3. Vyšetřování vzorků</u>	14
<u>2.3.1. Mikroskopické metody</u>	15
<u>2.3.2. Molekulární metody</u>	16
<u>3. VÝSLEDKY</u>	21
<u>3.1. Výsledky mikroskopického vyšetření</u>	21
<u>3.2. Výsledky molekulárních vyšetření</u>	24
<u>4. DISKUZE</u>	26
<u>5. ZÁVĚR</u>	30
<u>6. LITERATURA</u>	31
<u>7. PŘÍLOHY</u>	41
<u>PŘÍLOHA I</u>	42
<u>PŘÍLOHA II</u>	44
<u>PŘÍLOHA III</u>	47

1. ÚVOD

Studiem parazitů u primátů se dlouhodobě zabývá mnoho výzkumných skupin. Zjištěná data jsou důležitá nejen pro bližší poznání života těchto zvířat z pohledu veterinárního, fyziologického nebo etologického, ale i pro zkoumání možných zoonotických přenosů umožněných fylogenetickou příbuzností lidí a ostatních primátů. Toto ohrožení zdraví lidí, ale i zvířat při zpětné infekci, se stále zvětšuje kvůli rostoucí hustotě lidské populace.

K přenosům parazitů dochází i při nepřirozeném zásahu lidí do prostředí, příkladem mohou být introdukce zvířat na nová stanoviště. Introdukovaní živočichové si přinášejí vlastní parazitární infekce a zanášejí je mezi populace původních druhů. Dochází k rozšíření hostitelského spektra parazita, soužití původních zvířat s nepůvodními způsobuje i přenosy parazitů dříve druhově úzce specifických na nové hostitele.

Tato práce se zabývá parazity intestinálního traktu kočkodana červenozeleného (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*), žijícího v uzavřeném ekosystému ostrova Rubondo v Tanzánii, a diskutuje možnosti mezidruhového přenosu mezi původními kočkodany a introdukovanými šimpanzi žijícími na stejném ostrově.

Vedle vlastního výzkumu se práce opírá o odbornou literaturu, na jejímž základě popisuje možnosti přenosů parazitů mezi vybranými primáty a lidmi žijícími v jejich okolí.

V celé práci pro usnadnění používáme výraz primáti pro zástupce podřádu poloopic i vyšších primátů vyjma podčeledi lidé.

1.1. Parazité primátů

Endoparazité u primátů nejčastěji napadají gastrointestinální trakt. Nejvíce nalézáných parazitů patří mezi *Nematoda* (tab. 1). Typickými střevními parazity jsou zástupci rodů *Trichuris*, *Strongyloides*, *Subulura*, *Enterobius*, *Oesophagostomum*, *Physaloptera* a *Protozoa* rodů *Entamoeba*, *Giardia*. Zástupci třídy *Trematoda* se vyskytují v menší prevalenci, například *Dicrocoelium dentriticum*, z třídy *Cestoda* je to například rod *Bertiella* (YAMASHITA 1963, GILLESPIE et al. 2004).

Parazité gastrointestinálního traktu byli v rámci výzkumů vyšetřováni nejčastěji u šimpanzů (např. HASEGAWA et al. 1983, MUEHLENBEIN 2005) a paviánů (MUNENE et al. 1998),

dále pak u goril (LANDSOUNDS- SOUKATE et al. 1995), kočkodanů (McGREW et al. 1989), gueréz (GILLESPIE et al. 2005), mangabejů (MURIUKI et al. 1998).

Tab.1: Diverzita helmintů u vyšších primátů podle Natural History Museum v Londýně (upraveno, dle Vitona, 2004)

Parazit	Počet parazitických rodů	Počet parazitických druhů
Celkový počet	68	133
<i>Nematoda</i>	41	88
<i>Cestoda</i>	9	15
<i>Trematoda</i>	15	27
<i>Acanthocephala</i>	3	3

Spektrum a prevalence výskytu parazitů u primátů jsou ovlivněny mnoha faktory, například ročním obdobím, pohlavím, věkem jedince nebo preferovanou stravou jedince (např. PHILLIPPI & CLARKE 1992, VITONE et al. 2004). Významné rozdíly nacházíme i při porovnání prevalence parazitů u volně žijících a zajatých zvířat, například MUNENE et al. (1998) zmiňuje rozdíly mezi zajatými a volně žijícími kočkodany diadémovými (*Cercopithecus mitis*) a paviány anubi (*Papio anubis*). U všech skupin se nacházeli shodní parazité, výrazné rozdíly však byly nalezeny v prevalenci odlišně žijících populací. Volně žijící zvířata byla infikována v některých případech (*Oesophagostomum*, *Enterobius*, *Schistosoma mansoni*) třikrát až pětkrát více, než populace zvířat žijících v zajetí.

Dalším z faktorů ovlivňujících výskyt endoparazitů je vliv ročního období. Vliv srážek na přítomnost parazitů byl sledován například u šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*) v Mahale Mountains NP (Tanzánie). Zde došlo ke zvýšení prevalence *Oesophagostomum sp.* během období dešťů (KAWABATA & NISHIDA 1991; HUFFMAN et al. 1997), v Kibale NP (Uganda) došlo taktéž ke zvýšení prevalence *Troglodytella abrassarti*, *Endolimax nana*, *Strongyloides fulleborni* během období dešťů (KRIEF et al. 2005). Naopak McGREW et al. (1989) na Mt Assirik (Senegal) nezjistili žádné změny v prevalenci parazitů šimpanzů vlivem ročního období.

V práci PHILLIPPI & CLARKE (1992) byla u makaků v Puerto Rico zjištěna nejnížší prevalence výskytu potenciálně patogenních druhů helmintů (*Trichuris trichiura*, *Strongyloides fulleborni*, *Trichostrongylus sp.*) v nejteplejších měsících roku.

Vliv nadmořské výšky si pro svou studii vybrali APPLETON & HENZI (1992), kteří studovali paviány čajka (*Papio cynocephalus ursinus*) v Natalských horách jižní Afriky. Zde

sledovali změny v prevalenci parazitů ve specifických horských podmínkách a také na konci zimy. Výsledky této práce nepotvrdily zásadní vliv tohoto faktoru na studované parazity.

Další rozdíly ve frekvenci výskytu parazitů v trusu, tentokrát podle velikosti sociální skupiny, věku nebo pohlaví sledovala již výše zmíněná práce PHILLIPPI & CLARKE (1992) u makaků rhesus (*Macaca mulatta*). Autoři zjistili, že skupiny složené z mladých a starých jedinců mají vyšší prevalenci výskytu potenciálně patogenních parazitů (*Balantidium coli*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides fulleborni*, *Trichostrongylus*) než dospělci. Skupiny s gravidními a kojícími samicemi měly více nepatogenních parazitů. Kromě makaků sledovaly také paviány babuin (*Papio cynocephalus*), vřešťany pláštikové (*Alouatta palliata*), mangabeje pláštikové (*Cercocebus albigena*) a kočkodany diadémové (*Cercopithecus mitis*). U makaků byla zjištěna nejvyšší prevalence výskytu *Strongyloides papillosus* (nebo *fulleborni*) a *Oesophagostomum bifurcum* u jedinců do 3 let a také u samců. *Balantidium simile* a *Giardia lamblia* se nejčastěji vyskytovalo u makaků ve věku 4 - 6 let a nad 12 let. U samců byla potvrzena celkově vyšší prevalence výskytu sledovaných parazitů než u sledovaných samic.

Studován byl také vliv biotopu na množství přítomných parazitů. U vřešťanů žijících u řeky byla nalezena čtyřikrát vyšší prevalence výskytu *Strongyliodes* sp., než u vřešťanů žijících v suchých tropických lesích. Rozdíly jsou zřejmé i mezi různými druhy primátů, žijící ve stejném areálu a tedy využívající stejné zdroje (PHILLIPPI & CLARKE 1992).

Vliv velikosti těla, stravy, ale i délky světelného dne byl potvrzen i u primátů v práci VITONE et al. (2004) která dokládá, že typ stravy ovlivňuje prevalence hlístic v trávicím traktu. Zjistil také, že samotářský způsob života zvyšuje druhovou rozmanitost parazitů v trávicím traktu.

Další srovnávací testy výskytu parazitů u primátů podle biotopu, sociálních kontaktů, hustoty populace a typu stravy provedli NUNN et al. (2003).

1.1.1. Jednobuňeční parazité vyskytující se u primátů

Mezi prvoky, kteří se vyskytují u primátů můžeme zařadit například nálevníka *Balantidium*, prabičkovce *Giardia*, měňavky *Iodamoeba*, *Entamoeba* krevní kokcidie *Plasmodium* a jiné. Nejčastěji zmiňované druhy jsou *Balantidium coli*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*. U šimpanzů je běžným komenzálem nálevník *Troglodytella abrasarti*, přičemž u goril byly popsány další čtyři druhy nálevníků řazené do tří rodů *Gorillophilus*, *Troglodytella* a *Prototapirella*. (MURRAY et al. 2000, JURÁŠEK &

DUBINSKÝ 1993, LANDSOUND- SOUKATE et al. 1995, MURIUKI et al. 1998, FREEMAN et al. 2004, GILLESPIE et al. 2005).

1.1.2. *Blastocystis* sp.

Blastocystis sp. (příloha III., obr.g) patří mezi nejméně prozkoumané parazitární prvky šířené vodou. V posledních letech se podařilo prokázat jejich kosmopolitní výskyt, který je monitorován pro lékařské i veterinární dopady působení blastocyst. Vzhledem k malé velikosti cyst (3- 5 μm) i vakuolárních forem (4- 6 μm) je velmi obtížné blastocysty detekovat, vyšetřované vzorky mohou být falešně označeny za negativní (LEELAYOOVA et al. 2002). Při vyšetření mohou být také snadno zaměněny nebo nenalezeny, pokud nejsou vyšetřovány v dostatečně silné koncentraci (QUADRI et al. 1989, ZAMAN 1996, MOE et al. 1999, OK et al. 1999, TAAMASARI et al. 2002). Asi nejvhodnější metodou studia blastocyst jsou molekulární metody, které mají větší diagnostický potenciál a umožňují získat nové informace i ohledně taxonomie a zoonotického potenciálu (TAN 2004).

Blastocysty jsou polymorfní, protozoární organismy. Nejčastější formou je vakuolární, ale známá je i forma granulární, cystická, nevakuolární nebo multivakuolární. Velikost buňky se pohybuje od 2 do 200 μm , nejčastěji 4- 15 μm (STENZEL & BOREHAM 1996).

Cysty blastocyst jsou odolné vůči tlaku vody, nicméně jsou citlivé vůči extrémně vysokým teplotám, chladu a běžným desinfekčním prostředkům (ZAMAN et al. 1995, MOE et al. 1996). Vakuolární a granulární formy jsou naopak citlivé na rychlé změny teplot, hypotonické a hypertonické prostředí a expozici na vzduchu (MATSUMOTO et al. 1987, ZIERDT 1991).

Blastocysty se množí binárním dělením, schizogonií a pučením (GOVIND et al. 2002). Vzhledem k různorodosti buněk a nedostatku vhodných modelových organismů je životní cyklus blastocyst stále nejasný (TAN et al. 2002). Pravděpodobný průběh tohoto cyklu vytvořil ve své práci TAN (2004). Infekce u lidí a zvířat začíná pozřením cyst s potravou. Tyto cysty se vyvíjí ve vakuolární formy, následuje binární dělení. Některé buňky se encystují a zralé postupují pomocí vnější vláknité vrstvy trávicím traktem do vnějšího prostředí. Zde jsou pozřeny novým hostitelem.

Nejasné je také to, zda jsou blastocysty patogeny, komenzálové nebo oportunisté. Klinické symptomy infekcí blastocyst jsou nespecifické. Díky předchozím studiím je však zřejmé, že *Blastocystis* je velmi častý parazit s celosvětovou distribucí, přestože je jen málokdy pozorovatelný běžnými mikroskopickými metodami (PEGELOW et al. 1997, CIRIONI et al. 1999, TAAMASRI et al. 2002, HERWALDT et al. 2001, WINDSOR et al. 2002).

1.1.3. Helminti vyskytující se u primátů

U primátů nejčastěji parazitují zástupci kmene *Nematoda*. Mezi nematody vyskytující se v gastrointestinálním traktu primátů patří rody *Trichuris*, *Strongyloides*, *Enterobius*, *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus*, *Ascaris*, *Necator* a další. Nejčastěji diagnostikovány byly druhy *Trichuris trichiura*, *Strongyloides fulleborni*, *Enterobius vermicularis*, *Oesophagostomum spp.* (např. YAMASHITA 1963, McGREW et al. 1989, MUNENE et al. 1998, GILLESPIE et al. 2005).

1.2. Parazité kočkodanů (rod *Cercopithecus* a *Chlorocebus*)

U kočkodanů se vyskytují paraziti typičtí pro gastrointestinální trakt primátů: co se týče prvoků jedná se o prabičkovce *Giardia lamblia*, a měňavky *Entamoeba histolytica* a *Iodamoeba butschlii*; z hlístic je to *Trichuris trichiura*, *Strongyloides fulleborni*, *Enterobius* a další, z motolic *Dicrocoelium dentriticum*, z tasemnic *Bertiella* (např. McGREW et al. 1989, APPLETON et al. 1994, GILLESPIE et al. 2004).

KARERE & MUNENE (2002) vyšetřovali volně žijící kočkodany Brazzovy (*Cercopithecus neglectus*). Spolu s běžnými rody helmintů byla zaznamenána přítomnost prvoků *Entamoeba coli* ve 100% vyšetřovaných vzorků a příbuzný druh *Entamoeba histolytica* u 71,8% vyšetřovaných vzorků.

PHILLIPPI & CLARKE (1992) vyšetřovali intestinální parazity u kočkodana diadémového (*Cercopithecus mitis*) a mangabeje pláštikového (*Lophocebus albigena*), žijící ve stejném areálu a mimo jiné mezi nimi potvrdili možnost přenosů nalezených parazitů. Střevní parazity u kočkodana diadémového (*Cercopithecus mitis*) studoval také APPLETON et al. (1994) na jihu Afriky. U poddruhu *Cercopithecus mitis erythrarchus* bylo potvrzeno devět helmintů a žádný prvok, u poddruhu *Cercopithecus mitis labiatus* šest helmintů a pět prvoků.

Porovnání výskytu parazitů v trávicím traktu kočkodanů obecných v zajetí a volně žijících ostatních primátů provedl MUNENE et al. (1998). U kočkodanů byla prokázána nejvyšší prevalence u prvoka *Entamoeba coli* a u hlístic *Trichuris trichiura* a *Strongyloides fulleborni* u všech vyšetřených vzorků. Prevalenci výskytu gastrointestinálních parazitů u kočkodana černolícího (*Cercopithecus ascanius*) sledoval GILLESPIE et al. (2005) v neporušených a kácených lesích národního parku Kibale. V obou typech lesů byli nalezeni shodní parazité, prevalence výskytu parazitů u kočkodanů z káceného lesa však byla vyšší než u neporušeného lesa. Zde byly naopak nejčastěji objeveny druhy *Giardia lamblia* a *Chilomastix mesnili*.

Střevní parazity u volně žijícího kočkodana obecného (*Chlorocebus aethiops*) a kočkodana husarského (*Erythrocebus patas*) studoval McGREW et al. (1989) v Senegalu v Africe. Nalezeni byli převážně hlísti rodu *Strongyloides*, dále v menší prevalenci *Necator* sp., u kočkodana husarského i *Streptopharagus* a *Trichuris*. Výskyt prvoka *Entamoeba coli* byl prokázán u obou kočkodanů ve většině vyšetřovaných vzorků, v menší prevalenci byl zjištěn druh *Iodamoeba butschli*.

V západní Ugandě byli vyšetřováni kočkodani černolíci (*Cecropithecus ascanius*), diadémoví (*Cercopithecus mitis*) a obecní (*Chlorocebus aethiops*), nalezeny byly tasemnice rodu *Bertiella* a motolice čeledi *Dicrocoeliidae*, hlístice rodů *Oesophagostomum* a *Strongyloides* (GILLESPIE et al. 2004).

U kočkodanů potvrdil přítomnost blastocyst LEGESSE & ERKO (2004) nebo PARKAR et al. (2006), který vyšetřoval vzorky pomocí PCR.

Dalšími, i když méně se vyskytujícími parazity u kočkodanů jsou kokcidie *Cyclospora cercopitheci* nebo trichomonády *Pentatrichomonas hominis* (EBERHARD et al. 1999, LEVINE 1970).

1.3. Využití kočkodanů pro vývoj vakcín v biomedicínském výzkumu

Kočkodani jsou pro svou podobnost s lidskou anatomií, imunologií a fyziologií často užíváni jako modelové organismy při výzkumu vakcín proti leishmanióze a trypanozomiáze. Proto také tyto protozoární infekce patří k nejlépe prostudovaným. NGOTHO et al. (2006) popisuje vývoj vakcíny proti druhu *Trypanosoma brucei rhodesiense* na kočkodanu obecném (*Chlorocebus aethiops*). STERNBERG et al. (1998) popsal typické imunopatogenní jevy běžné pro onemocnění trypanozomiázou také u kočkodanů obecných (*Chlorocebus aethiops*), infikovaných *Trypanosoma brucei*.

Trypanosoma se vyskytuje u kočkodanů i v normálních podmínkách, například HERDER et al. (2002) pomocí metody PCR potvrdil různé druhy rodu *Trypanosoma* (*T. brucei*, *T. vivax*, *T. simile*, *T. brucei gambiense*, *T. congolense* lesního i savanového typu) ve střední Africe u divoce žijících zvířat, mezi nimi i u kočkodana bělonosého (*Cercopithecus nicticans*). Jako rezervoár tohoto parazita byli prokázáni i vyšetřovaní hlodavci, šelmy nebo mangabejové.

Dalším onemocněním, pro jehož výzkum jsou kočkodani obecní laboratorně využíváni je leishmanióza. Její kožní i orgánová forma byla sledována pro vývoj nových léků a vakcinace v práci OLOBO et al. (2001). Popisované symptomy po nakažení viscerální formou *Leishmania leishmania donovani* a *Leishmania leishmania infantum* zahrnovaly anemii,

vyskytovala se také granulózní zánětlivá ložiska různého stupně na vnitřních orgánech a kostní dřeni. BINHAZIM et al. (1993) dokládá, že nejvíce degenerativních změn probíhá na slezině.

Přenosem *Leishmania donovani* mezi lidmi a kočkodany se zabýval ve své práci GICHERU et al. (1995), který u tohoto druhu potvrdil skrytou formu onemocnění bez zjevných symptomů u infikovaného jedince. Zkoumány byly také imunologické interakce dvou parazitických druhů *Leishmania donovani* a *Leishmania major* na devíti pokusných kočkodanech zelených (GICHERU et al. 1995, GICHERU et al. 2001).

1.4. Charakteristika studovaného hostitele kočkodana obecného (*Chlorocebus aethiops*)

Kočkodan obecný (*Chlorocebus aethiops*) patří do podřádu vyšších primátů (*Anthropoidea*), nadčeledi úzkonosých (*Cercopithecoidea*), čeledi kočkodanovití (*Cercopithecidae*), podčeledi kočkodani (*Cercopithecinae*). Obývá místa od 45° zeměpisné šířky až k rovníku a do nadmořské výšky 3000 metrů. Je rozšířen v celé Africe. Délka těla je u samců 38 - 62 cm, u samic 50 - 65 cm, délka ocasu 48 - 75 cm. Hmotnost u samic je 3,5 - 5 kg, u samců 4 - 8 kg. Obličej tvoří černá maska, s bílým čelem a lícemi, srst je šedá, s olivově černým nádechem. Konec ocasu je červený, tlapy jsou tmavší než trup a končetiny. Šourek je tyrkysový nebo modrý.

Tito kočkodani tvoří skupiny v počtu 5 až 76 jedinců, nejčastěji kolem 25 členů. Mladí samci odchází z mateřských skupin do nejbližší tlupy v sousedství, samice ve skupině zůstávají. Pohlavní dospělost nastává u samic do třetího roku a u samců do čtvrtého roku života. Březost trvá 175 – 200 dnů a rodí se jedno mládě, které tělesně dospívá přibližně ve dvou letech

Žijí v prosvětlených lesích, nebo blízko vodních toků, na které jsou vázáni. Stejným dílem se pohybují jak ve větvích, tak i po zemi. Jsou velmi dobře adaptováni na permanentní sluneční záření, vysoké teploty nebo dehydrataci a během extrémního sucha nebo hladu snižují svou reprodukční aktivitu. Potravu tvoří listy i semena rostlin (*Acacia* sp., *Albizia* sp.), ovoce (fíky), výhonky, plody, natě a hmyz. Díky své ostražitosti a dobrému zraku se dokáží vyhnout predátorům, kterými jsou orlí, leopardi nebo další šelmy (KINGDON 2003).

Poddruhy kočkodana obecného:

Chlorocebus aethiops aethiops- kočkodan bělozelený

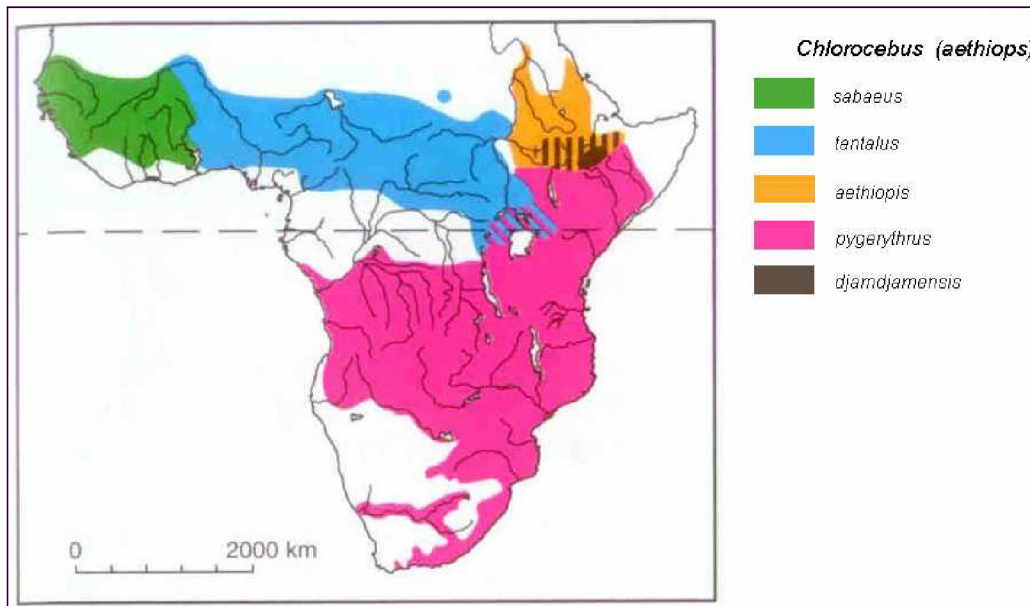
C. a. djamdjamensis- kočkodan d'amd'am

C. a. pygerythrus- kočkodan červenozelený

C. a. sabaesus- kočkodan zelený

C. a. tantalus- kočkodan tantalus

Obr.1: Mapka areálů výskytu poddruhů kočkodana obecného (upraveno, podle Kingdon 2003).



1.5. Parazité šimpanzů (rod *Pan*)

Soupis všech nalezených parazitů a komezálů pro šimpanze (*Pan*) vytvořili MEYERS & KUNTZ (1965, 1969, 1972).

Nicméně výzkumem střevních parazitů u volně žijících šimpanzů (*Pan troglodytes schweinfurthii*, Gombe, Tanzánie) se poprvé zabýval FILE et al. (1976). U vyšetřovaných jedinců bylo nalezeno šest helmintů (*Probstmayria gombensis*, *Strongyloides fulleborni*, *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp., *Abbreviata caucasica*, *Trichuris* sp.) a dva prvoci *Troglodytella abrassarti*, druhý nebyl determinován.

Ve volné přírodě jsou u šimpanzů nejběžnější prvoci rodů *Entamoeba*, *Iodamoeba*, *Endolimax*, z hlístic jsou to rody *Oesophagostomum*, *Strongyloides*, *Trichuris*, *Physaloptera*, *Ancylostoma*, *Necator* aj. Méně časté jsou tasemnice (*Bertiella*) a motolice (*Dicrocoelium*, *Concinnum*). (např. MCGREW et al. 1989, KAWABATA & NISHIDA 1991, LANDSOUD-SOUKATE et al. 1995, HUFFMAN et al. 1997, ASHFORD et al. 2000, MURRAY et al. 2000, KRIEF et al. 2005, MUEHLENBEIN 2005).

Kromě typických střevních helmintů jsou u šimpanzů velmi často pozorováni nálevníci rodu *Troglodytella*, druh *Troglodytella abrassarti* je u šimpanzů učenlivých (*Pan troglodytes*) typickým zástupcem. Nejvyšší prevalence nálevníka *Troglodytella* byla prokázána u šimpanzů *Pan troglodytes schweinfurthii* v národním parku Kibale v Ugandě. Druh *Troglodytella abrassarti* byl přítomen v 97,3% vzorků (MUEHLENBEIN 2005).

Některé práce se zabývaly také vlivem ročního období na parazity u studovaných šimpanzů. Změny v prevalenci a intenzitě infekce hlísticemi u šimpanzů během období sucha a dešťů sledovali McGREW et al. (1989), KAWABATA & NISHIDA (1991), HUFFMAN et al. (1997) a KRIEF et al. (2004), viz kapitola 1.1.

Minimum prací bylo doposud zaměřeno na výzkum intestinálních parazitů šimpanzů bonobo (*Pan paniscus*) ve volné přírodě. Byly studovány pouze populace v Lomako Forest (DUPAIN et al. v tisku) a Wamba (HASEGAWA et al. 1983) v Demokratické Republice Kongo. Mezi nejčastější parazity patřili hlístice *Strongyloides* sp., *Oesphagostomum* sp. a zástupci z čeledi *Ancylostomatidae*. Většina vzorků obsahovala nálevníky rodu *Troglodytella*. Přestože jsou naše znalosti o parazitech šimpanzech bonobo (*Pan paniscus*) výrazně menší než o parazitech šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*), ukazuje se, že na rozdíl od šimpanze učenlivého u něj byla zjištěna zvýšená prevalence motolic: 55% (HASEGAWA et al. 1983), 23% (DUPAIN et al. v tisku).

1.6. Přenosy parazitů mezi lidmi a ostatními primáty

Přenos infekčních onemocnění ze zvířat na člověka a obráceně je obecný fenomén a netýká se pouze primátů. Díky fylogenetické příbuznosti hostitelů je však počet infekčních agens přenášených mezi primáty a člověkem větší než v rámci kterékoli jiné skupiny živočichů. Změny v přirozených populacích primátů, fragmentace biotopů a nárůst a šíření lidské populace vedou ke zvýšené míře kontaktů mezi volně žijícími primáty a člověkem a přenášené infekce mohou mít potom výrazný dopad jak na populace primátů tak na populace lidské. Choroby původně pouze lidské, jako dětská obrna, tuberkulóza, svrab nebo respirační onemocnění, se tak stále častěji objevují u primátů (WOLFE et al. 1998). Jako příklad významných patogenů přenášených z primátů na člověka může sloužit virus ebola nebo tasemnice rodu *Bertiella* (CHAPMAN et al. 2005).

Přenos parazitárních onemocnění mezi primáty a lidmi byl sledován v několika pracích. Například LEGESSE & ERKO (2004) studovali na čtyřech lokalitách v Etiopii populace paviánů anubi (*Papio anubis*) a kočkodanů zelených (*Chlorocebus aethiops*), které využívaly stejné vodní zdroje jako místní obyvatelé. U těchto primátů byli nalezeni parazité *Blastocystis*

hominis, *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp., *Trichuris trichiura*, *Entamoeba coli*, *Trichostrongylus* sp. a další, kteří by mohli být přenášeni na domorodé obyvatelstvo. Sledování primátů měli přístup k lidským obydlím, odpadům i zdrojům vody a mohlo tedy docházet k oboustranným kontaminacím.

Prevenčí přenosů chorob se zabývali WALLIS & LEE (1999), kteří ve své práci zmiňují habituaci a reintrodukcii jako faktor usnadňující přenos infekcí mezi lidmi a primáty. Na několika lokalitách (Tanzánie, Uganda, Rwanda, Keňa, Costa Rica) sledovali infekce populací primátů žijících v blízkosti lidí (pracovníci parku, veterináři a turisté). U šimpanzů byl jako největší problém určen svrab (*Sarcoptes scabiei*), který se vyskytoval u 31% populace. Studování pavíani byli označeni jako hostitelé motolice *Schistosoma mansoni*, jejíž primární hostitel je člověk, nicméně primáty mohou být jejím rezervoárem.

Mezi nejintenzivněji studované primáty, co se týče přenosů chorob, patří horské gorily (*Gorilla beringei beringei*), do jejichž biotopů čím dál častěji zasahují lidé svojí činností. Obzvláště neustále rostoucí ekoturismus přináší spolu s turisty i nové infekce. V neposlední řadě mají vliv na rozšíření infekcí také zaměstnanci rezervací a národních parků. NIZEYI et al. (2002) například uvádí, že 15 kryptosporidiazou nakažených pracovníků z 19 členů personálu národního parku mělo intenzivní kontakt s místními gorilami, ale jen deset z nich dodržovalo hygienické požadavky. V tomto parku byla studována přítomnost *Cryptosporidium parvum*, jehož genotyp 2 způsobuje těžké průjemové onemocnění jak lidí, tak i u horských goril. Autor poukazuje také na to, že k omezení častých přenosů onemocnění by stačilo dodržování hygieny a vnitřních předpisů parku. Jako první studoval *Cryptosporidium* sp. u volně žijících horských goril právě NIZEYI et al. (1999), který popsal výskyt tohoto parazita u 73% lidoopů.

Přenášení infekce mezi lidmi a habituovanými gorilami ve své práci popisuje také GRACZYK et al. (2002a). Poukazuje na přenos *Giardia duodenalis* genotypu A usnadněný ekoturismem v Ugandě. Další studie zaměřená na tyto přenosy je z NP ve Rwandě, kde bylo nalezeno 19 mrtvých goril s poškozenými játry. U deseti z nich byla potvrzena *Capillaria hepatica*, která byla prokázána i u kočkodanů a šimpanzů v tomto NP. V tomto případě nebyl hlavní příčinou styk goril s lidmi, ale především přítomnost parazitárních rezervoárů přímo v dané lokalitě (GRACZYK et al. 1999).

Přenos parazita může být ovlivněn i faktory geografickými, ekologickými nebo sociálními, jak zmiňuje GRACZYK et al. (2002b) u mikrosporidie *Encephalitozoon intestinalis*, způsobující antropozoonózy ve společném biotopu lidí i goril.

Střevní faunu horských goril, žijících v blízkosti lidí v jihozápadní Ugandě studoval ASHFORD et al. (1990). Nalezl 16 parazitů, ale pouze jeden společný druh *Strongyloides*

fulleborni. LILLY et al. (2002) ve své práci studovali parazity u goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*), šimpanzů čego (*Pan troglodytes troglodytes*), mangabejů štíhlých (*Cercocebus agilis*) a lidí v Dzanga-Ndoki National Park ve Středoafričské republice. Nejvíce prevalentní byli *Strongyloides* sp. u goril v (90% případů). *Entamoeba coli*, *Balantidium coli* a *Iodamoeba butschlii* byli vysoce prevalentní u všech tří druhů sledovaných primátů. *Entamoeba histolytica* se vyskytovala ve 100% studované populace mangabejů. *Strongyloides* sp., *Entamoeba histolytica* a trichomonády se souběžně vyskytovali také u lidí, kteří se zvířaty přišli do styku.

V každém případě je ale třeba zmínit, že údaje o hostitelské specifitě a o přenosech parazitů mezi různými druhy primátů jsou velmi kusé. Ještě významnější je potom fakt, že v podstatě ve všech případech je identita parazitů z různých druhů primátů (včetně člověka) hodnocena pouze na základě nálezu morfologicky identických stadií a vlastní přenos byl prokázán jen ojediněle.

1.7. Introdukce šimpanzů a dalších druhů na ostrov Rubondo

Kočkodani, kteří byli v naší práci studováni, i šimpanzi, se kterými jsme je srovnávali, pocházejí z izolovaného ostrovního ekosystému Rubondo, viz kapitola 1.1.

V 60. letech, kdy stavy některých afrických savců klesaly, rozhodla se Frankfurtská zoologická společnost využít ostrov Rubondo jako útočiště pro tato ohrožená zvířata. Ostrov byl bezpečný, bez predátorů, s přirozenou hranicí a velkým množstvím neobsazených ekologických nik. Informace o vypuštěných jedincích jsou bohužel neúplné, jejich další sledování bylo minimální a současný stav populací těchto druhů není většinou dostatečně znám.

Výčet introdukovaných druhů zvířat:

- (1) 16 nosorožců dvourohých (*Diceros bicornis*), vypuštění v letech 1964-1965, jednalo se pravděpodobně o 7 samců a 9 samic ze Serengeti. V roce 1993 definitivně vyhubeni pytláky.
- (2) 12 žiraf (*Giraffa camelopardalis*), vypuštěny v roce 1965, původ a pohlaví neznámé. Žirafy se vyskytují pouze na jihu ostrova, novému prostředí se velmi dobře přizpůsobily a jejich počty vzrůstají
- (3) 20 guaréz pláštíkových (*Colobus guareza*), vypuštění v roce 1967, jednalo se o 5 samců a 15 samic z Mount Meru. Guarézy jsou pozorovány především na jihu ostrova, novému prostředí se velmi dobře přizpůsobily a jejich počty taktéž vzrůstají.

- (4) 5 antilop koňských (*Hippotragus equinus*), vypuštěny v roce 1967, 2 samci a 3 samice, původ neznámý. Tyto antilopy vymřely kvůli nevhodnému biotopu.
- (5) 14 antilopek pižmových (*Neotragus moschatus*), vypuštěny v roce 1971, jednalo se o 4 samce a 10 samic z Mount Meru. Antilopky jsou pozorovány pouze výjimečně, nicméně se zdá, že populace je stabilní a novému prostředí dobře přizpůsobená.
- (6) 4 dikobrazi, druh neznámý, vypuštěni v roce 1972, původ a pohlaví neznámé. Introdukce byla neúspěšná.
- (7) 6 slonů afrických (*Loxodonta africana*), 2 samci a 4 samice, v letech 1972 a 1973. Nyní je populace odhadována na 30 i více jedinců,
- (8) 37 papoušků šedých (*Psittacus erythacus*) v roce 2000 a 13 dalších v roce 2001, kteří pocházeli z chovů v Nairobi. Pět papoušků zahynulo během introdukce. U introdukovaných papoušků bylo pozorována hnízdění.
- (9) V letech 1966 až 1969 bylo vypuštěno také 17 šimpanzů (9 samic, 8 samců). Zvířata ve věku od 4 do 12 let pocházela z evropských zoologických zahrad, do kterých ale přišla z volné přírody. Někteří jedinci pocházeli z oblasti Sierra Leone a Guiney, jednalo se tedy o poddruh *Pan troglodytes verus*. Šimpanzi, kteří byli v rozdílném psychickém i fyzickém stavu, byli vypuštěni ve dvou skupinách, dále pak byli vypuštěni samostatně dva samci. Zvířata byla přikrmována pouze po dva měsíce a následný monitoring populace byl minimální. Někteří šimpanzi atakovali místní obyvatelstvo, a proto jeden nebo dva samci museli být odstřeleni (GRZIMEK 1970, BORNER 1985). Nicméně navzdory nepříznivým okolnostem, bylo již v 70. a 80. letech zřejmé, že šimpanzi se novému prostředí přizpůsobili, začali se rozmnožovat a vytvořili životaschopnou populaci (BORNER 1985). Podle posledních výzkumů tvoří populaci 40 jedinců druhé až čtvrté generace a dál se rozrůstá (MOSCOVICE et al. 2007, PETRŽELKOVÁ osobní sdělení).

1.8.Cíle práce

- 1) Provést koprologické vyšetření vzorků trusu kočkodanů získaných na ostrově Rubondo
- 2) Co nejpřesněji determinovat nalezené parazity
- 3) Porovnat spektrum parazitů kočkodana červenozeleného (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*) s daty o parazitech syntopicky žijící populace šimpanzů (*Pan troglodytes*)
- 4) Výsledky porovnat s podobnými studiemi na kočkodanech žijících na kontinentu
- 5) Diskutovat možnosti případných zoonotických přenosů nalezených parazitů mezi primáty a člověkem

2. MATERIÁL A METODIKA

2.1. Charakteristika studovaného území

Vyšetřované vzorky trusu kočkodana červenozeleného (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*) pocházely z ostrova Rubondo ve Viktoriině jezeře v Tanzánii (2° 18' s.š., 31° 50' v.d.). Vlastní ostrov má rozlohu 240 km² a spolu s dalšími menšími ostrovy a částí jezera byly vyhlášeny v roce 1977 za národní park. Ostrov leží ve výšce 1134 m nad mořem a asi 70% lokality je zalesněno. Nejčastějšími druhy stromů galeriového lesa jsou *Croton sylvaticus*, *Drypetes gerrardii* a *Lecaniodiscus fraxinifolius*, v hojném počtu jsou zastoupeny liány (MOSCOVICE et al. 2007). Pobřeží je lemováno papyrovými bažinami. Ve vnitrozemí se objevují volná travnatá prostranství, především v jižní části. Roční úhrn srážek je asi 1200 mm, s vrcholem v měsících březen - květen a listopad - prosinec. Průměrná roční teplota se pohybuje v hodnotách 19 - 26°C. Mezi původní druhy savců, které se na ostrově vyskytují, patří sitatunga (*Tragelaphus spekei*), lesoň (*Tragelaphus scriptus*) a hroch obojživelný (*Hippopotamus amphibius*). Kočkodan červenozelený (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*) je jediným původním druhem primátů na ostrově. Bohužel doposud neexistují žádná data o přesném rozšíření, odhadech početnosti či ekologii této ostrovní populace. Na ostrov bylo introdukováno několik dalších druhů, viz 1.7.

2.2. Metodika sběru dat

Vzorky trusu kočkodana červenozeleného (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*) byly sbírány v první polovině roku 2006 a to především v okolí lidských obydlí (správa NP, turistické chatky, dům FZS), v menší míře pak v lese během sledování šimpanzů. Vzorky tedy pocházejí od více skupin a více jedinců, přičemž byla věnována pozornost tomu, aby jeden jedinec nebyl vzorkován vícekrát. Čerstvý trus od jednotlivých kočkodanů byl sbírán do igelitových sáčků. Co nejdříve po návratu do tábora byly vzorky o velikosti lískového ořechu fixovány 10% formaldehydem do 8 ml vzorkovnic. Ke všem formalínovým vzorkům byly připraveny paralelní etanolové vzorky. Vzorkovnice byly označeny datem a místem nálezu.

2.3. Vyšetřování vzorků

Vyšetření vzorku se provádělo mikroskopickými a molekulárními metodami v laboratořích VFU Brno.

Nejprve byly vzorky podrobeny koprologickému vyšetření flotační metodou, poté sedimentační metodou MIF. V případě potřeby bylo použito barvení Lugolovým roztokem. Takto získaná stadia parazitů byla morfologicky posouzena světelnou mikroskopií, s využitím Nomarskiho kontrastu a fotografována digitální kamerou Olympus DP 70. Molekulární metody zahrnovaly izolaci DNA a vyšetření metodou PCR ve vzorcích.

2.3.1. Mikroskopické metody

Homogenizace vzorku pro vyšetření

Formalínové vzorky vytřepeme do třecí misky, přidáme fyziologický roztok.. Poté je rozmělníme přes jemné sítko do kónické vzorkovnice. Takto homogenizovaný roztok odstředíme po dobu 5 minut při 2000 otáčkách za minutu. Vzniklý supernatant slijeme a dále používáme pouze sediment, který doplníme 10% formaldehydem do objemu 10 ml. Z tohoto objemu odebereme 2 ml do zkumavky pro vyšetření metodou MIF a 2 ml do zkumavky pro cukernou flotaci vzorku.

Flotace

Flotace trusu je nejčastěji používaná koprologická metoda, s jejíž pomocí provádíme celkové parazitologické vyšetření trusu na parazitózy protozoárního a helmintózního původu. Je založena na principu použití flotačních roztoků, které mají vyšší specifickou hmotnost než běžné parazitické útvary. Při zpracování vzorku se různá stadia parazitů vyplaví na povrch obsahu zkumavky a zkoncentrují se v povrchové blance.

Postup

Do zkumavky ke 2 ml homogenizovaného vzorku přilijeme po horní rysku destilovanou vodu . Odstředíme 2 minuty při 2000 otáčkách za minutu. Supernatant odlijeme, doplníme modifikovaný Sheatherův roztok o hustotě 1,3 po horní rysku a znovu odstředíme, opět 2 minuty při 2000 otáčkách za minutu. Pro mikroskopické vyšetření sbíráme kličkou povrchovou blanku.

Metoda vyšetření vzorků MIF

Jde o mertiolát-jód-formalínovou koncentrační metodu, kde je principem fixace, barvení a koncentrace parazitů.

Postup

Do zkumavky nalijeme 2 ml předem homogenizovaného vzorku, přidáme 5 ml MIF roztoku, 6 ml etheru a 1 ml Lugolova roztoku. Vše protřepeme, centrifugujeme 2 minuty při 1500 otáčkách za minutu. Poté uvolníme vzniklý prstenec a slijeme až po sediment, který prohlédneme pod mikroskopem.

Příprava roztoku MIF:

50 ml vody

5 ml 40% formaldehydu

40 ml 0,1% roztoku methiolátu sodného

1 ml glycerinu

Složení Lugolova roztoku:

1 g krystalického jodu

2 g KI

100 ml vody

.3.2.Molekulární metody

Paralelní vzorky fixované v 96% etanolu jsme zhomogenizovali v třecí misce a rozdělili na tři části. Jednu třetinu vzorku jsme použili na izolaci DNA pomocí fenol- chloroformové extrakce, druhou třetinu vzorku jsme použili na izolaci DNA komerčně vyrobeným kitem a poslední třetina byla archivována. Vzorky byly před izolací očištěné od etanolu promýváním PBS pufrem.

Fenol- chloroformová extrakcePostup pro izolaci celkové DNA

1. Pelet (rozmělněný trus, zcentrifugovaný) resuspendujeme 3 ml NET 50, s 30% N-Lauroylsarcosinatem (Applichem) v celkové koncentraci 3 mg/ ml a pronázou E v celkové koncentraci 25 mg/ ml. Inkubace 1 h na ledu. Roztřepeme

Kombinace: 2 ml NET 50, 40µl pronáza, 240 µl N- Lauroylsarcosinat

3 ml NET 50, 60 µl pronáza, 360 µl N- Lauroylsarcosinat

4 ml NET 50, 80 µl pronáza, 380 µl N- Lauroylsarcosinat

2. K roztoku DNA, RNA a proteinů přidáme stejný objem fenolu, třepeme (lehce promícháme) 10 min. Roztřepeme.
3. Centrifugujeme 10 min, odebíráme vzniklou vodní fázi do čisté mikrozkušavky. Tento krok s fenolem opakujeme až do úplného vymizení proteinové vrstvy v interfázi. Poznámka: Na dně je sediment, střední část vodnatá a nejvrchnější bílá zpěněná část, která se odebírá.
4. Přidáme směs fenol- chloroform (1:1) toto důkladně mícháme 10 min. Centrifugujeme 10 min a opět odebereme vodní fázi do čisté mikrozkušavky.
5. Přidáme jen chloroform a důkladně mícháme 10 min, centrifugujeme, odebereme vodní fázi.
6. K této směsi přidáme 1/ 10 objemu 3M acetátu sodného (amonného) a 2x (2-3) objem Et OH o laboratorní teplotě (+ 1 µl glykogenu)
7. Promícháme a necháme srážet cca 10 min v -70°C
8. Centrifugujeme 15 min/ 14 000 otáček. Sediment opláchneme 200 µl ledovým 70% Et OH a centrifugujeme 5 min/ 14 000 otáček. Odsajeme přebytečný ethanol.
9. Pelet vysušíme (úplné odpaření ethanolu) a rozpustíme v TE pufru nebo PCR vodě, cca 50 µl.

QIAamp DNA Stool Mini Kit (50) (QIAGEN)

Postup

1. Do vzorkovnice doplníme ASL buffer
2. Roztřepeme do úplné homogenizace
3. Inkubujeme 5 min při 70°C, roztřepeme
4. Centrifugujeme 1 min na plný výkon
5. Do 2 ml mikrozkušavek přelijeme obsah, sediment vyhodíme
6. Do každého vzorku vložíme tabletu na pročištění
7. Homogenizujeme roztřepáním, do rozpuštění tablety
8. Inkubujeme 1 min při laboratorní teplotě
9. Centrifugujeme 3 min na plný výkon
10. Odpipetujeme celý supernatant do nové 1,5 ml mikrozkušavky, pelet vyhodíme
11. Centrifugujeme 3 min na plný výkon
12. Do nových mikrozkušavek odpipetujeme 25 µl proteinázy, přidáme supernatant a 600 µl buffru AL
13. Roztřepeme 15 sec
14. Inkubujeme 10 min při 70°C

15. Přidáme 600 μ l 96% etanolu, roztřepeme
16. Celý lyzát dáme po částech do kolon s filtrem, vždy centrifugujeme 1 min na plný výkon a následně doplníme zbytek lyzátu
17. Přidáme 500 μ l AW1, centrifugujeme 1 min na plný výkon, vyměníme spodní část kolony
18. Na filtr přidáme 500 μ l AW2, centrifugujeme 3 min, zcentrifugovanou kapalinu vylijeme a znovu centrifugujeme 2 min, na sucho
19. Filtr vložíme do nové 1,5 ml mikrozkuhavky, na membránu napipetujeme 200 μ l AE
20. Inkubujeme 5 min při pokojové teplotě a centrifugujeme 1 min na plný výkon
21. Filtr vyhodíme, spodní část kolony s DNA uchováme

Příprava gelu

1. Do Ehrlenovy baňky odvážíme 0,45 g agarózy (Serva) a odměříme 60 ml TAE
2. Směs v mikrovlnné troubě ohříváme až do bodu varu a občas promícháme, dokud není čirá
3. Směs zchladíme pod tekoucí vodou
4. Poté připipetujeme 1 μ l Ethidium bromidu (Tp Bio) a směs promícháme
5. Poté nalijeme do formy na gel a vložíme hřeben
6. Agarózový gel se nechá tuhnout 15 min
7. Poté odstraníme hřeben a vložíme gel do elektroforézy, kam již můžeme aplikovat vzorky

Gelová elektroforéza

1. Na parafilm odpipetujeme 1 μ l loading bufferu a přidáme 15 μ l vzorku DNA
 2. Promíchanou kapku vneseme do dírky v agarózovém gelu
 3. Elektroforéza probíhala při 70 voltech a 20- 25 minut
- Agarózový gel jsme sledovali pod UV světlem Vilber-Lourmat (SCHOELLER) a fotograficky zdokumentovali fotoaparátem Vilber-Lourmat (SCHOELLER)

PCR

Je polymerázová řetězová reakce, pomocí níž dochází k namnožení stejného úseku DNA. Sekvence, které chceme znásobit, označujeme na začátku i konci přidáním specifických primerů.

Amplifikace 18S SSU u blastocyst:

Složení reakční směsi je uvedeno pouze v objemových jednotkách. DNA je extrahována s použitím kitu High pure PCR template preparation kit (ROCHE DIAGNOSTIC, GmbH).

Sterilní miliQ H ₂ O	doplnit do 50 µl
PCR pufr	5 µl
MgCl ₂	4 µl
DNTP mix	2,25 µl
Taq polymeráza	0,5 µl
F- primer MedlinA	2,25 µl
R-primer BhRDr	2,25 µl
DNA	3 µl

Nastavení teplotního cyklu:

1x	94°C	4 min	počáteční denaturace
30x	94°C	1 min	denaturace
	56°C	1 min	nasednutí primeru
	72°C	2 min 30 s	polymerace
1x	72°C	10-60 min	závěrečná polymerace

Použité primer Použili jsme univerzální a specifické primery pro amplifikaci 600 bp od 5' konce úseku malé podjednotky SSU- rDNA.

MedlinA (Medlin, 1989)-univerzální eukaryotický

5-CTG GTT GAT CCT GCC AG-3

BhRDr (Noel, 2005)-specifický pro *Blastocystis* sp.

5-GAG CTT TTA ACT GCA ACA ACG-3

3. VÝSLEDKY

Celkem bylo vyšetřeno 31 vzorků trusu od kočkodanů červozelených (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*). Nalezeni byli prvoci rodů *Iodamoeba* (příloha III, obr.a), *Entamoeba*

(příloha III, obr. b) a hlístice rodů *Trichuris* (příloha III, obr.c), strongyloidní vajíčka (příloha III, obr.d), blíže nespecifikované améby, *Strongyloides* (příloha III, obr.e) a *Ascaris* (příloha III., obr. f). Pět vzorků bylo potvrzeno jako pozitivní v obou koprologických metodách, osmnáct bylo negativních v obou metodách a osm bylo pozitivních pouze flotačně nebo metodou MIF. Více parazitárních rodů společně bylo nalezeno v pěti vzorcích.

Makroskopicky viditelní parazité nalezeni nebyli. Pomocí molekulárních diagnostik byl potvrzen předpokládaný výskyt *Blastocystis*, který nebyl mikroskopickými technikami vůbec zachycen. Pomocí PCR byly blastocysty potvrzeny ve dvaceti dvou vzorcích (příloha I.).

3.1. Výsledky mikroskopického vyšetření

Potvrzeno bylo 10 vzorků pozitivních při vyšetření flotací a 8 pozitivních při vyšetření metodou MIF. V následující tabulce srovnáváme prevalence výskytu parazitů v námi vyšetřovaných vzorcích s prevalence v pracích jiných autorů (tab. 2). Porovnali jsme také výsledky našich vyšetření kočkodanů s výsledky předchozí studie kočkodanů z Rubonda a s výsledky vyšetření šimpanzů (také z Rubonda), (tab. 3).

Tab. 2: Srovnání prevalence parazitů u kočkodana červenozeleného (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*) na různých místech. (1) ostrov Rubondo, mé výsledky, (2) GILLESPIE et al, 2004, (3) MURIUKI et al., 1998, (4) MUNENE et al., 1998, (5) MCGREW et al., 1989, (6) LEGESSE et al., 2004.

Oblast / Parazit	Tanzanie ¹	Uganda ²	Keňa ³	Keňa ⁴	Senegal ⁵	Etiopie ⁶
<i>Balantidium coli</i>			29,3%	30%		
<i>Blastocystis hominis</i>						34,2%
<i>Entamoeba histolytica</i>			19,5%	25,4%		
<i>Entamoeba</i> sp.	3,2%			25,4%		
<i>Entamoeba coli</i>				74%	75%	61%
<i>Iodamoeba</i> sp.	3,2%					

<i>Iodamoeba butschlii</i>					25%	
<i>Cyclospora sp.</i>						22%
<i>Cryptosporidium sp.</i>						29,3%
<i>Physaloptera sp.</i>					6%	
<i>Enterobius sp.</i>				10%		
<i>Necator sp.</i>					6%	
<i>Strongyloides sp.</i>	9,7%					69%
<i>Strongyloides fulleborni</i>		42%	16,3%	44%		
Strongyloidní vajíčka	3,2%	42%	22,8%			
<i>Streptopharagus sp.</i>		17%				
<i>Trichuris sp.</i>	3,5%	58%	47,1%			36,6%
<i>Trichuris trichiura</i>				50%		
<i>Ascaris sp.</i>	3,2%					
<i>Schistosoma mansoni</i>			4,9%			
Počet vzorků	31	12	123	50	16	41

Tab. 3: Srovnání prevalence parazitů kočkodana červenozeleného a šimpanze učenlivého na Rubonu. ⁽¹⁾ Hasegawa et al., nepublikováno, ⁽²⁾ Mé výsledky, ⁽³⁾ Hagesawa et al., nepublikováno.

Primát / Parazit	<i>P troglodytes</i> ¹	<i>C. a.</i> <i>pygerythrus</i> ²	<i>C. a.</i> <i>pygerythrus</i> ³
<i>Troglodytella abressarti</i>	56%		
<i>Entamoeba</i> sp.		3,2%	
<i>Entamoeba</i> spp.	21,2%		77,8%
<i>Iodamoeba</i> sp.		3,2%	
<i>Iodamoeba butschlii</i>	1%		
<i>Strongyloides</i> sp.	7,7%	9,7%	44,4%
<i>Ascaris</i> sp.		3,2%	
Strongyloidní vejíčka		3,2%	11,1%
<i>Strongylida</i> sp.	1,9%		
<i>Streptopharagus</i> sp.			11,1%
<i>Trichuris</i> sp.	2,8%	35,5%	77,8%
<i>Protopirura muricola</i>	5,7%		
<i>Subulura</i> sp.	1%		
<i>Anatrichosoma</i> sp.	1%		
<i>Enterobius anthropithecii</i>	5,7%		
<i>Syngamidae</i> spp.			11,1%
Počet vzorků	104	31	9

3.2. Výsledky molekulárních vyšetření

Všech 31 paralelních etanolových vzorků bylo vyšetřeno fenol-chloroformovou extrakcí a komerčně vyráběným kitem. Následně byly vzorky zpracovány pomocí PCR.

Vzorky, u kterých jsme izolovali DNA fenol-chloroformovou extrakcí byly pozitivní pouze ve čtyřech případech (příloha II., obr. A, obr. B). Vzorky, u kterých jsme izolovali DNA pomocí komerčně vyráběného kitu byly pozitivní ve dvaceti dvou případech (příloha II., obr. C, obr. D).

Jelikož došlo při manipulaci v laboratoři k poškození popisů zkumavek, provedli jsme PCR u některých vzorků znovu (příloha II., obr. E).

4. DISKUZE

Střevní parazité u volně žijících kočkodanů obecných (*Chlorocebus aethiops*) byli studováni pouze několika autory a tato práce tak přináší další poznatky o střevní fauně těchto primátů. Kromě samotné přítomnosti různých rodů parazitů naznačujeme i možné přenosy parazitů mezi introdukovanými a původními druhy primátů.

Pro tuto práci bylo vyšetřeno 31 vzorků trusu od volně žijících kočkodanů, bylo detekováno 6 parazitárních rodů, z toho 4 hlístice a 2 prvoci. Stejně jako v jiných pracích, které studovaly střevní parazity kočkodanů obecných (*Chlorocebus aethiops*), bylo i zde nalezeno nejvíce helmintů.

Nejvyšší prevalence byla potvrzena u rodu *Trichuris*, který se vyskytoval ve 35,5% vzorků. Při vyšetření, které prováděl HASEGAWA (nepublikováno) u kočkodanů červenozelených na Rubundu před námi, byla zjištěna prevalence 77,8%. Podobné hodnoty publikovali u kočkodana obecného i další autoři. Například GILLESPIE et al. (2004) v lesích západní Ugandy, kde se tento rod vyskytoval u kočkodanů obecných ve 42% vzorků nebo MURIUKI et al. (1998), který dokládá *Trichuris* sp. ve 47,1% všech vyšetřených vzorků od kočkodanů z Keni. LEGESSE & ERKO (2004) diagnostikoval ve čtyřech lokalitách v Etiopii u 41 vyšetřovaných kočkodanů 36,6% vzorků pozitivních na tohoto parazita. MUNENE et al. (1998) zjistil u kočkodanů obecných chovaných v zajetí v Institutu výzkumu primátů v Keni 50% prevalenci druhu *Trichuris trichiura*. Nalezené hodnoty tedy odpovídají hodnotám udávaným jinými autory. Jelikož jsou si vajíčka druhů rodu *Trichuris* morfologicky velmi podobná, nebyli jsme schopni námi nalezeného parazita blíže určit. Klíčem k přesné determinaci by bylo sledování přítomnosti perikloakální papily u samčích dospělců, které je při terénním sběru trusu obtížné získat. (BEER 1976, ITOH et al. 1988, TENORA et al. 1993, ŠPAKULOVÁ 1994, LANFREDI et al. 1995)

Rod *Strongyloides* byl prokázán v 9,7% vyšetřovaných vzorků. Tato prevalence je výrazně nižší než publikovaná data. MCGREW et al. (1989) uvádí 69% pozitivních vzorků a MURIUKI et al. (1998) 16,3% potvrzených nálezů druhu *Strongyloides fulleborni*. Tento druh určil také GILLESPIE et al. (2004) ve 42% případů. Jelikož u šimpanzů žijících na Rubundu byla prevalence *Strongyloides* sp. také pouze 7,7% HASEGAWA (nepublikováno) je možné, že se tento parazit na ostrově Rubondo vyskytuje u tamních populací primátů méně. Nicméně předchozí vyšetření HASEGAWA (nepublikováno) u kočkodanů červenozelných dokládají prevalenci 44,4%.

Ostatní parazité byli identifikováni pouze jednou v různých vzorcích. Jedná se o hlístice rodu *Ascaris*, která byla u kočkodana obecného zaznamenána poprvé, strongyloidní vajíčka a prvoky rodu *Iodamoeba* a *Entamoeba*. McGREW et al. (1989) popisuje *Entamoeba coli* v 75% a *Iodamoeba butshlii* ve 25% vzorků od kočkodanů. MUNENE et al. (1998) dokládá *Entamoeba coli* u 74% vzorků zajatých kočkodanů. LEGESSE & ERKO (2004) uvádí ve své práci přítomnost *Entamoeba coli* u kočkodanů v 61% případů. Všichni autoři tedy udávají mnohem větší prevalence, než bylo nalezeno v našich vzorcích. U šimpanzů z Rubonda je rod *Entamoeba* přítomen v 21,2% vzorků a *Iodamoeba* sp. pouze v 1% případů. Společné nízké prevalence rodu *Iodamoeba* opět naznačují menší výskyt těchto parazitů na ostrově, rozdílné hodnoty u rodu *Entamoeba* by mohly být způsobeny špatnou záchytností použitých mikroskopických metod.

Molekulárními metodami jsme se snažili zachytit přítomnost *Blastocystis* sp., která byla předpokládána, nicméně mikroskopicky nebyla potvrzena ani v jednom vzorku. Důvodem absence blastocyst může být celková nízká záchytnost koprologických metod, ale i morfologie buněk blastocyst. Mají velmi tenkou buněčnou stěnu a mohou snadno prasknout během centrifugace. Možné je i popraskání vlivem osmotického tlaku po přidání cukru při flotaci. Mikroskopické a molekulární metody srovnával například STENSVORD et al. (2006) při detekci blastocyst, nebo FAYER et al. (2003) při detekci tří druhů mikrosporidie rodu *Encephalitozoon*. V práci STENSVORD et al. (2006) byly porovnávány metody PCR a formol ethyl acetát koncentrovaná technika (FECT), přičemž PCR bylo vyhodnoceno pro detekci blastocyst v obou pracích jako jednoznačně vhodnější. Mnoho dalších autorů komentuje mikroskopické vyšetření pro blastocysty jako nevyhovující, a to právě kvůli nízké záchytnosti (PEGELOW et al. 1997, CIRIONI et al. 1999, TAAMASRI et al. 2002, HERWALDT et al. 2001, WINDSOR et al. 2002). Mikroskopicky zachytili *Blastocystis hominis* ve 34,2% vzorků čerstvého trusu u kočkodana obecného LEGESSE & ERKO (2004).

V rámci molekulárních metod jsme porovnávali také vhodnost dvou různých metod izolace DNA. První metodou byla izolace pomocí komerčního kitu, druhá metoda byla fenol-chloroformová extrakce. Použití kitu bylo vyhodnoceno jako vhodnější, neboť naše vyšetření prokázalo po PCR specifickými primery pro rod *Blastocystis* 22 pozitivních vzorků při izolaci DNA kitem a jen 4 pozitivní vzorky při izolaci DNA fenol- chloroformem. Tento výsledek je nejspíš dán tím, že komerční kit je již speciálně složen pro vyšetření trusu a jeho záchytnost je tedy vyšší, než u méně specifické fenol- chloroformové extrakce. Přítomnost blastocyst u kočkodanů metodou PCR při izolaci DNA pomocí kitu zmiňuje také práce PARKAR et al. (2006), který vyšetřoval vzorky čerstvé i kultivované, od různých druhů zvířat z Austrálie a Thajska. V této práci byl pro izolaci DNA použit jako nevhodnější stejný komerční kit, jaký

jsme používali my, tedy QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Izolaci DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce prováděli TAN et al. (2006) při studiu kultivovaných blastocyst z lidských hostitelů. Metoda extrakce se v této práci osvědčila.

Pro PCR jsme použili univerzální eukaryotický primer MedlinA (Medlin, 1989) a specifický primer pro blastocysty BhRDr (Noel, 2005). Tyto primery jsme zvolili, protože se osvědčily i při předchozích vyšetřeních a vykazovaly dobré výsledky. Stejný specifický primer, tedy BhRDr pro amplifikaci 600 bp SSU-rDNA z izolátů použili především pro fylogenetické analýzy vzorků SCICLUNA et al. (2006). I v této práci se primer pro potvrzení přítomnosti blastocyst osvědčil.

Kromě vlastního popisu spektra parazitů gastrointestinálního traktu u kočkodanů bylo cílem mé práce také srovnání jejich parazitofauny s parazitofaunou syntopicky se vyskytujícími šimpanzů. U obou druhů těchto primátů z ostrova Rubondo byli nalezeni tyto společní parazité: měňavky rodu *Iodamoeba* a *Entamoeba*, hlístice rodu *Strongyloides* a *Trichuris*, nicméně bez molekulárního vyšetření nelze určit, zda jde o totožné parazity (PETRŽELKOVÁ 2006, HASEGAWA nepublikováno).

Při srovnání prevalencí kočkodanů s prevalencemi parazitů u šimpanzů žijících na stejném ostrově je zřejmý rozdíl v distribuci jednotlivých parazitů. Zatímco hlístice jsou u šimpanzů zastoupeny jen v malých prevalencích *Trichuris* sp. (2,9%) a *Strongyloides* sp. (7,7%), prvoci tvoří naprostou většinu. Nejčastěji zastoupený je komezál *Trogloidyella abrasarti*, který se vyskytoval u 56% šimpanzů. Tento nálevník se vyskytuje výhradně pouze u šimpanzů a u goril (FREEMAN et al. 2004, MUEHLENBEIN 2005). Dále byl identifikován rod *Iodamoeba* v 1% a *Entamoeba* v 21, % vzorků. Oba tyto parazité se u vyšetřovaných kočkodanů nacházeli pouze v 3,3% případů. Pouze u šimpanzů byl také nalezen druh hlístice *Enterobius anthropopithecii*, který se vyskytuje pouze u rodu *Pan*, a to v prevalenci 5,8%. *Enterobius* sp. byl zjištěn také u kočkodanů v Keni v prevalenci 10% (MUNENE et al. 1998).

U srovnávaných šimpanzů z Rubonda byli nalezeni tři pro *Pan troglodytes* nově se vyskytující parazité *Protospirura muricola*, *Anatrichosoma* sp. a *Subulura* sp (PETRŽELKOVÁ et al. 2006). Tito parazité byli u kočkodanů popsáni již dříve. Druh *Protospirura muricola* byl nalezen u kočkodana obecného v Kongu (VUYLSTEKE 1956), *Subulura* sp. byla potvrzena u kočkodana diadémového (*Cercopithecus mitis kolbi*) v Keni (CAMERON 1930) a *Anatrichosoma* sp. se vyskytovala u několika druhů kočkodanů, např. kočkodana husarského (*Erythrocebus patas*) nebo kočkodana obecného (*Chlorocebus aethiops*) (ORIHHEL 1970). Tito parazité se u námi vyšetřovaných kočkodanů vůbec nevyskytovali a nebyla tudíž prozatím potvrzena domněnka, že kočkodani slouží pro druh *Protospirura muricola* jako rezervoár. Dalším rezervoárem by mohli být hlodavci, případně je

možné, že se šimpanzi nakazili *P. muricola* před vypuštěním během doby strávené v zajetí (PETRŽELKOVÁ et al. 2006).

Jelikož se nepodařilo získat více vzorků z lesa, pochází většina materiálu z míst v blízkosti lidských obydlí. Tato skutečnost může ovlivňovat nejen prevalence nalezených parazitů, ale zvyšuje i možnost výskytu zoonotických parazitárních rodů. Nicméně ve sběrech v lesích se bude v budoucnu pokračovat.

5. ZÁVĚR

- Vyšetření trusu volně žijících kočkodanů červenozelených (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*) prokázalo přítomnost intestinálních parazitů *Entamoeba*, *Iodamoeba*, blíže nespecifikované améby, *Trichuris*, *Strongyloides* a blíže nespecifikovaná strongyloidní vajíčka.

- Nejčastěji byla pomocí mikroskopického vyšetření diagnostikována hlístice *Trichuris*.

- Pomocí PCR jsme potvrdili přítomnost prvoka *Blastocystis* u vyšetřovaných kočkodanů.

- U kočkodanů a šimpanzů, se kterými jsme naše vyšetření srovnávali, byli nalezeni tyto společní parazité: *Entamoeba*, *Iodamoeba*, *Trichuris* a *Strongyloides*.

6. LITERATURA

APPLETON C.C., KRECEK R.C., VERSTER A., BRUORTON M.R. & LAWES M.J. 1994: Gastrointestinal parasites of the samango monkey, *Cercopithecus mitis* in Natal, South Africa. *Journal of Medical Primatology*, 23(1): 52- 55.

APPLETON C.C. & HENZI S.P. 1992: Enviromental correlates of gastrointestinal parasitism in Montane and Lowland baboons in Natal, South Africa. *International Journal Of Primatology*, 14(4): 623-635.

ASHFORD R. W., REID G. D. F. & WRANGHAM R.W. 2000: Intestinal parasites of the chimpanzee *Pan troglodytes* in Kibale Forest, Uganda. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 94(2): 173- 179.

ASHFORD R. W., REID G. D. F. & BUTYNSKI T. M. 1990: The intestinal faunas of man and mountain gorillas in a shared habitat. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 84(4): 337-340.

BINHAZIM A.A., SHIN S.S., CHAPMAN W.L. & OLOBO J. 1993: Comparative susceptibility of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) to experimental infection with *Leishmania leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. *Laboratory Animal Science*, 43(1): 37- 47.

BEER R.J.S. 1976: The relationship between *Trichuris trichiura* (Linnaeus 1758) of man and *Trichuris suis* (Shrank 1788) of the pig. *Research in Veterinary Science*, 20: 47- 54.

BORNER M. 1985: The rehabilitated chimpanzees of Rubondo Island, *Oryx*, 19(3): 151-154.

CAMERON T.W.M. 1930: The species of *Subuhura* Molin in primates. *Journal of Helminthology* 8(1): 49- 58.

CIRIONI O., GIACOMETTI A., DRENAGGI D., ANCARANI F. & SCALISE G. 1999: Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *European Journal of Epidemiology*, 15: 389- 393.

CHAPMAN C.A., GILLESPIE T.R. & GOLBERG T. 2005: Primates and the ecology of their infectious diseases: How will anthropogenic change affect host- parasite interactions? *Evolutionary Anthropology*, 14: 134- 144.

CIRIONI O., GIACOMETTI A., DRENAGGI D., ANCARANI F. & SCALISE G. 1999: Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* diverse patient cohorts. *European Journal of Epidemiology*, 15(4): 389-393.

DUPAIN J., GORDO F.P., PETRŽELKOVÁ K.J., NELL C., GARCIA P. & MODRÝ D (v tisku): Survey of intestinal parasites of bonobos in the Lomako forest, Equator province (Democratic Republic of Congo). In: *Primate Parasite Ecology*. Cambridge University Press.

EBERHARD M.L., SILVA A.J., LILLEY B.G. & PIENIAZEK N.J. 1999: Morphologic and molecular characterization of new *Cyclospora* species from ethiopian monkeys: *C. cercopithecii* sp.n., *C. colobi* sp.n., and *C. papionis* sp.n. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5): 651-658.

FAYER R., SANTIN M. & PALMER R. 2003: Comparison of microscopy and PCR for detection of three species of *Encephalitozoon* in feces. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50 (Supplement 3): 572-573.

FILE S., MCGREW W.C., TUTIN C.E.G. 1976: The intestinal parasites of a community of feral chimpanzees, *Pan troglodytes schweinfurthii*. *The Journal of Parasitology*, 62(2): 259-261.

FREEMAN A-S-, KINSELLA J.M., CIPOLLETTA C., DEEM S.L. & KAESH W.B. 2004: Endoparasites of Western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at Bai Hoku, Central African Republic. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(4): 775- 781.

GICHERU M.M., OLOBO J.O. & ANJILI C.O. 1997: Heterologous protection by *Leishmania donovani* for *Leishmania major* infections in the vervet monkey model of the disease. *Experimental Parasitology*, 85(2): 109- 116.

GICHERU M.M., OLOBO J.O., KARIUKI T.M. & ADHIAMBO C. 1995: Visceral leishmaniasis in vervet monkeys- immunological responses during asymptomatic infections. *Scandinavian Journal of Immunology*, 4(2): 202- 208.

GILLESPIE T.R 2006: Noninvasive assessment of gastrointestinal parasite infections in free-ranging primates, *International Journal of Primatology*, 27(4): 1129- 1143

GILLESPIE T.R., CHAPMAN C.A. & GREINER E.C. 2005: Effects of logging on gastrointestinal parasite infections and infection risk in African primates, *Journal of Applied Ecology*, 42(4): 699-707.

GILLESPIE T. R., GREINER E. C. & CHAPMAN C. A. 2005: Gastrointestinal parasites of the colobus monkeys of Uganda. *Journal of Parasitology*, 91(3): 569- 573.

GILLESPIE T. R., GREINER E. C. & CHAPMAN C. A. 2004: Gastrointestinal parasites of the guenons of western Uganda. *Journal of Parasitology*, 90(6):1356- 1360.

GOVIND S.K., KHAIRUL A.A. & SMITH H.V. 2002: Multiple reproductive process in *Blastocystis*. *Trends in Parasitology*, 18: 528- 528.

GRACZYK T.K., BOSCO- NIZEYI J., SSEBIDE B., THOMPSON R.C.A., READ C. & CRANFIELD M.R. 2002a: Anthropozoonotic *Giardia duodenalis* genotype (assemblage) a infections in habitats of free- ranging human- habituated gorillas, Uganda. *Journal of Parasitology*, 88(5): 905- 909.

GRACZYK T.K., BOSCO- NIZEYI J.B., SILVA A.J., MOURA I.N.S., PIENIAZEK N.J., CRANFIELD M.R. & LINDQUIST H.D.A. 2002b: A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free- ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. *Parasitology Resume*, 88: 926- 931.

GRACZYK T.K., LOWENSTINE L.J. & CRANFIELD M. R. 1999: *Capillaria hepatica* (Nematoda) infections in human- habituated mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Parc National de Volcans, Rwanda. *Journal of Parasitology*, 85(6): 1168- 1170.

GRZIMEK B. 1970: *Among Animals of Africa*. Stein & Day, New York.

HASEGAWA H., KANO T. & MULAVAWA M. 1983: A parasitological survey on the feces of pygmy chimpanzees, *Pan paniscus*, at Wamba, Zaire. *Primates*, 24(3): 419-423.

HERDER S., SIMO G., NKININ S. & NJOKOU F. 2002: Identification of trypanosomes in wild animals from Southern Cameroon using the polymerase chain reaction (PCR). *Parasite Journal de la Societe Francaise de Parasitologie* 9(4): 345- 349.

HERWALDT B.L., ARROYAVE K.R., WAHLQUIST S.P., MERIDA A.M., LOPEZ A.S. & JURANEK D.D. 2001: Multiyear prospective study of intestinal parasitism in a cohort of Peace Corps Volunteers in Guatemala. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 34- 42.

HUBBARD G.B., LEE D.R. & EICHBERG J.W. 1991: Diseases and pathology of chimpanzees at the southwest foundation for biomedical research. *American Journal of Primatology*, 24: 273- 282.

HUFFMAN M.A., GOTOH S., TURNER L.A., HAMAI M. & YOSHIDA K. 1997: Seasonal trends in intestinal nematode infection and medicinal plant use among chimpanzees in the Mahale Mountains, Tanzania. *Primates*, 38(2): 111- 125.

ITOH K., OKU M., OKAMOTO M., OHBAYASHI M., KITAMURA Y. & SHIBAHARA T. 1988: Helminth parasites of the Japanese monkey *Macaca fusata fusata* in Ehime Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 36: 235- 247.

JURÁŠEK V.: Protozoa a protozoózy. In: JURÁŠEK & DUBINSKÝ & kolektiv 1993: *Veterinárna parazitológia. Príroda*, Bratislava. Pp: 50- 143.

KARERE G.M. & MUNENE E. 2002: Some gastro-intestinal tract parasites in wild De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*) in Kenya. *Veterinary Parasitology*, 110(1-2): 153-157.

KAWABATA M. & NISHIDA T. 1991: A preliminary note on the intestinal parasites of wild chimpanzees in the Mahale Mountains, Tanzania. *Primates*, 32(2): 273- 278.

KINGDON J.: Primates. In: KINGDON J. 2003: The Kingdon field guide to African mammals. A & C Black Publishers Ltd., London. Pp: 5- 109.

KRIEF S., HUFFMAN M.A., SEVENET T., GUILLOT J., BORIES C., HLADIK C.M. & WRANGHAM R.W. 2005: Noninvasive monitoring of the health of *Pan troglodytes schweinfurhii* in the Kibale National Park, Uganda. *International Journal of Primatology*, 26(2): 467- 490.

LANDSOUND-SOUKATE J., TUTIN C.E.G. & FERNANDEZ M. 1995: Intestinal parasites of sympatric gorillas and chimpanzees in the Lopé Reserve, Gabon. *Annals of Tropical medicine and parasitology*, 89(1): 73-79.

LANFREDI R.M., de SOUZA W., CORREA GOMES D. 1995: Comparative study of four species of genus *Trichuris* Roederer, 1761 (*Nematoda, Trichurinae*) by scanning electron microscopy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90: 489- 496.

LEELAYOVA S., TAAMASRI P., RANGSIN R., NAAGLOR T., THATHAISONG U. & MUNGTHIN M. 2002: In vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Annals Tropical Medicine Parasitology*, 96: 803- 807.

LEVINE N.D. 1970: Protozoan parasites of nonhuman primates as zoonotic agents. *Laboratory animal care*. 20(2): 377- 383.

LEGESSE M. & ERKO B. 2004: Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia. *Acta Tropica*, 90(3): 321- 236.

LILLY A.A., MEHLMAN P.T. & DORAN D. 2002: Intestinal parasites in gorillas, chimpanzees, and humans at Modika research site, Dzanga-Ndoki National park, Central African Republic. *International Journal of Primatology*, 23(3): 555-573

MATSUMOTO Y., YAMADA M. & YOSHIDA Y. 1987: Light-microscopical appearance and ultrastructure of *Blastocystis hominis*, an intestinal parasite of man. *Zentralblatt für Bakteriologie und Microbiologische Hygiene (A)*, 264: 379- 385.

McGREW W.C., TUTIN C.E.G., COLLINS D.A. & FILE S.K. 1989: Intestinal parasites of sympatric *Pan troglodytes* and *Papio Spp.* at two sites: Gombe (Tanzania) and Mt. Assirik (Senegal). *American Journal of Primatology* 17: 147- 155.

McGREW W.C., TUTIN C.E.G. & FILE S.K. 1989: Intestinal parasites of two species of free- living monkeys in far western Africa, *Cercopithecus (aethiops) sabaeus* and *Erythrocebus patas patas*. *African Journal of Ecology*, 27: 261- 262.

MEYERS B.J. & KUNZ R.E. 1972: A checklist of parasites and commensals reported for the chimpanzee (*Pan*). *Primates* 13(4): 433- 471.

MOE K.T., SINGH M., HOWE J., HO L.C., TAN S.W., NG G.C., CHEN X.Q. & YAP E.H. 1996: Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitology Resume*, 82: 439-444.

MOE K.T., SINGH M., HOWE J., HO L.C., TAN S.W., CHEN X.Q. & YAP E.H. 1999: Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitology Resume*, 85: 103- 108.

MOSCOVICE L.R., ISSA M.H., PETRZELKOVA K.J., KEULER N.S., SNOWDON C.T. & HUFFMAN M.A. 2007: Fruit availability, chimpanzee diet, and grouping patterns on Rubondo Island, Tanzania. *American Journal of Primatology*, 69: 1- 16.

MUEHLENBEIN MICHAEL P. 2005: Parasitological analysis of the male chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) at Ngogo, Kibale National Park, Uganda. *American Journal of Primatology*, 65:167-179.

MUNENE E., OTSYULA M., MBAABU D.A N., MUTAHI W.T., MURIUKI S.M.K. & MUCHEMI G. M. 1998: Helminth and protozoan gastrointestinal tract parasites in captive and wild- trapped African non- human primates. *Veterinary Parasitology*, 78: 195- 201.

MURIUKI S.M.K., MURUGU R.K., MUNENE E., KARERE G.M. & CHAI D.C. 1998: Some gastro- intestinal parasites of zoonotic (public health) importance commonly observed in old world non- human primates in Kenya. *Acta Tropica*, 71: 73- 82.

MURRAY S., STERN CH., BOUDREAU B. & GOODAL J. 2000: Intestinal parasites of baboons (*Papio cynocephalus anubis*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*) in Gombe National Park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31(2): 176- 178.

MYERS AND KUNTZ, 1972: A checklist of parasites and commensals reported for the chimpanzee (*Pan*). *Primates*, 13(4): 433- 471.

NGOTHO M., MAINA N., KAGIRA J., ROYO F., FARAH IO & HAU J. 2006: IL-10 is up regulated in early and transitional stages in vervet monkeys experimentally infected with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Parasitology International*, 55(4): 243- 248.

NIZEYI J. B., MWEBE R., NANTEZA A., CRANFIELD M. R., KALEMA G. R. N. N. & GRACZYK T. K., 1999: *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. infections in mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Bwindi impenetrable National park, Uganda. *Journal of Parasitology*, 85: 1084- 1088.

NIZEYI J.B., SEBUNYA D., DASILVA A., CRANFIELD M.R., PIENIAZEK N.J. & GRACZYK T.K. 2002: Cryptosporidiosis in people sharing habitats with free- ranging mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*), Uganda. *American Journal of Medicine and Hygiene*, 66(4): 442- 444.

NUNN C.L., ALTIZER S., JONES K.E. & SECHREST W. 2003: Comparative tests of parasite species richness in primates. *The American Naturalist*, 162 (5): 597- 614.

OK U.Z., GIRGINKARDESLEK N., BALCIOGLU C., ERTAN P., PIRILDAR T. & KILIMCIOGLU A.A. 1999: Effect of trimethoprim-sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. *American Journal of Gastroenterologic*, 94: 3245- 3247.

OLOBO J., GICHERU M.M. & ANJILI C.O. 2001: The African Green Monkey model for cutaneous and visceral leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 17(12): 588- 592.

ORIHTEL T.C. 1970: Anatrinosomiasis in african monkeys. *Journal of Parasitology*, 56(5): 982- 985.

PARKAR U., TRAUB R.J., KUMAR S., MUNGTHIN M., VITALI S., LEELAYOOVA S., MORRIS K. & THOMPSON R.C.A. 2007: Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology*, 134(3): 359-367.

PEGELOW K., GROSS R., PIETRZIK K., LUKITO W., RICHARDS A.L. & FRYAUFF D.J. 1997: Parasitological and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java, Indonesia. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*, 28: 173-190.

PETRZELKOVA K.J., HASEGAWA H., MOSCOVICE L. R., KAUR T., ISSA M. & HUFFMAN M.A. 2006: Parasitic nematodes in the chimpanzee population on Rubondo Island, Tanzania. *International Journal of Primatology*, 27(3): 767- 777.

PHILLIPPI K.M. & CLARKE M.R. 1992: Survey of parasites of rhesus monkeys housed in small social groups. *American Journal of Primatology*, 27: 293- 302.

QADRI S.M.H., ALOKAILI G.A. & ALDAYEL F. 1989: Clinical significance of *Blastocystis hominis*. *Journal Clinical Microbiology*, 27: 2407- 2409.

SCICLUNA S. M., TAWARI B. & CLERK C.G. 2006: DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 1: 1- 9.

SPAKULOVÁ M. 1994: Discriminant analysis as a method for the numerical evaluation of taxonomic characters in male trichurid nematodes. *Systematic Parasitology*, 29: 113- 119.

STENSVOLD R., BRILLOWSKA- DABROWSKA A., NIELSEN H.V. & ARENDRUP M.C. 2006: Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology* 92(5): 1081- 1087.

STENZEL & BOREHAM 1996: *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Revue*, 9: 563–584.

STERNBERG J.M., MAINA N.N., GICKHUKI C.W. & NDUNGU J.M. 1998: Nitric oxide production in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) infected with *Trypanosoma brucei*. *Parasite Immunology*, 20(8): 395- 397.

TAAMASRI P., LEELAYOVA S., RANGSIN R., NAAGLOR T., KETUPANYA A. & MUNGTHIN M. 2002: Prevalence og *Blastocystis hominis* carriage in Thai army personel based in Chonburi, Thailand. *Military Medicine*, 167: 643- 646.

TAAMASRI P., MUNGTHIN M., RANGSIN R., TONGUPPRAKARN B., AREEKUL W. & LEELAYOVA S. 2000: Transmission of intestinal blastocystosis related to the quality of drinking water. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*, 31: 112- 117.

TAN T. C., SURESH K.G., THONG K. L. & SMITH H. V. 2006: PCR fingerprinting of *Blastocystis* isolated from symptomatic and asymptomatic human hosts. *Parasitology Resume*, 99: 459-465.

TAN K. S. W., 2004: *Blastocystis* in human and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitology*, 126: 121-144.

TENORA F., KAMIYA M., SPAKULOVÁ M., STANEK M., OOI H.K. 1993: Scanningelectron microscopy of *Trichuris suis* and *Trichuris vulpis* from Slovakia and Japan. *Helminthologia*, 30: 93- 98.

VITONE N.D., ALTIZER S. & NUNN C.L. 2004: Body size, diet and sociality influence the species richness of parasitic worms in anthropoid primates. *Evolutionary Ecology Research*, 6: 183-199.

VUYLSTEKE A. 1956: Note sur quelques Nématodes parasites avec description de neuf espèces nouvelles. *Revue Zoological and Botanic African* 53(3/4): 441- 477.

WALLIS J. & LEE D.R. 1999: Primate conservation: The prevention of disease transmission. *International Journal of Parasitology*, 20(6): 803- 826.

WIDSOR J.J., MACFARLANE L., HUGHES-THAPA G., JONES S.K.A. & WHITESIDE T.M. 2002: Incidence of *Blastocystis hominis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *British Journal Biomedicine Science*, 59: 154- 157.

WOLFE N.D., ESCALANTE A.A., KARESH W.B., KILBOURN A., SPIELMAN A. & LAL A.A. 1998: Wild primate populations in emerging infectious disease research: The missing link? *Perspectives*, 4(2): 149- 158.

YAMASHITA J. 1963: Ecological relationships between parasites and primates. *Primates*, 4(1): 1- 35.

ZAMAN V. 1996: The diagnosis of *Blastocystis hominis* cysts in human faeces. *Journal of Infection*, 33: 15- 16.

ZAMAN V., HOWE J. & M. NG, 1995: Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts, *Parasitology Results*, 81: 465–469.

ZIERDT C.H. 1991: *Blastocystis hominis*- past and future. *Clinical Microbiology Review* 4: 61- 79.

7. PŘÍLOHY

PŘÍLOHA I.

Detekování parazitů u vyšetřovaných vzorků trusu kočkodana obecného koprologickými metodami a metodou PCR. Přítomnost *Blastocystis* je pro větší přehlednost tabulky zobrazena pouze znaménkem +. K: Kageye, v blízkosti obydlí zaměstnanců Tanzanských NP, F: v blízkosti stanového hotelu Flycatcher, T: v blízkosti turistických chatek, N: Naykutukula, oblast výskytu šimpanzů.

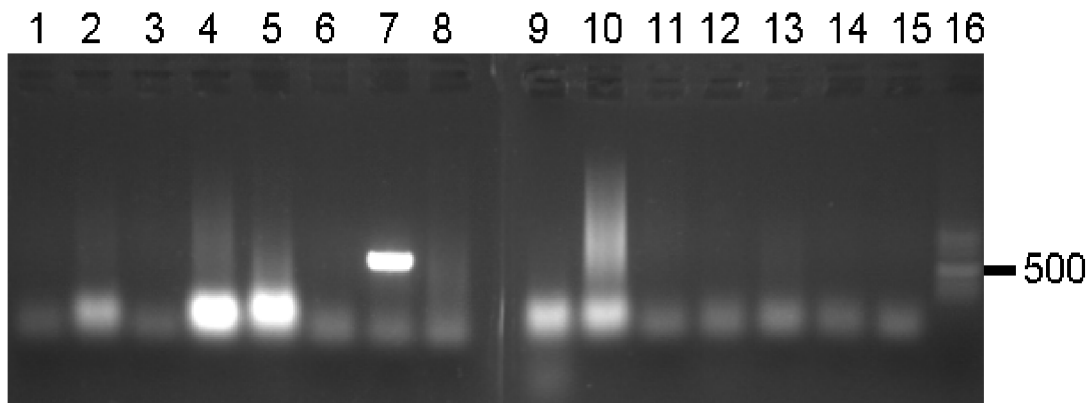
číslo vzorku	lokality nálezu	koprologické metody		PCR	
		flotace	MIF	izolace DNA kitem	izolace DNA pomocí F-CH
1	K	<i>Strongyloides</i>	nespecifikov. améby	+	
2	F	<i>Trichuris</i>		+	
3	K				
4	F			+	
5	K		<i>Entamoeba</i>	+	
6	F			+	
7	F			+	+
8	K	<i>Trichuris</i>	nespecifikov. améby	+	
9	K			+	
10	F			+	
11	F			+	
12	K				
13	K			+	
14	K			+	
15	K			+	
16	F	<i>Trichuris</i>	<i>Strongyloides</i>		
17	F				
18	F			+	
19	F	<i>Strongyloides</i>			
20	F				

21	T			+	
22	T	<i>Trichuris</i>	vajíčka strongylů, <i>Trichuris</i>	+	+
23	N		<i>Ascaris</i>	+	+
24	N		<i>Trichuris</i>		
25	F	<i>Trichuris</i> , <i>Iodamoeba</i>	<i>Trichuris</i> , <i>Iodamoeba</i>	+	
26	F			+	
27	F	<i>Trichuris</i>		+	+
28	F	<i>Trichuris</i>			
29	F				
30	F	<i>Trichuris</i>		+	
31	F			+	

PŘÍLOHA II.

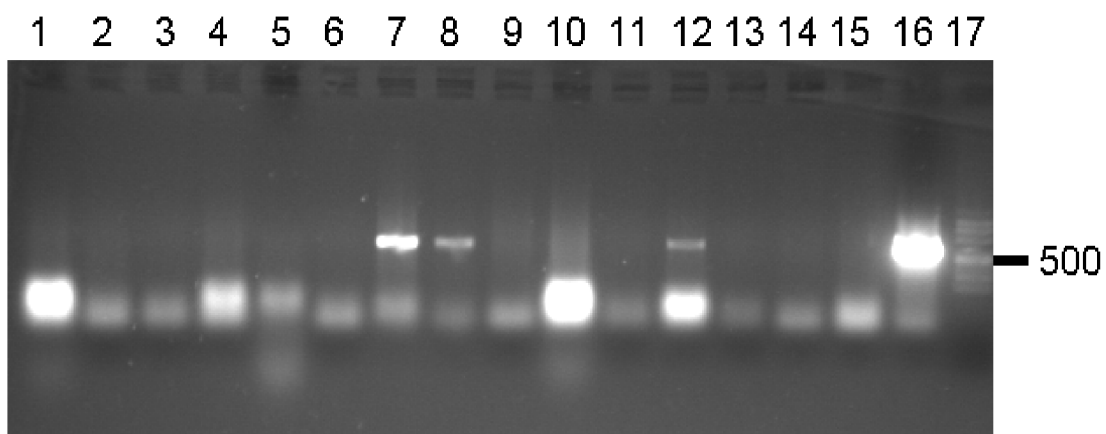
Detekce PCR blastocyst v trusu kočkodanů obecných

Výsledky gelové elektroforézy při izolaci DNA fenol-chloroformovou extrakcí,
 pozitivní kontrola představuje potvrzenou DNA *Blastocystis* sp. vyizolovanou kitem z trusu šimpanzů ze ZOO Liberec



Obr. A: Detekce *Blastocystis* v trusu kočkodanů obecných

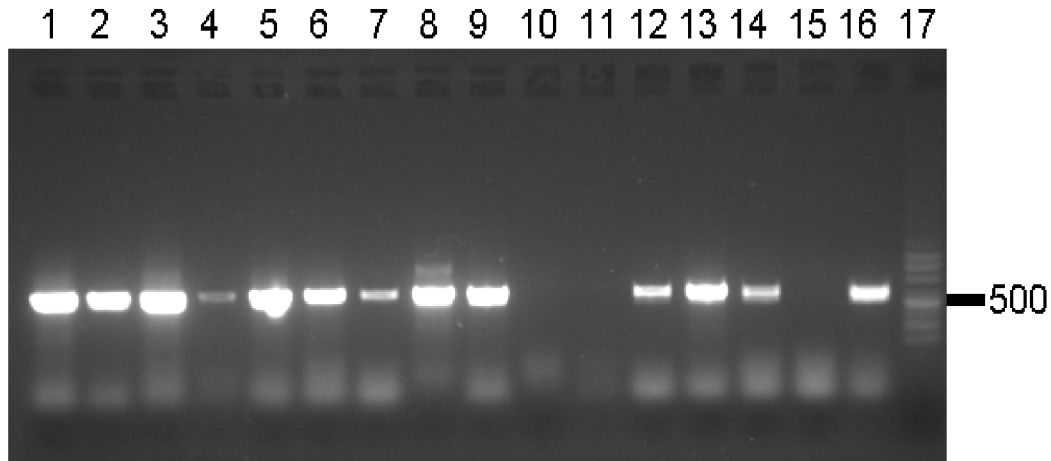
1- 15: DNA ze vzorků trusu kočkodanů obecných (vzorky číslo 1-15), 16: DNA marker.



Obr. B: Detekce *Blastocystis* v trusu kočkodanů obecných

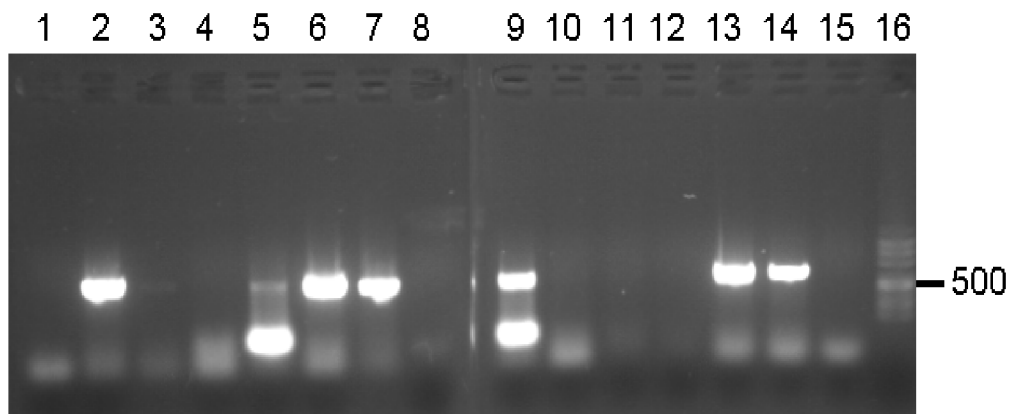
1-15: druhá část DNA ze vzorků trusu kočkodanů obecných, (vzorky číslo 16-30) 16: pozitivní kontrola, 17: DNA marker.

Výsledky gelové elektroforézy při izolaci DNA komerčním kitem, pozitivní kontrola představuje potvrzenou vyizolovanou DNA kitem z trusu šimpanzů ze ZOO Liberec



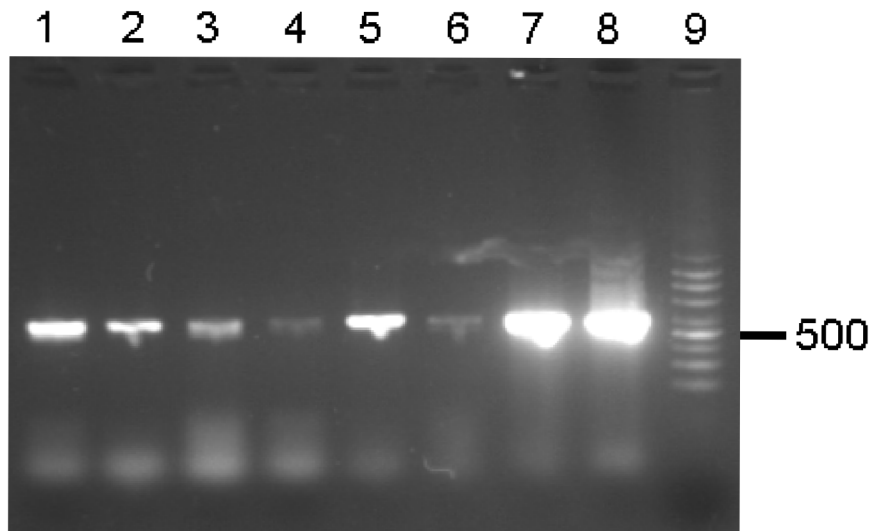
Obr. C: Detekce *Blastocystis* v trusu kočkodanů obecných

1-16: DNA ze vzorků trusu kočkodanů obecných (vzorky 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, x, x, 13, 15, 16, 26) 17: DNA marker.



Obr. D: Detekce *Blastocystis* v trusu kočkodanů obecných

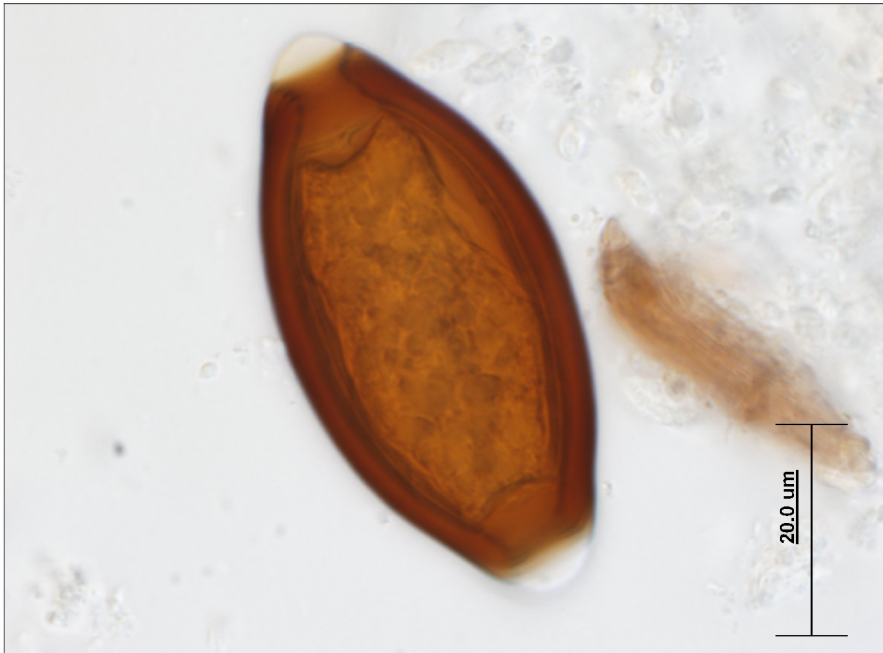
1-14: DNA ze vzorků trusu kočkodanů obecných (vzorky 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31) 15: pozitivní kontrola, 16: DNA marker.

Náhradní gelová elektroforéza**Obr. E: Detekce *Blastocystis* v trusu kočkodanů obecných**

1-6: DNA vzorků trusu kočkodanů obecných (vzorky 2, 3, 5, 14, 26, 31) 7, 8: pozitivní kontrola, 9: DNA marker

PŘÍLOHA III.

Obr. a: *Iodamoeba*- cystaObr. b: *Entamoeba*- cysty



Obr. c: *Trichuris*- vajíčko



Obr. d: Strongyloidní vajíčka



Obr. e: *Strongyloides*- vajíčko s larvou



Obr. f: *Ascaris*- vajíčka s larvami



Obr. g: *Blastocystis*- vakuolární forma (z kultivace, foto: David Modrý)