



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra zootechnických věd

Diplomová práce

Vliv teploty a času na excystaci *Cryptosporidium muris*
izolát CAT21

Autorka práce: Bc. Hana Dudáková

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

Konzultant práce: RNDr. Jana Fenclová

České Budějovice
2024

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne

.....
Bc. Hana Dudáková

Abstrakt

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda má tělesná teplota hostitele, pH prostředí a doba expozice vliv na excystaci oocyst *Cryptosporidium muris*. Pro experiment byl použit izolát CAT21 získaný z přirozeně infikované kočky domácí (*Felis catus* f. *domestica*), ovšem primárním hostitelem *Cryptosporidium muris* jsou hlodavci. Izolát byl dlouhodobě udržován v imunodeficientních SCID myších, ze kterých byl průběžně odebírán trus, aby mohly být provedeny jednotlivé experimenty. Prvním zkoumaným faktorem ovlivňujícím excystaci oocyst byla tělesná teplota hostitele. Oocysty skladované v dH₂O byly vkládané do vodní lázně vytemperované na teplotu v rozmezí 21 až 44 °C po dobu 5, 15 a 30 minut. Dle výsledků je optimální teplota pro excystaci oocyst *C. muris* CAT21 37 °C při době působení 30 minut, při které excystuje až 92 % oocyst. Do práce bylo zahrnuto navíc i zkoumání vlivu pH prostředí na excystaci, kdy byly oocysty vystavené působení roztoků PBS o různé hodnotě pH (2,00 –9,00) a zahřáté ve vodní lázni na 37 °C. Optimální pH prostředí pro excystaci je pH 6,00, při kterém excystovalo až 93 % oocyst. Životaschopnost používaných oocyst byla stanovena barvením pomocí propidium jodidu před každým měřením.

Klíčová slova: *Cryptosporidium muris*; excystace; hlodavci; kryptosporidióza; pH

Abstract

The main aim of this master's thesis was to investigate the impact of environmental pH and the host's body temperature on the excystation of *Cryptosporidium muris* oocysts. The experiment utilized the CAT21 isolate obtained from a naturally infected domestic cat (*Felis catus* f. *domestica*), although rodents are the primary hosts of *Cryptosporidium muris*. The isolate was continuously maintained in immunodeficient SCID mice, from which fecal samples were regularly collected for individual experiments. The first factor examined for its influence on oocyst excystation was the host's body temperature. Oocysts stored in dH₂O were subjected to water baths set to temperatures ranging from 21 to 44°C for durations of 5, 15 and 30 minutes. According to the results, the optimal temperature for excystation of *C. muris* CAT21 oocysts was 37°C for a duration of 30 minutes, resulting in up to 92% excystation. Additionally, the study included an examination of the pH impact on excystation. Oocysts were exposed to PBS solutions with varying pH values (ranging from 2.00 to 9.00) and heated in a water bath at 37°C. The optimal pH for excystation was found to be 6.00, with up to 93% excystation observed. The viability of the oocysts used was determined by staining with propidium iodide before each measurement.

Keywords: *Cryptosporidium muris*; excystation; rodents; cryptosporidiosis; pH

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala mému školiteli Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za vedení, věcné rady, připomínky a pomoc při psaní diplomové práce. Tímto také děkuji panu doc. Ing. Michaelu Rostovi, Ph.D. a Marku Bedřichovi za ochotu, rady a pomoc při statistickém zpracování výsledků. Dále bych velmi ráda poděkovala celému kolektivu pracovníků Laboratoře veterinární a medicínské protistologie (Parazitického ústavu BC AVČR, v.v.i.) za ochotu a přátelský kolektiv. Nakonec bych chtěla poděkovat především mému příteli a rodině za obrovskou podporu po celou dobu studia.

Obsah

Úvod.....	8
1 Literární přehled.....	9
1.1 Rod <i>Cryptosporidium</i>	9
1.2 Historický přehled.....	9
1.3 Vývojový cyklus kryptosporidií.....	10
1.3.1 Hostitelská specifita	13
1.3.2 Tkáňová specifita	14
1.4 Kryptosporidióza.....	15
1.4.1 Průběh infekce.....	15
1.4.2 Přenos infekce	16
1.4.3 Terapie.....	16
1.4.4 Diagnostika	17
1.5 <i>Cryptosporidium muris</i>	17
1.5.1 Charakteristika	17
1.5.2 Variabilita izolátů.....	17
1.5.3 Patogenita.....	18
1.5.4 Hostitelská specifita	18
1.6 Kryptosporidiové infekce koček	19
2 Cíle práce	20
3 Materiál a metodika.....	21
3.1 Materiál	21
3.1.1 Zdroj oocyst pro experiment	21
3.1.2 Skladování oocyst	21
3.1.3 Roztoky o různém pH	21
3.2 Metody	21
3.2.1 Purifikace oocyst.....	21

3.2.2	Čištění oocyst na sacharózovém gradientu	22
3.2.3	Čištění oocyst na cesium chloridovém gradientu.....	22
3.2.4	Barvení oocyst dle Miláčka a Vítovce (1985).....	23
3.2.5	Potvrzení identity použitých izolátů	24
3.2.6	Ověřování životaschopnosti	28
3.2.7	Stanovení minimálního počtu parazitů.....	28
3.2.8	Proces testování vlivu teploty na excystaci.....	30
3.2.9	Proces testování vlivu pH na excystaci	30
3.2.10	Průtoková cytometrie	31
3.2.11	Design experimentu	31
3.2.12	Statistické vyhodnocení	32
4	Výsledky	33
4.1	Vitalita oocyst	33
4.2	Stanovení minimálního počtu parazitů.....	33
4.3	Vliv doby expozice na excystaci oocyst	34
4.4	Vliv teploty na excystaci oocyst	35
4.5	Vliv pH na excystaci oocyst.....	37
5	Diskuze.....	39
	Závěr	42
	Seznam použité literatury.....	43

Úvod

Kryptosporidie jsou jednobuněčné eukaryotické organismy, které náleží do kmene Apicomplexa. Všechny druhy kryptosporidií žijí parazitickým způsobem života a způsobují onemocnění známé jako kryptosporidie postihující obratlovce včetně člověka. Průběh infekce se liší v závislosti na druhu a genotypu kryptosporidie, na věku, respektive stáří hostitele a na jeho imunitním stavu. Lokalizace vývojového cyklu kryptosporidií v hostiteli je mezi druhy kryptosporidií rozdílná, přičemž rozlišujeme dvě fylogenetické skupiny kryptosporidií, a to početnější skupinu druhů parazitující ve střevě hostitele a menší skupinu druhů obývajících žaludek.

Práce je zaměřena na proces excystace, což je první fáze vývojového cyklu kryptosporidií. Při excystaci je parazit vystaven vnitřnímu prostředí zažívacího traktu hostitele a dochází k uvolnění infekčních sporozoitů v místě infekce. Excystace žaludečních druhů je spouštěna zejména faktory jako je tělesná teplota a pH žaludku. Doba, po kterou pH a teplota působí na oocysty, se zdá být také důležitá. U střevních druhů se k výše uvedeným faktorům dále přidává působení enzymů v tenkém střevě a přítomnost žlučových solí. Kromě vlivu na excystaci má teplota i pH vliv na životaschopnost oocyst i sporozoitů.

Tato diplomová práce navazuje na mou předcházející bakalářskou práci a podstatně rozšiřuje její výsledky ve studiu vlivů na excystaci žaludečních kryptosporidií savců. Na základě doposud dostupných naměřených dat bylo prokázáno, že tělesná teplota hostitele má velmi významný efekt na excystaci žaludečních kryptosporidií savců. Nad rámec práce byl mezi měření vlivů zahrnutý i vliv pH žaludku hostitele, který, jak je známo, má na proces excystace také značný vliv.

Doposud bylo zveřejněno poměrně málo studií, které se zaměřovaly na vliv těchto faktorů. Většina výzkumů je orientována na studium střevních druhů, zatímco žaludeční kryptosporidie dlouhodobě zůstaly mimo zájem vědeckých týmů a je zapotřebí rozšířit znalosti v této problematice. Z tohoto důvodu byla pozornost věnována faktorům ovlivňujícím excystaci žaludeční kryptosporidie savců, konkrétně druhu *Cryptosporidium muris* izolovaného z přirozeně infikované kočky.

1 Literární přehled

1.1 Rod *Cryptosporidium*

Kryptosporidie jsou jednobuněčné eukaryotní organismy spadající do kmene Apicomplexa (Volf a Horák, 2007). Jsou označovány jako obligátní gastrointestinální paraziti, kteří mohou infikovat většinu vodních a všechny suchozemské obratlovce včetně člověka (Bouzid et al., 2013). Zástupci tohoto kmene patří mezi veterinárně velmi závažné intracelulární parazity, adaptované na život uvnitř buňky (Volf a Horák, 2007).

Cryptosporidium bylo původně klasifikováno jako kokcidie na základě podobností životního cyklu (Levine, 1988). Ovšem životní cyklus kryptosporidií vykazuje několik zvláštností, kterými se od kokcidií odlišují. Kryptosporidie uvnitř hostitele parazitují na apikálním povrchu buněk, na rozdíl od kokcidií, které parazitují uvnitř buněk. U kokcidií existuje pouze jeden typ oocyst, naopak u kryptosporidií byly popsány dva typy, a to oocysty tenkostěnné a silnostěnné. Dalším rozdílem je necitlivost kryptosporidií na téměř všechna antikokcidika. Následné molekulární analýzy ukázaly bližší příbuznost mezi kryptosporidiemi a gregarinami (Hijjawi et al., 2004; Petry et al., 2004). V současné době jsou kryptosporidie považovány za samostatnou skupinu v rámci Apicomplexa.

1.2 Historický přehled

1907 Kryptosporidie poprvé popsal a pojmenoval E. E. Tyzzer. V roce 1907 publikoval nález vývojových stadií parazita, kterého nacházel v žaludečních žlázách a výkalech laboratorních myší (Tyzzer, 1907).

1910 Tyzzer navrhl pojmenování *Cryptosporidium muris* pro myší žaludeční izolát (Tyzzer, 1910).

1912 Tyzzer publikoval popis nového druhu, tentokrát nalezeného v tenkém střevě u laboratorních myší a navrhl ho pojmenovat *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer, 1912).

1929 Byla popsána endogenní stádia kryptosporidií v epitelu slepého střeva slepice (Tyzzer, 1929).

1955 Byl popsán nový druh kryptosporidie způsobující úhyny mladých krůt a pojmenován *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955).

1971 První zpráva o výskytu infekcí *Cryptosporidium* sp. u skotu spojovaných s průmovým onemocněním (Pancieri et al., 1971).

1976 První případy lidských infekcí způsobené kryptosporidii. V roce 1976 byly publikovány dvě rozdílné zprávy o nákaze osob. První nakaženou byla tříletá dívka s příznaky zvracení, bolestí břicha a vodnatého průjmu (Nime et al., 1976). Druhý pacient byl těžce dehydratovaný, imunosuprimovaný s chronicky vodnatým průjmem (Meisel et al., 1976). Oba pacienti žili na farmách skotu a v obou případech došlo k vyléčení.

1980–1989 V 80. letech 20. století došlo k propuknutí epidemie AIDS. Se zvýšeným počtem imunokompromitovaných osob došlo ke zvýšení hlášených případů kryptosporidiózy lidí (Casemore et al., 1985).

1986 Detailní popis vývojového cyklu kryptosporidií pomocí elektronové mikroskopie a byla pozorována vývojová stádia kryptosporidií (Current et Reese, 1986).

1993 První případ masivní infekce kryptosporidií v lidské populaci, v Milwaukee (USA) bylo odhadem infikováno 403 000 jedinců. Na kryptosporidie se začíná pohlížet jako na druh ohrožující veřejné zdraví. Dochází k novým výzkumům k pochopení zdrojů a přenosu, detekce a prevence šíření (Mac Kenzie et al., 1994).

2000 Popis nového druhu žaludeční kryptosporidie savců parazitujícího u skotu a pojmenovaného *Cryptosporidium andersoni* (dříve označované jako *C. muris-like*) (Lindsay et al., 2000).

2016 Popis třetího druhu žaludečních kryptosporidií savců pojmenovaného *Cryptosporidium proliferans* (dříve označované jako *C. muris* TS03) (Kváč et al., 2016).

V současné době je počet platných druhů rodu *Cryptosporidium* 51, přičemž bylo 33 druhů identifikováno u savců, z nichž je 20 druhů schopno infikovat lidi a zbylých 18 druhů bylo nalezeno u jiných zvířat (ryby, ptáci, obojživelníci a plazi) (Garcia et al., 2017; Ryan et al., 2021; Cruz-Saavedra et al., 2023).

1.3 Vývojový cyklus kryptosporidií

Vývojový cyklus kryptosporidií zahrnuje jak pohlavní, tak nepohlavní stadia a je ukončen uvolněním oocyst s trusem z těla infikovaného hostitele. Kryptosporidie potřebují ke svému vývoji pouze jednoho hostitele a jejich vývojový cyklus lze rozdělit do čtyř fází (obrázek 1).

Čtyři fáze vývojového cyklu:

1. Excystace (uvolnění infekčních sporozoitů)
2. Merogonie (nepohlavní množení v hostitelských buňkách)
3. Gametogonie (tvorba makrogamet a mikrogamet)
4. Sporogonie (tvorba oocysty)

1. Excystace

Cyklus začíná požitím oocysty hostitelem (obrázek 1). Po průniku do těla hostitele dochází k excystaci, neboli k expanzi sutury, která je podstatná k zahájení infekce. Jedná se o klíčovou fázi vývoje, při které sporozoit opouští oocystu a začíná infikovat epiteliální buňky hostitele. Oocysta se otevře na jednom pólu (sutura) a uvolní čtyři infekční sporozoity, které mají tvar půlměsíce a pohybují se klouzáním (Forney et al., 1998).

Jejich apikální komplex obsahuje rhoptrie, mikronemy a denzní granula. Mikronemy produkují protein podporující přilnutí k hostitelské buňce, zatímco rhoptrie se pravděpodobně podílí na vzniku parazitoformní vakuoly (PVM; *Parasitophorus Vacuole Membrane*), ve kterém je parazit uzavřen. U žaludečních kryptosporidií je parazit v PVM chráněn před nepříznivým žaludečním prostředím. Po celé buňce jsou uložena denzní granula, která uvolňují svůj obsah po vytvoření PVM a pravděpodobně modifikují tuto strukturu při napadení hostitelské buňky. Sporozoit se připojí k plazmatické membráně hostitelské buňky a transformuje se na replikativní trofozoit. Dochází k morfologickým změnám, které zahrnují zvětšení jádra a zakulacení parazita (Bonnin et al., 1999). Transformace z invazivního sporozoita na replikativní trofozoit je ovlivněna faktory odvozených jak z parazita, tak z hostitele (O'Hara a Chen, 2011). Vývoj trofozoitů doprovází tvorba „feeder organely“, která propojuje parazita s cytoplazmou hostitelské buňky a umožňuje parazitovi čerpat energii a živiny ze svého hostitele.

Tento proces je obecně spuštěn vlivem vnitřních podnětů v těle hostitele. Tato expozice stimuluje vypouštění infekčních sporozoitů, které jsou plně vysporulované a jsou schopni způsobit infekci v různých částech těla hostitele. V tomto bodě se naráží na rozdíl mezi kryptosporidiemi a kokciemi, které sporulují až po uvolnění za podmínek vnějšího prostředí – teplo a přítomnost kyslíku (Lindsay et al., 2000). K excystaci oocyst některých druhů může docházet v teplých vodních roztocích, což by mohlo být vysvětlením extraintestinálních infekcí (Fayer et al., 1990).

Excystace *in vitro* byla studovaná spíše u střevních druhů kryptosporidií (Rasmussen et al., 1993; Petry 2004; Pecková et al., 2016). Aby u střevních druhů byla vyvolaná excystace, musí dojít ke stimulaci kyselinami, žlučovými solemi, proteázami a redukčními činidly, což simuluje přechod přes žaludek do tenkého střeva (Pecková et al., 2016). Oproti tomu u žaludečních druhů zřejmě vyžadují pouze inkubaci při zvýšené teplotě (Widmer et al., 2007).

2. Merogonie

Životní cyklus postupuje fázemi asexuální merogonie. Trofozoiti se nepohlavně dělí za vzniku merontu typu I, který obsahu šest až osm merozoitů typu I. Tito merozoiti následně napadají přilehlé hostitelské buňky. První možností je pokračování ve vývoji dalších generací merontů typu I, čímž by docházelo ke zvyšování závažnosti infekce, nebo se mohou překlenout do vývoje merontu typu II, který obsahuje čtyři merozoity typu II. V tomto případě již nedochází ke zmnožení merontů, ale k iniciaci gametogonie, čímž začíná pohlavní část vývojového cyklu (Bouزيد et al., 2013).

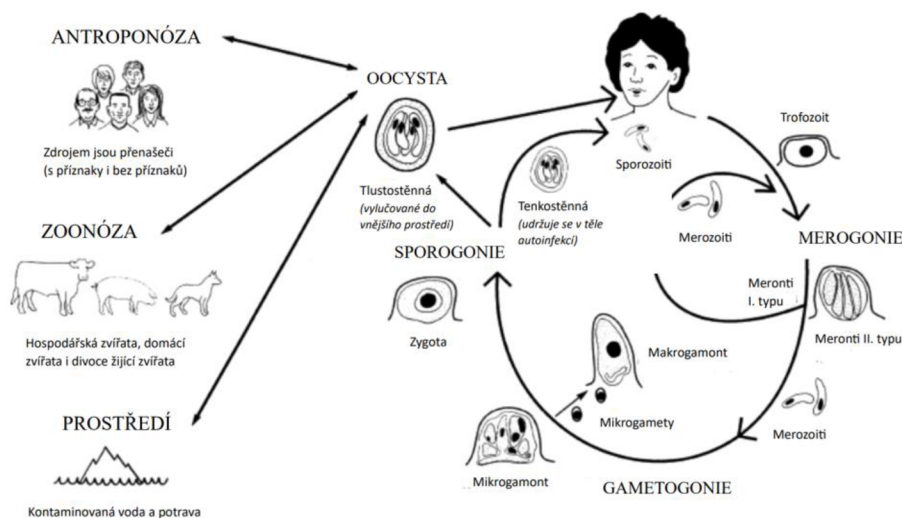
3. Gametogonie

Pohlavní stádium začíná změnou merozoitů typu II v nediferencované gamety, které se mění v makrogamonty (samičí sexuální reprodukční stádia) nebo mikrogamonty (samčí sexuální reprodukční stádia). Z makrogamontu vzniká jednobuněčná makrogametu. Mikrogamonty prochází jaderným dělením, čímž vzniká 16 mikrogamet, které se uvolňují z PVM a následně vyhledají a oplodní makrogametu. Tímto procesem vzniká zygota. Diploidní zygota podstupuje proces podobný meióze, nazývaným sporogonie (Current et al., 1986).

4. Sporogonie

Sporogonií, kterou prochází diploidní zygota, vznikají čtyři haploidní sporozoiti, kteří jsou uloženi v oocystě, která může být tenkostěnná nebo silnostěnná. Tenkostěnné oocysty mají za úkol udržovat infekci v těle hostitele formou autoinfekce (Bouزيد et al., 2013). K autoinfekci dochází, když se sporozoiti uvolní z tenkostěnných oocyst a jejich cyklus probíhá od začátku. Silnostěnné oocysty jsou vylučovány společně s trusem z těla infikovaného jedince, aby mohly být pozřeny jiným hostitelem (Bouزيد et al., 2013). Oocysty jsou meiotické spory, které jsou odolné vůči vnějšímu prostředí. Proto je pohlavní produkce oocyst klíčová pro další přenos infekce, ale může také hrát

důležitou roli v udržování pokračující infekce hostitele. Vytvořené oocysty jsou jedinečné tím, že dokážou dospívat v hostitelské tkáni a jsou schopny autoinfekce (Tandel et al., 2019).



Obrázek 1 - Zdroje infekce a vývojový cyklus *Cryptosporidium* (Mosier, 2004; upraveno)

1.3.1 Hostitelská specifita

Hostitelská specifita kryptosporidií se liší v závislosti na druhu a genotypu (Feng et al., 2011; Kar et al., 2011). Můžeme je rozdělit dle hostitelské specifity na dvě skupiny. První skupinou jsou druhy s širokou hostitelskou specifikou. Patří sem méně zastupců a jedná se o druhy, které je možné nalézt u širokého spektra živočišných druhů. Jsou to například *C. parvum* (Tyzzer, 1912), *C. ubiquitum* (Fayer et al., 2010), *C. meleagridis* (Slavin, 1955) nebo *C. baileyi* (Current et al., 1986).

Do druhé skupiny patří druhy, které jsou specifické pouze pro určité skupiny hostitelů, tedy druhy s úzkou hostitelskou specifikou. Do této skupiny náleží například *C. andersoni*, typický pro skot (Lindsay et al., 2000), nebo *C. muris*, který je sice typickým žaludečním druhem hlodavců (Kváč et al., 2008), ale byla popsána i přirozená infekce u velmi omezeného spektra dalších hostitelů. Nákaza *C. muris* byla popsána u větších savců, například u žirafy síťované (*Giraffa camelopardalis reticulata*) (Kodádková et al., 2010), velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) (Wang et al., 2021), nebo například u pštrosů (*Struthio camelus*) (Qi et al., 2014). Další infekce *C. muris* byly hlášeny u koček, psů (Li et al., 2019), horských koz a lidí (Xiao et al., 2004).

V rámci rodu *Cryptosporidium* existují také druhy, které byly nalezeny a popsány pouze u jednoho hostitele. Do této skupiny patří *C. huwi* parazitující u ryb

(Ryan et al., 2015) nebo *C. myocastoris*, které je infekční pro nutrie (Ježková et al., 2021).

1.3.2 Tkáňová specifita

Primární místa infekce jsou rozdílná, v závislosti na druhu kryptosporidie. Můžeme je rozdělit do dvou skupin na základě predilekce ke střevní nebo žaludeční sliznici. Většina druhů kryptosporidií je lokalizována ve střevech svých hostitelů. Nejčastěji parazitovaná část zažívací soustavy je tenké střevo, které je osidlováno například druhy *C. parvum* (Tyzzer 1912) nebo *C. hominis* (Morgan-Ryan et al. 2002). Slepé střevo nebývá častým místem výskytu kryptosporidií, ovšem primárně je toto místo osidlováno druhem *C. mortiferum* (Guo et al., 2015). Tlusté střevo taktéž není místem hojného výskytu kryptosporidií. Ze známých druhů osidluje tlusté střevo jen několik z nich, např. *C. microti* (Horčíčková et al., 2019), *C. ornithophilus* (Holubová et al., 2020), *C. rattii* (Ježková et al., 2021), *C. occultus* (Kváč et al., 2018) a *C. scrofarum* (Kváč et al. 2013). Menší skupina kryptosporidií je přizpůsobena vývoji ve žlázách žláznatého žaludku (tabulka 1). U savců byly identifikovány pouze tři druhy žaludečních kryptosporidií: *C. muris* (Tyzzer, 1907), *C. andersoni*, dříve známé jako *C. muris*-like (Lindsay et al., 2000) a *C. proliferans*, dříve známé jako *C. muris* kmen TS03 (Kváč et al., 2016).

Tabulka 1 - Přehled žaludečních druhů kryptosporidií (savčí druhy zvýrazněné)

Druh	Primární hostitel	Reference
<i>C. muris</i>	hlodavci	Tyzzer, 1907
<i>C. serpentis</i>	plazi	Levine, 1980
<i>C. reichenbachklinkei</i>	ryby	Paperna a Vilenkin, 1996
<i>C. andersoni</i>	skot	Lindsay et al., 2000
<i>C. molanri</i>	ryby	Alvarez-Pellitero a Sitjà-Bobadilla 2002
<i>C. galli</i>	ptáci	Pavlásek 1999; Rayen et al., 2003
<i>C. fragile</i>	žáby	Jirků et al., 2008
<i>C. huwi</i>	ryby	Ryan et al., 2015
<i>C. proliferans</i>	hlodavci	Kváč et al., 2016
<i>C. proventriculi</i>	papoušci	Holubová et al., 2019
<i>C. bollandi</i>	ryby	Bolland et al., 2020

V některých případech byly kryptosporidie nalezeny extraintestinálně u zvířat nebo u lidí s oslabeným imunitním systémem. Například *C. baileyi* (Current et al., 1986) je druh parazitující primárně v tenkém střevě, ale parazituje i v dalších částech střeva, kloace a může přirozeně infikovat i dýchací cesty.

1.4 Kryptosporidióza

Kryptosporidióza, onemocnění způsobené kryptosporidii, je celosvětově rozšířena a je jednou z nejčastějších příčin průjemových onemocnění u lidí a domácích zvířat (Xiao, 2010; Guérin a Striepen, 2020). Zdravotní problémy způsobené *Cryptosporidium* spp. byly označeny jako hlavní příčina zpomalení růstu a úmrtí imunokompromitovaných jedinců, narozených zvířat a dětí mladších dvou let zejména v rozvojových zemích (Kotloff et al., 2019; Liu et al., 2016). Kryptosporidióza je také významným problémem veřejného zdraví v ekonomicky rozvinutých zemích. Například ve Spojených státech se každý rok odhaluje až 800 000 případů kryptosporidiózy (Scallan et al., 2011) a počet hlášených ohnisek se zvyšuje, nejvíce v oblastech se špatnou hygienou (Gharpure et al., 2019; Dong et al., 2020). I když jsou příznaky po propuknutí infekce zmírněny, v trusu se vyskytuje stále velké množství infekčních oocyst, a to i po dobu několika týdnů (Innes et al., 2020).

1.4.1 Průběh infekce

Průběh infekce a závažnost onemocnění závisí na konkrétním druhu kryptosporidie a imunitním stavu jedince. Mezi hlavní klinické příznaky patří průjem, horečka, žaludeční potíže a zvracení (Vinayak et al., 2015) Největší problém nastává u pacientů s oslabeným imunitním systémem. Naopak u imunokompetentních jedinců je průběh nemoci mírný a průběh je v řadě případů bezpříznakový (O'Donoghue, 1995).

V rámci průběhu infekce se rozlišuje prepatentní a patentní perioda. Patentní doba označuje období, po kterou je kryptosporidie přítomná v hostiteli. Délka periody se liší v závislosti na druhu kryptosporidie a věku a imunitním stavu hostitele. U telat infikovaných *C. parvum* může být patentní perioda 1–12 dní (Tzipori, 1983), ale může být i výrazně delší, například u *C. scrofarum* více než 30 dní (Kváč et al., 2013). Průběh žaludeční kryptosporidiózy je chronický, patentní perioda je tedy výrazně delší než u střevních druhů a může přetrvávat jako celoživotní infekce (Lindsay et al., 2000; Kváč et al., 2008).

Prepatentní perioda je období od nákazy do vylučování prvních oocyst. Délka prepatentní periody byla popsána pomocí experimentálních infekcí. U žaludečních druhů se doba pohybuje v rozmezí 7–21 dní. U střevních druhů je délka od infekce do doby vylučování oocyst kratší, většinou v rozmezí 2–7 dnů. Prepatentní perioda se odvíjí od druhu kryptosporidie, věku, druhu a stavu hostitelova imunitního systému (Tzipori, 1983).

1.4.2 Přenos infekce

K nákaze kryptosporidii může dojít přímou nebo nepřímou cestou. K přímému přenosu dochází fekálně-orální cestou od infikovaného jedince. Může dojít k přenosu ze zvířete na zvíře, ze zvířete na člověka (zoonotická nákaza), ale stejně tak z člověka na zvíře nebo navzájem mezi lidmi (antroponotická nákaza) (Glaberman et al., 2002).

Důkazy o zoonotickém přenosu kryptosporidií zahrnují výzkumníky a veterinární studenty, kteří byli v kontaktu nejčastěji s nakaženými telaty (Bouzzid et al., 2013). Dalším zdrojem nákazy pro člověka mohou být volně žijící zvířata. Například kočky a potkani v městských ekosystémech mohou být přenašeči druhů jako je *C. parvum* (Tyzzer 1912), *C. felis* (Iseki, 1979) a *C. muris* (Tyzzer, 1907). Podle současných znalostí *C. felis* a *C. muris* nejsou velkým ohrožením veřejného zdraví.

Nepřímá nákaza je způsobena kontaktem jedinců s materiálem nebo potravou a vodou kontaminovanou kryptosporidii. K nejběžnějšímu způsobu nákazy dochází kontaminovanou vodou. Oocysty kryptosporidií jsou vysoce odolné, tudíž mohou přežít běžné filtrace nebo konvenční chlorace pitné vody (Campbell et al., 1982).

1.4.3 Terapie

V současné době neexistuje účinná léčba kryptosporidiózy. V Americe je nitazoxanid jediným léčivem proti kryptosporidióze schváleným FDA (*Food and Drug Administration*), nicméně stále zůstává neúčinný u imunokompromitovaných pacientů (Bones et al., 2019). V případě nákazy jde spíše o tlumení doprovodných příznaků podáváním protiprůjmových preparátů a rehydrataci organismu (Fayer et Xiao, 2007).

Všechny výzkumy vývoje a přeměny současných léčiv jsou zaměřeny na střevní druhy (Graczyk et al., 2011; Bessoff et al., 2014; Love et al., 2017; Manjunatha et al., 2017), vzhledem k jejich vysokému výskytu mezi lidmi. Vliv testovaných léků na žaludeční kryptosporidie není zatím znám. Na vyléčení kryptosporidiózy může mít vliv

i specifická imunitní odpověď. Pozornosti se v tomto směru dostává *C. parvum* (Zhou et al., 2012; Ming et al., 2017), u žaludečních druhů jsou informace o specifické imunitní reakci hostitele velmi omezené.

1.4.4 Diagnostika

Diagnostika kryptosporidií je prováděna parazitologickým vyšetřením trusu flotačními technikami (Arrowood a Sterling, 1987) v kombinaci s různými metodami barvení (Henriksen a Pohlenz, 1981; Baxby et al., 1984; Pohjola et al., 1984). Nicméně velikost oocyst jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií je velmi podobná a mikroskopické vyšetření nelze použít jako spolehlivý diagnostický nástroj pro rozlišení druhů a genotypů. Toto je možné pouze za použití molekulárních metod, které se v současné době staly zlatým standardem v diagnostice. Nejčastěji používané je molekulárně-genetické testování, založené na PCR (*Polymerase chain reaction*) a jejich modifikacích amplifikující malou podjednotku rRNA. Další možností je využití imunologických metod detekce. Nicméně tyto metody nelze použít pro diferenciální diagnostiku (O'Leary et al., 2021).

1.5 *Cryptosporidium muris*

1.5.1 Charakteristika

Všechna vývojová stádia *C. muris* prodělávají svůj vývoj na buňkách žaludeční sliznice, obdobně jako *C. andersoni* a neinfikují předžaludky přežvýkavců nebo nežláznatou oblast žaludku u hlodavců (Fayer et al., 1990; Fayer et al., 1991). Oocysty *C. muris* mají velikost $7,4 \times 5,6 \mu\text{m}$ (což je větší než například v porovnání s *C. parvum* s velikostí $5,0 \times 4,5 \mu\text{m}$) (Iseki et al., 1989).

1.5.2 Variabilita izolátů

V rámci druhu *C. muris* bylo nalezeno a popsáno pět izolátů, které se od sebe liší svými biologickými vlastnostmi.

***Cryptosporidium muris* izolát CB03** – Oocysty jsou elipsoidního tvaru o velikosti $7,49 \pm 0,13 \times 5,70 \pm 0,10 \mu\text{m}$ s indexem tvaru 1,32 (Kváč et al., 2008). Přirozeně byl tento izolát nalezený u velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) a experimentálně se podařila nákaza laboratorních myší (Kváč et al., 2008; Wang et al., 2021).

***Cryptosporidium muris* izolát MCR** – Velikost oocysty je $7,80 \pm 0,56 \times 5,89 \pm 0,36$ μm . Izolát byl získaný z korejské myši (*Apodemus peninsulae*). Experimentální nákaza byla popsána u křečka zlatého (*Mesocricetus auratus*) a z hospodářských zvířat u ovcí a koz (Rhee et al., 1991; 1998; 1999).

***Cryptosporidium muris* izolát RN66** – Oocysty se vyskytují ve dvou formách: malá forma: $5,3 \times 4,8$ ($5,0\text{--}6,0 \times 4,0\text{--}5,5$) μm a velká forma: $8,4 \times 6,3$ ($7,5\text{--}9,8 \times 5,5\text{--}7,0$) μm . Přirozená infekce byla nalezena u infikovaného potkana (*Rattus norvegicus*) a experimentální nákaza byla provedena u laboratorních myší (Iseki 1986; 1989).

***Cryptosporidium muris* izolát Kawatabi** – Oocysty mají velikost $5,70 \pm 0,59 \times 7,66 \pm 0,64$ μm s indexem tvaru 1,36. Byl vyizolován z japonské myšice východní (*Apodemus speciosus*) a taktéž byla provedena experimentální infekce laboratorních myší (Hikosaka et Nakai, 2005).

***Cryptosporidium muris* izolát z kočky** – Velikost oocyst je $8,0 \times 4,8$ μm . Tento izolát byl nalezen u přirozeně infikované kočky donesené ze zverimexu a experimentálně byl přenesen do laboratorních myší (Pavlásek et Ryan, 2007).

1.5.3 Patogenita

Cryptosporidium muris napadá žláznaté části žaludku, ve kterých zanechává histopatologické změny. Charakteristická je dilatace žaludečních žláz a drobné nahromadění lymfatických buněk (bez přítomnosti zánětu) (Kváč et Vítovec, 2003). Dále je popisována hypertrofie, hyperplazie, atrofie a metapazie žláznatého epitelu. Morfologicky jsou popisovány nálezy četných vývojových stádií (Taylor et al., 1999). Celkově nejsou popisovány žádné velké patologické anomálie a průběh je většinou bez zjevných příznaků (Özkul a Aydın, 1994).

1.5.4 Hostitelská specifita

Cryptosporidium muris má širší hostitelskou specifitu. Ačkoliv jsou jeho primárním hostitelem hlodavci, *C. muris* byl experimentálně přenesen a detekován u lidí a přirozené infekce byly popsány i jiných druhů savců (Kodádková et al., 2010; Wang et al., 2021). Oocysty byly detekovány i v trusu dravých ptáků, ještěrek, hadů a žab. V těchto případech nešlo o aktivní cestu infekce, spíše o nákazu pozřením infikovaného hlodavce (Kváč et al., 2016). Podobným způsobem mohla být způsobena nákaza prasat

z prasečí farmy, protože za experimentálních podmínek prasata nejsou k *C. muris* vnímavá (Kváč et al., 2012). Další přirozené infekce byly nalezeny u morčat, králíků, jehňat nebo u koček (Aydin et Ozkul, 1996; Iseki et al., 1989; Rhee et al., 1995; Pavlásek et Ryan, 2007).

1.6 Kryptosporidiové infekce koček

Nejznámějším a nejběžnějším kočičím druhem je *Cryptosporidium felis*, který infikuje tenké střevo. U koček bylo *C. felis* poprvé popsáno v roce 1979 (Iseki, 1979) a následně molekulárně charakterizováno v roce 1998 (Sargent et al., 1998).

Kryptosporidióza u koček probíhá obecně asymptomaticky, u mladých a novorozených koťat může být onemocnění doprovázené průjmem. U velmi závažných infekcí může dojít k degradaci epitelálních buněk nebo k degradaci klků (Scorza et al., 2010). Z pozdějších studií se ukázalo, že hostitelská specifita *C. felis* není omezená pouze na kočky, jak se na první pohled zdálo a v roce 1999 byl tento druh identifikován u krávy (Bornay-Llinares et al., 1999).

Z doposud známých druhů kryptosporidií bylo u koček detekováno pět druhů: *C. muris* (Tyzzer, 1907), *C. ryanae* (Fayer et al., 2008), *C. parvum* (Tyzzer, 1912), *C. felis* (Iseki, 1979) a *Cryptosporidium* sp. rat genotyp III (Sargent et al., 1998; Santín et al., 2006; Yang et al., 2015).

První přirozený nález *C. muris* u kočky popisují ve své publikaci Pavlásek a Ryan (2007). Doprovodnými příznaky u infikované kočky byla gastroenteritida a zvracení. Symptomatická léčba pomocí veterinárních preparátů neměla v tomto případě žádný vliv a opakované koprologické vyšetření ukázalo, že počet vylučovaných oocyst zůstává neměnný. I přes tuto skutečnost se zdravotní stav kočky po dvou měsících postupně stabilizoval. Zdroj infekce kočky v této studii není doposud známý, s největší pravděpodobností došlo k nakažení ve zverimexu, odkud byla kočka zakoupena (Pavlásek a Ryan, 2007).

FitzGerald et al. (2011) ve své studii dodali, že *C. muris* přirozeně infikuje žaludek koček a nejedná se zde pouze o mechanický transport parazita hostitelem (FitzGerald et al., 2011).

2 Cíle práce

- 1) Cílem práce je navázat na bakalářskou práci a studovat vliv tělesné teploty hostitele a pH prostředí na excystaci oocyst nového izolátu *C. muris* CAT21 získaného z přirozeně infikované kočky.
- 2) Pomocí *in-vitro* experimentů popsat efekt studovaných vlivů na excystaci oocyst a životaschopnost oocyst a sporozoitů.
- 3) Zpracovat výsledky příslušnými statistickými metodami a porovnat je s publikovanými údaji.

3 Materiál a metodika

3.1 Materiál

3.1.1 Zdroj oocyst pro experiment

Pro experimentální účely diplomové práce byly využity oocysty *Cryptosporidium muris* izolát CAT21 získaný z kočky domácí (*Felis catus* f. *domestica*). Tímto izolátem bylo infikováno deset imunodeficientních SCID myší, ve kterých byl izolát dlouhodobě udržován jako zdroj oocyst pro experiment. Myším byla perorálně aplikovaná infekční dávka o koncentraci 1×10^6 oocyst. Pro kontrolu vylučování kryptosporidií byl od jednotlivých myší odebrán trus, ze kterého byly prováděny nátěry, které byly následně barveny dle Miláčka a Vítovce (1985) a prohlíženy světelným mikroskopem.

Pro experiment stanovení minimálního počtu parazitů byly použity oocysty *Cryptosporidium proliferans*. Izolát byl původně získán z hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) a je dlouhodobě uchováván v imunodeficientních SCID myších.

Imunodeficientní SCID myši byly umístěny ve zvěřinci v Parazitologickém ústavu BC AV ČR, v.v.i. Zvířata byla chovaná v plastových nádobách určených pro hlodavce na podestýlce z dřevěných pilin. Výměna podestýlky byla prováděna jednou za čtrnáct dní. Myši byly krmené sterilizovaným krmivem určeným pro hlodavce a vodou *ad libitum*.

3.1.2 Skladování oocyst

Kryptosporidie pro experiment byly skladovány při teplotě 4 °C v dH₂O. Maximální doba mezi sbíráním a purifikací oocyst byla 14 dnů.

3.1.3 Roztoky o různém pH

Pomocí pracovního 1× PBS, 1M HCl a 1M NaOH a pH metru bylo připraveno osm roztoků o pH 2–9.

3.2 Metody

3.2.1 Purifikace oocyst

Trus imunodeficientních SCID myší, pozitivní na *Cryptosporidium muris* CAT21, byl zhomogenizován v třecí misce s deionizovanou vodou a přečištěn na sacharózovém a následně na cesium chloridovém gradientu. Přečištěné oocysty byly uchované v dH₂O při 4 °C.

3.2.2 Čištění oocyst na sacharózovém gradientu

Seznam použitých chemikálií:

- 1% PBS Tween (přidání 0,5 ml Tween 20 do 1 l PBS; 80 g NaCl; 2,4 g KH₂PO₄; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄ × 12 dH₂O – doplnit na 1 l dH₂O, upravit pH na 7,2)
- Sheaterův roztok (cukr 405 g, dH₂O 259 ml)
- Pracovní Sheaterův roztok 1+2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween)
- Pracovní Sheaterův roztok 1+4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

Postup:

- 1) Rozmíchat trus v malém množství dH₂O a následně zhomogenizovat v třecí misce
- 2) Přefiltrovat suspenzi přes jemné síto (o velikosti ok 200 µm)
- 3) Řádně promíchat Sheaterovy roztoky před začátkem vrstvení
- 4) Navrstvit sacharózový gradient do čtyř 100 ml skleněných zkumavek
 - Vrstva 1 30 ml Sheater 1+2
 - Vrstva 2 30 ml Sheater 1+4
 - Vrstva 3 15 ml vodného roztoku vzorku
- 5) Centrifugovat 20 minut/1370 g při 4 °C
- 6) Odsát horní zabarvenou vrstvu pomocí vodní vývěvy a zbylý obsah přenést do nových zkumavek, sediment vyhodit
- 7) Doplnit obsah zkumavek dH₂O
- 8) Centrifugovat 20 minut/1370 g při 4 °C
- 9) Odsát obsah zkumavky do ½ pomocí vodní vývěvy, doplnit do plného objemu dH₂O, centrifugovat 20 minut/1370 g při 4 °C
- 10) Krok číslo 8 opakovat znovu, dokud nebude promývací proces proveden celkem 3×
- 11) Zbylé sedimenty přenést do jedné zkumavky (uchování při 4 °C)

3.2.3 Čištění oocyst na cesium chloridovém gradientu

Seznam použitých chemikálií:

- CsCl (cesium chlorid; 1,15 g/ml)
- PBS (viz 3.2.2)

Postup:

- 1) Napipetovat 1 ml CsCl do mikrozkušavky o objemu 2 ml
- 2) Navrstvit 500 µl oocyst (uchovaných v PBS) do mikrozkušavky s CsCl
- 3) Centrifugovat (16 000 g/3 minuty při 20 °C)
- 4) Přepipetovat supernatant do 50 ml zkumavek (sediment vyhodit)
- 5) Doplnit zkumavku do plného objemu dH₂O
- 6) Centrifugovat (1 370 g/20 minut při 4 °C)
- 7) Odsát supernatant na objem 5 ml, doplnit do plného objemu dH₂O, zvortexovat, centrifugovat (1 370 g/20 minut při 4 °C)
- 8) Krok číslo 7 opakovat 3×
- 9) Oocysty uchovat v dH₂O při 4 °C

3.2.4 Barvení oocyst dle Miláčka a Vítovce (1985)

Seznam použitých chemikálií:

- Methanol
- Roztok methylvioleti – 0,6 g methylvioleti, 1 g fenolu, 1 ml anilinu, 70 ml dH₂O, 30 ml alkoholu-ethanolu
- 2% kyselina sírová
- 1% roztok tantrazinu v 1% kyselině octové

Postup:

- 1) Na podložní sklíčko provést tenký nátěr trusu
- 2) Sklíčko s nátěrem ponořit do methanolu a ihned fixovat v plamenu
- 3) Vložit sklíčko do stojánku a ponořit do methylvioleti (nechat působit po dobu 30 minut)
- 4) Opláchnout podložní sklíčko pod tekoucí vodou
- 5) Vložit sklíčko do roztoku 2% kyseliny sírové (nechat diferencovat 2 minuty)
- 6) Opláchnout podložní sklíčko pod tekoucí vodou
- 7) Vložit sklíčko do 1% roztoku tantrazinu v 1% kyselině octové (působení po dobu 2–5 minut)
- 8) Opláchnout sklíčko pod tekoucí vodou a dát sušit
- 9) Nátěr prohlížet světelným mikroskopem (zvětšení 1000×, za použití imerzního oleje)

3.2.5 Potvrzení identity použitých izolátů

Izolace DNA z trusu

Použitý komerčně vyrobený kit: Exgene™ Stool DNA mini (GeneAll ®)

Součásti kitu:

- PB pufr
- FL pufr
- NW pufr
- MiniSpin column
- EzPass column
- Mikrocentrifugační zkumavky (1,5 ml)

Postup:

- 1) Vzorek trusu (200 mg) dát do Safe-lock Tube
- 2) Přidat skleněné a zirkonové kuličky a napipetovat 1 ml FL pufru
- 3) Vzorek homogenizovat přístrojem FastPrep®24 (MP Biomedicals, CA, USA) 1 minutu (5,5 m/s)
- 4) Inkubovat 5 minut při pokojové teplotě
- 5) Centrifugovat 16 000 g/5 minut
- 6) Veškerý supernatant přenést na EzPass kolonku
- 7) Centrifugovat 16 000 g/1 minutu (odpad ze sběrné zkumavky vylít)
- 8) EzPass kolonku přenést do nové 1,5 ml zkumavky, přidat 100 µl EB pufru
- 9) Inkubovat při laboratorní teplotě 1 minutu, následně centrifugace 16 000 g/1 minutu
- 10) EzPass kolonku vyhodit, k filtrátu do sběrné zkumavky přidat 500 µl PB pufru, pipetováním promíchat
- 11) Veškerý obsah sběrné zkumavky přenést na MiniSpin column
- 12) Centrifugovat 16 000 g/1 minutu (odpad ze sběrné zkumavky vylít)
- 13) Na střed kolonky napipetovat 500 µl NW pufru
- 14) Centrifugovat 16 000 g/1 minutu (odpad ze sběrné zkumavky vylít)
- 15) Znovu centrifugovat 16 000 g/1 minutu, aby došlo k úplnému odstranění zbytků NW pufru (odpad ze sběrné zkumavky vylít)
- 16) MiniSpin kolonku přendat do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky
- 17) Na kolonku napipetovat EB pufr (200 µl)

18) Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, následně centrifugace 16 000 g/1 minutu

19) Odstranit kolonku, purifikovanou DNA skladovat při teplotě -20 °C do použití PCR metody

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro ověření identity používaného izolátu byla provedena amplifikace genu pro malou podjednotku rRNA (SSU) pomocí nested PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita gDNA *Cryptosporidium tyzzeri* a jako negativní kontrola byla použita PCR voda. Reakce PCR byla provedena v celkovém objemu 20 µl.

Složení reakce:

- 10 µl komerčně dodávaného HS-Taq premix (GenAll, Korea): 2U HS-TaqDNA polymeráza, 200 µM dNTPs, 2,5mM MgCl₂, loading dye a stabilizátor
- 7 µl PCR vody
- 0,5 µl forward primer (200 mM) a 0,5 µl reverse primer (200 mM)
- 2 µl gDNA nebo 2 µl produktu primární reakce v případě sekundární reakce

Amplifikační program se skládal z primární denaturace (3 minuty při 95 °C), 35 opakujících se cyklů po dobu 45 sekund při 95 °C, nasedání primerů při teplotě 55 °C po dobu 45 sekund a elongace řetězců po dobu 1 minuty při 72 °C. Závěrem byla provedena konečná extenze po dobu 10 minut při 72 °C.

Použité primery:

Primery pro primární reakci (forward a reverse primer):

F1: 5' -TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'

R1: 5' -CCC ATT TCC TTC AAA CAG GA-3'

Primery pro sekundární reakci (forward a reverse primer):

F2: 5' -CGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'

R2: 5' -AAG GAG CAA CAC ACA CAC-3'

Gelová elektroforéza

Seznam použitých chemikálií:

- Ethidium-bromid (10 mg / 1 ml; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 50× TAE pufr (pH 8,00; 0,5 M EDTA 100 ml, Tris báze 242 g, ledová kyselina octová 47,1 ml)
- Agaróza (Biotech, Heidelberg, Německo)
- DNA Ladder (100 bp)

Postup:

- 1) Připravit hřebeny do nosiče
- 2) Navážit agarózu a 1×TAE pufr dle velikosti nosiče, smíchat v Erlenmeyerově baňce a zahřívát v mikrovlnné troubě (dokud nevznikne homogenní směs)
- 3) Po zahřátí ochladit baňku pod tekoucí vodou
- 4) Po zchlazení přidat 1 µl ethidium-bromidu
- 5) Vzniklou směs vylít do předem připraveného nosiče a nechat ztuhnout (15–20 minut)
- 6) Po ztuhnutí vyndat hřebeny a gel vložit do elektroforetické vany s TAE puforem
- 7) Do prvního slotu nanést 10 µl velikostního markeru, do ostatních slotů nanést 20 µl PCR produktů
- 8) Spustit elektroforézu po dobu cca 50 minut (při napětí 90 V), aby došlo k separaci jednotlivých fragmentů
- 9) Vizualizovat fragmenty pomocí UV transiluminátoru

Izolace DNA fragmentů z gelu

Jednotlivé fragmenty DNA byly vyizolovány komerčně vyráběným kitem Gen Elute™. Postupovalo se dle doporučení výrobce.

Součásti kitu:

- Elution Solution
- Gel Solubilization Solution
- Wash Solution G
- Column Preparation Solution

Postup:

- 1) Z agarózového gelu vyříznout jednotlivé fragmenty DNA pomocí skalpelu a vložit je do zkumavek (1,5 ml)
- 2) Do zkumavky s vyříznutým fragmentem napipetovat Gel Solubilization Solution (300 µl/100 mg gelu)
- 3) Inkovat 10 minut při 50 °C – kontrolovat rozpouštění fragmentu, promíchat každé 2–3 minuty
- 4) Pro eluci nechat inkubovat PCR vodu při 65 °C
- 5) Na Binding Column G napipetovat 500 µl Column Preparation Solution
- 6) Centrifugovat 16 000 g/1 minutu
- 7) Do zkumavky připipetovat 150 µl isopropanolu a promíchat
- 8) Veškerý objem vzorku přepipetovat na kolonku (Binding Column G)
- 9) Centrifugovat 16 000 g/1 minutu
- 10) Obsah sběrné zkumavky vylít, na kolonku přidat 700 µl Wash Solution G
- 11) Centrifugovat 16 000 g/1 minutu
- 12) Obsah sběrné zkumavky vylít, opět centrifugovat 16 000 g/1 minutu bez přídavku jakýchkoliv roztoků
- 13) Poté otočit zkumavku v centrifuze o 180° a znovu centrifugovat při 16 000 g/3 minuty
- 14) Kolonku vložit do nové 1,5ml zkumavky a na střed kolonky napipetovat 30 µl PCR vody (zahřáté na 65 °C)
- 15) Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě
- 16) Centrifugovat 16 000 g/1 minutu
- 17) Získaný produkt skladovat v 1,5 µm mikrozukmavce (uchovat v chladničce při 4 °C)

Genotypizace

Produkty sekundární PCR reakce byly sekvenovány v komerčních laboratořích pomocí sekundárních prmerů a ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitu. Sekvence vzorků byla provedena z obou konců. Sekvence nukleotidů byly analyzovány programem ChromasPro a BioEdit a porovnané se sekvencemi uloženými v databázi GeneBank.

3.2.6 Ověřování životaschopnosti

Životaschopnost oocyst byla stanovena průtokovým cytometrem před každým začátkem měření. Oocysty byly barvené propidium jodidem (PI), který proniká přes narušenou cytoplazmatickou membránu oocyst. Tato metoda se využívá k vizualizaci mrtvých oocyst kryptosporidií, které následně svítí jasně červenou barvou. Vlnová délka excitace PI je 536 nm a vlnová délka emise je 617 nm.

Pracovní roztok:

- PI (propidium jodid – rozpustit 1 mg PI v 50 ml PBS)

Postup:

Kontrola – devitalizované oocysty

- 1) Resuspendovat $0,2 \times 10^6$ oocyst ve 450 μ l dH₂O
- 2) Do zkumavky určené pro průtokový cytometr napipetovat 450 μ l oocyst v dH₂O
- 3) Vystavit oocysty působení vysoké teploty (90 °C) po dobu minimálně 10 minut
- 4) Připipetovat 100 μ l PI + 50 μ l referenčních fluorescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA)
- 5) Inkubace ve tmě a při laboratorní teplotě po dobu 15 minut
- 6) Před zahájením měření uchovat v temnu a na ledu

Vlastní měření

- 1) Resuspendovat $0,2 \times 10^6$ oocyst ve 450 μ l dH₂O
- 2) Do zkumavky určené pro průtokový cytometr napipetovat 450 μ l oocyst v dH₂O + 100 μ l PI + 50 μ l referenčních fluorescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA)
- 3) Nechat inkubovat alespoň 15 minut (ve tmě, při laboratorní teplotě)
- 4) Než bude zahájeno měření průtokovým cytometrem uchovat v temnu a na ledu

3.2.7 Stanovení minimálního počtu parazitů

Při pokusu s *Cryptosporidium andersoni* v předcházející bakalářské práci, byla udávána koncentrace pro jedno měření průtokovým cytometrem $0,5 \times 10^6$ oocyst/450 μ l dH₂O. Z důvodu nižší výtěžnosti *Cryptosporidium muris* CAT21 a kvůli úspornějšímu

nakládání s izolátem, byl stanovený minimální počet parazitů. Tato hranice udává minimální koncentraci oocyst, kterou je možné použít pro jedno měření průtokovým cytometrem BD FACSCanto™ II (Parazitologický ústav BC AV ČR, v.v.i.). Pro stanovení minimálního počtu parazitů byly použity oocysty *Cryptosporidium proliferans*.

Postup:

Kontrola

- 1) Vytvořit zásobní roztok 10×10^6 oocyst v 9 ml dH₂O
- 2) Vzít 5×450 µl ze zásobního roztoku (500 000 oocyst) a dát do 5 samostatných FC zkumavek (FC – flow cytometry; zkumavky do průtokového cytometru)
- 3) Do každé FC zkumavky přidat 50 µl referenčních fluorescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA)
- 4) Provést kalibraci přístroje (nastavení gate pro měření)

Vlastní měření:

- 1) Vzít 450 µl ze zásobního roztoku do 5000 µl zkumavky. Inkubovat 30 minut ve vodní lázni při 38 °C. Následně dát oocysty na led a před každým pipetováním lehce promíchat
- 2) Vzít 5×450 µl z inkubovaných oocyst (500 000 oocyst) a dát do 5 samostatných FC zkumavek a přidat 50 µl referenčních fluorescenčních kuliček. Změřit excystaci v porovnání s kontrolou
- 3) Vzít 5×180 µl z inkubovaných oocyst (200 000 oocyst) a dát do 5 samostatných FC zkumavek a přidat 270 µl dH₂O a 50 µl referenčních fluorescenčních kuliček. Změřit excystaci v porovnání s kontrolou
- 4) Vzít 5×90 µl z inkubovaných oocyst (100 000 oocyst) a dát do 5 samostatných FC zkumavek a přidat 360 µl dH₂O a 50 µl referenčních fluorescenčních kuliček. Změřit excystaci v porovnání s kontrolou
- 5) Vzít 5×45 µl z inkubovaných oocyst (50 000 oocyst) a dát do 5 samostatných FC zkumavek a přidat 405 µl dH₂O a 50 µl referenčních fluorescenčních kuliček. Změřit excystaci v porovnání s kontrolou

3.2.8 Proces testování vlivu teploty na excystaci

Postup:

Kontrola

- 1) Do FC zkumavky (FC – flow cytometry; určené pro průtokový cytometr) napi-petovat 450 µl přečištěných oocyst (o koncentraci 200 000 oocyst/450 dH₂O) a 50 µl referenčních fluorescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA)
- 2) Zvortexovat vzorek a změřit průtokovým cytometrem
- 3) Provést kalibraci přístroje (nastavení gate pro měření)
- 4) Do předem připravené tabulky zapsat hodnoty: počet referenčních fluorescen-čních kuliček (10 000) a počet oocyst na 10 000 kuliček
- 5) Měření 10× opakovat (výsledné hodnoty se zprůměrují)

Vlastní měření:

- 1) Do FC zkumavky napi-petovat 450 µl přečištěných oocyst (o koncentraci 200 000 oocyst/450 µl dH₂O)
- 2) Vložit zkumavku do vodní lázně vytemperované na požadovanou teplotu (21–44 °C)
- 3) Při jedné teplotě změřit 20 vzorků rozdělených do tří časových intervalů: 10 vzorků zahřívát po dobu 5 minut, 10 vzorků zahřívát po dobu 15 minut, 10 vzorků zahřívát po dobu 30 minut
- 4) Vyndat vzorky z vodní lázně na led a připipetovat 50 µl referenčních flu-orescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA)
- 5) Zvortexovat vzorek
- 6) Změřit excystaci v porovnání s kontrolou a zapsat hodnoty do tabulky

3.2.9 Proces testování vlivu pH na excystaci

Na základě testování vlivu teploty se prokázalo, že oocysty *Cryptosporidium muris* CAT21 nejlépe excystují při teplotě 37 °C. Z tohoto důvodu bylo namísto 450 µl dH₂O použito osm roztoků PBS o pH 2,00–9,00, které byly zahřáté ve vodní lázni na 37 °C po dobu 30 minut. K určitému pH se vždy vztahovalo 20 měření (10× 30 minut + 10× kontrola).

Postup:

Kontrola

- 1) Do zkumavky určené pro průtokový cytometr napipetovat 450 µl přečištěných oocyst (o koncentraci $0,2 \times 10^6$ oocyst/450 µl PBS; pH 2,00–9,00) a 50 µl referenčních fluorescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA)
- 2) Zvortexovat vzorek a změřit průtokovým cytometrem
- 3) Kalibrace přístroje (nastavení gate pro měření)
- 4) Do předem připravené tabulky zapsat hodnoty: počet referenčních fluorescenčních kuliček (10 000) a počet oocyst na 10 000 kuliček
- 5) Měření 10× opakovat (výsledné hodnoty se zprůměrují)

Vlastní měření

- 1) Do FC zkumavky 450 µl přečištěných oocyst (o koncentraci $0,2 \times 10^6$ oocyst/450 µl PBS; pH 2,00–9,00)
- 2) Vytemperovat vodní lázeň na teplotu 37 °C
- 3) Při 37 °C změřit 10 vozků, zahřívát po dobu 30 minut v určitém roztoku pH
- 4) Vyndat vzorky z vodní lázně na led a připipetovat 50 µl referenčních fluorescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA)
- 5) Zvortexovat vzorek
- 6) Změřit excystaci průtokovým cytometrem v porovnání s kontrolou
- 7) Zapsat hodnoty do tabulky

3.2.10 Průtoková cytometrie

Pro měření vlivu pH a teploty na excystaci oocyst *Cryptosporidium muris* byl použit průtokový cytometr BD FACSCanto™ II v laboratoři Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. v Českých Budějovicích.

3.2.11 Design experimentu

Deseti imunodeficientním SCID myším byla jednotlivě aplikovaná infekční dávka *Cryptosporidium muris* CAT21 o koncentraci 1×10^6 oocyst. Individuálně byl od infikovaných zvířat odebírán trus, ze kterého byly prováděny nátěry (barvením dle Mi-

láčka a Vítovce, 1985; viz 3.2.4) z důvodu kontroly vylučování kryptosporidií. Pozitivní trus na *C. muris* CAT21 byl průběžně odebíráán a skladován v dH₂O při 4 °C. Maximální doba mezi skladováním a purifikací oocyst byla 14 dnů, z důvodu nízké stability oocyst. Nasbíraný trus byl přečištěn na sacharózovém (viz 3.2.2) a následně na cesium chloridovém gradientu (viz 3.2.3). Až do okamžiku měření průtokovým cytometrem byly přečištěné oocysty skladované v dH₂O při 4 °C. Dále byl sledován vliv tělesné teploty hostitele (viz 3.2.8.) a vliv pH prostředí (viz 3.2.9.) na excystaci žaludeční kryptosporidie *C. muris* CAT21.

3.2.12 Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení vlivu teploty, pH a doby působení byl použitý dvouvýběrový t-test pro testování rovnosti dvou středních hodnot bez předpokladu shody rozptylu. V případě testování vlivu pH a vlivu teplot na excystaci byla zredukována po vzoru Bonferroniho metody hladina jednotlivých testů, aby zůstala zachována celková hladina významnosti 0,05. K modelování vztahů mezi excystací a vlivem teplot a pH byl nejprve sestaven prostý lineární model, který byl odhadnutý pomocí metody nejmenších čtverců. Po prokázání nelinearity vztahu při vlivu teplot na excystaci a vlivu pH na excystaci byl použitý neparametrický přístup prostřednictvím B-splinů. Všechny numerické výpočty a grafy byly realizovány v programovacím prostředí R verze 4.2.2

4 Výsledky

4.1 Vitalita oocyst

Během experimentu docházelo ke spotřebě velkého množství oocyst, které bylo zapotřebí opakovaně získávat z infikovaných imunodeficientních SCID myši. Proto bylo potřeba stanovit životaschopnost oocyst před započítáním všech *in vitro* experimentů. Životaschopnost byla ověřována za použití metody průtokové cytometrie a barvením PI. Vitalita kontrolních oocyst byla měřena před každým experimentem v pěti opakováních. Během práce se vitalita oocyst pohybovala v rozmezí 97,5 – 98,2 %.

4.2 Stanovení minimálního počtu parazitů

Před započítáním experimentů sledujících vliv pH a teploty na excystaci byl stanoven minimální počet oocyst potřebných k měření průtokovým cytometrem tak, aby použitá koncentrace neměla zásadní vliv na výsledky měření excystace. V mé předešlé bakalářské práci byla používána koncentrace $0,5 \times 10^6$ oocyst/450 μ l dH₂O. Byla testovány koncentrace oocyst $0,2 \times 10^6$, $0,1 \times 10^6$ a $0,05 \times 10^6$ ve 450 ml dH₂O. Výsledky testování ukázaly, že při snížení koncentrace z $0,5 \times 10^6$ na $0,2 \times 10^6$ byl rozdíl mezi měřeními 8,5 % (tabulka 2). Tento rozdíl jsme považovali za zanedbatelný, proto bylo možné koncentraci oocyst snížit. Tímto postupem bylo zajištěno úsporné nakládání s izolátem *C. muris* CAT21, který je vylučován ve velmi malém množství.

Tabulka 2 – Vliv koncentrace oocyst na přesnost měření excystace *Cryptosporidium proliferans* průtokovým cytometrem.

Koncentrace oocyst [počet oocyst/450 μ l dH ₂ O]	Pokles vůči kontrole [%]	Procentuální rozdíl [%]
$0,5 \times 10^6$ (kontrola)	100	0
$0,2 \times 10^6$	91,49	8,51
$0,1 \times 10^6$	87,66	12,34
$0,05 \times 10^6$	85,97	14,03

4.3 Vliv doby expozice na excystaci oocyst

V rámci testování vlivu teploty a doby expozice jsme testovali, zda se mění množství excystovaných oocyst, pokud jsou vystaveny rozdílné době působení při konkrétní teplotě. Měření byla prováděna ve třech časových úsecích 5, 15 a 30 minut. Nejvyšší hodnota excystovaných oocyst zaznamenána při době působení 30 minut a 37 °C (tabulka 3), kdy excystovalo 92 % oocyst. Velmi vysoký počet excystovaných oocyst byl pozorován i při době působení 30 minut a teplotách 38 a 39 °C (89–91 % excystovaných oocyst).

Tabulka 3 – Změny v počtech nevyexcystovaných oocyst *Cryptosporidium muris* CAT21 při vlivu různých teplot a rozdílné době expozice. Kontrola udává počet oocyst před jakýmkoliv zásahem. Výsledné hodnoty vyjadřují průměry z deseti na sobě nezávislých měření dobách expozice 5, 15 a 30 minut. Významný pokles byl zaznamenán při 37 °C a expozici 30 minut (označeno zeleně).

Teplota	Čas expozice (minuty)		
	5	15	30
Kontrola 4 °C	72608	72608	72608
21 °C	64543	64946	63264
22 °C	64974	64798	63021
23 °C	65106	63695	63122
24 °C	65057	63786	61955
25 °C	61983	62310	61941
26 °C	62086	61292	60808
27 °C	62179	60431	62847
28 °C	60669	60669	63499
29 °C	60497	58971	55878
30 °C	57991	54714	52702
31 °C	56722	52873	51740
32 °C	56415	52177	52465
33 °C	58191	50170	51539
34 °C	44850	44850	41976
35 °C	54080	29230	25962
36 °C	44781	18066	12289
37 °C	23929	12291	5731
38 °C	19353	9290	6795
39 °C	14980	8756	7654
40 °C	10166	7219	5476
41 °C	7510	4975	5473
42 °C	6283	5477	4852
43 °C	5833	4925	5116
44 °C	5816	4911	4824

Pro ověření, zda má odlišná doba expozice vliv na excystaci, byly porovnávány mezi sebou expozice 5 a 15 minut, 15 a 30 minut a 5 a 30 minut (tabulka 4). Bylo vybráno sedm teplot, které byly otestovány pomocí dvouvýběrového t-testu. Ukázalo se, že

v případě rozdílu 5 a 15 minut působení, u nižších teplot (21–30 °C) a naopak i u velmi vysokých (nad 40 °C) nedochází k významným změnám v počtu excystovaných oocyst. Při teplotách 37–39 °C excystovalo nejvíce oocyst. Zároveň jsme u těchto teplot pozorovali významné změny v počtu excystovaných oocyst v časových expozicích 5 vs 15 minut, 15 vs 30 i 5 vs 30 minut. Při vysokých teplotách (nad 40 °C) již nedocházelo ke zjevným změnám a počty oocyst byly většinou ve všech třech případech konstantní. (tabulka 4)

Tabulka 4 - Statistické testování vlivu expozice na excystaci *C. muris* CAT21 pomocí dvouvýběrového t-testu pro testování rovnosti dvou středních hodnot bez předpokladu shody rozptylu ($\alpha = 0,05$). Výsledné hodnoty udávají p-value, barvy od sebe odlišují statisticky významné (zelená; $P < 0,05$) a nevýznamné (červená; $P > 0,05$) vztahy tří testovaných časů (5 a 15 minut, 15 a 30 minut, 5 a 30 minut).

Teplota	Čas expozice (minuty)		
	5 vs 15	15 vs 30	5 vs 30
22 °C	0,6731	<0,001	0,00023
28 °C	1	<0,001	<0,001
34 °C	1	<0,001	<0,001
37 °C	<0,001	<0,001	<0,001
38 °C	<0,001	<0,001	<0,001
39 °C	<0,001	<0,001	<0,001
43 °C	0,0611	0,5487	0,0810

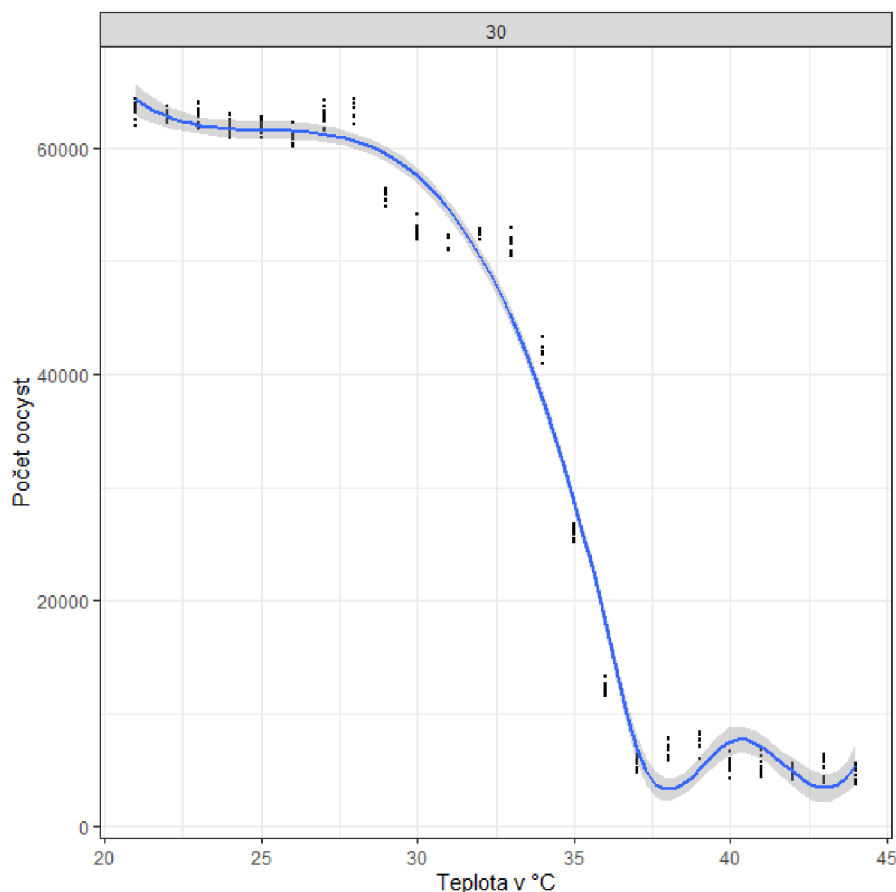
4.4 Vliv teploty na excystaci oocyst

Výsledky prováděných experimentů ukázaly, že u purifikovaných oocyst skladovaných v deionizované vodě při 4 °C nedochází k samovolné excystaci. Tyto oocysty byly použity jako kontrola před každým měřením. Při měření vlivu teploty na excystaci byly vzorky vystaveny teplotám v rozmezí 21–44 °C. Při teplotě 21 °C excystuje jen velmi malé procento oocyst (13 %; tabulka 3). K pozvolnému zvyšování počtu vyexcystovaných oocyst dochází od teploty 29 °C (graf 1) až do 37 °C, kterou jsme vyhodnotili jako optimální teplotu pro excystaci *Cryptosporidium muris* CAT21 (tabulka 3, graf 1).

Dále byly ze všech teplot vybrány dvojice a byla testována jejich závislost vůči provedení zásahu. Použili jsme dvouvýběrový t-test pro testování rovnosti dvou středních hodnot bez předpokladu shody rozptylu (tabulka 4). Testy byly provedeny mezi vybranými dvojicemi po sobě jdoucích teplot, při kterých docházelo k vyššímu počtu vyexcystovaných oocyst (35–44 °C). Jelikož jsme prováděli 9 testů zároveň, zredukovali jsme po vzoru Bonferroniho metody hladinu jednotlivých testů na

$\alpha=0,050/9=0,0056$, abychom zachovali celkovou hladinu 0,05. Testy ukázaly, že další zvyšování teploty nad 40 °C nemá na excystaci *C. muris* CAT21 výrazný vliv.

Graf 1 - Grafické vyjádření průběhu excystace oocyst *Cryptosporidium muris* CAT21 při teplotách 21–44 °C a expozici 30 minut. S ohledem na nelinearitu vztahu byl použitý neparametrický přístup prostřednictvím B-splínů (R 4.2.2.)



Tabulka 5 - Statistické testování vlivu mezi vybranými dvojicemi teplot na excystaci *C. muris* CAT21 pomocí dvouvýběrového t-testu pro testování rovnosti dvou středních hodnot bez předpokladu shody rozptylu ($\alpha = 0,0056$).

Teploty [°C]	t-test	p-value
35 vs 36	60,432	<0,0010
36 vs 37	28,730	<0,0010
37 vs 38	-3,832	0,0013
38 vs 39	-2,726	0,0139
39 vs 40	7,149	<0,0010
40 vs 41	0,007	0,9945
41 vs 42	2,173	0,0434
42 vs 43	-0,772	0,4501
43 vs 44	0,818	0,4241

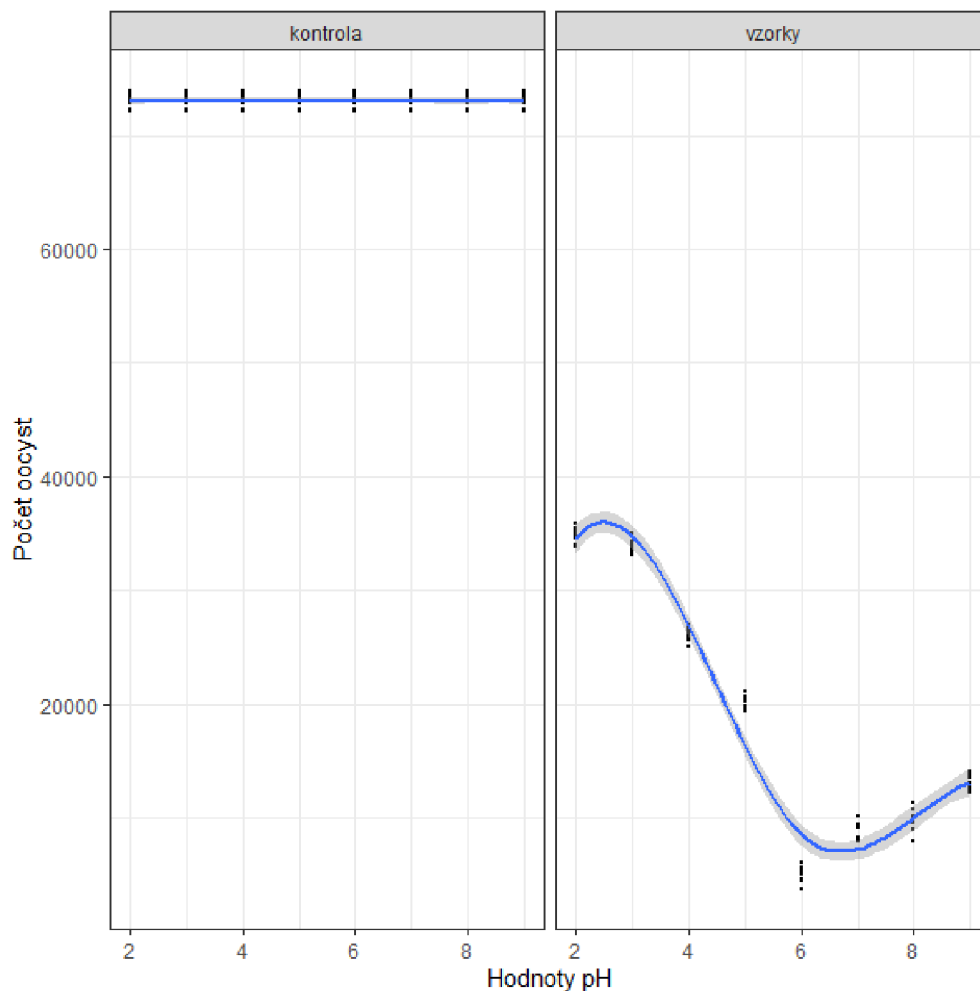
4.5 Vliv pH na excystaci oocyst

Z experimentu sledujícího vliv teploty na excystaci oocyst bylo prokázáno, že nejvíce oocyst (92 %) excystuje při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Proto při studiu vlivu pH na excystaci byly vzorky zahřívány ve vodní lázni v roztoku o pH v rozmezí 2–9 na 37 °C po dobu 30 minut (tabulka 6, graf 2). Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že při pH 2 excystuje zhruba polovina (50 %) oocyst *C. muris* CAT21. Zvyšováním pH postupně dochází ke zvyšování počtu excystovaných oocyst. Tento nárůst byl pozorován až do pH 6, kdy bylo pozorováno nejvíce excystovaných oocyst, a to 93 %. Podobně, jako u předcházejícího měření vlivu teploty, bylo provedeno testování rovnosti středních hodnot mezi po sobě následujícími hodnotami pH pomocí dvouvýběrového t-testu bez předpokladu shody rozptylů v kombinaci s Bonferroniho metodou. Zde provádíme 7 testů, hladina každého z nich byla nastavena na $\alpha=0,05/7=0,0071$. Ve všech případech dvouvýběrové t-testy ukazují nízké hodnoty p-value ($P < 0,0071$) (tabulka 7).

Tabulka 6 – Vliv pH prostředí na exystaci oocyst *Cryptosporidium muris* CAT 21 při teplotě 37 °C. Výsledky ukazují počet nevyexcystovaných oocyst. Jednotlivé kontroly pro různé hodnoty pH byly sjednoceny do jedné, která udává počet oocyst v určitém pH bez tepelného ošetření. Výsledná hodnota vyjadřuje průměrný počet oocyst z deseti na sobě nezávislých měření.

Teplotní a pH podmínky	Čas expozice (minuty)
	30
Kontrola pH / 4 °C	73052
pH 2 / 37 °C	34934
pH 3 / 37 °C	33988
pH 4 / 37 °C	26160
pH 5 / 37 °C	19925
pH 6 / 37 °C	4967
pH 7 / 37 °C	8827
pH 8 / 37 °C	9708
pH 9 / 37 °C	13173

Graf 2 - Grafické znázornění průběhu excystace oocyst *Cryptosporidium muris* CAT21 při vlivu různého pH (2–9). Kontrola znázorňuje vzorky při 4 °C v určitém pH bez tepelného ošetření. Vzorky vyjadřují změnu excystace při určitém pH po vystavení teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Kontrola je vyjádřena prostým lineárním modelem odhadnutý metodou nejmenších čtverců. S ohledem na nelinearitu vztahu naměřených vzorků byl použitý neparametrický přístup prostřednictvím B-splínů (R 4.2.2.)



Tabulka 7 - Statistické testování vlivu pH na excystaci oocyst *C. muris* CAT21 pomocí dvouvýběrového t-testu pro testování rovnosti dvou středních hodnot bez předpokladu shody rozptylu ($\alpha = 0,0071$).

pH	t-test	p-value
2 vs 3	3,408	0,0031
3 vs 4	31,592	<0,0010
4 vs 5	22,613	<0,0010
5 vs 6	49,988	<0,0010
6 vs 7	-12,150	<0,0010
7 vs 8	-2,314	0,0320
8 vs 9	-9,685	<0,0010

5 Diskuze

V rámci gastrointestinálních kryptosporidií rozlišujeme dvě hlavní skupiny – druhy infikující střevní epitel a druhy parazitující v žaludku (Pavlásek a Ryan, 2007). Pokud jsou oocysty ve vyhovujícím hostitelském prostředí, uvolní se z jedné oocysty čtyři infekční sporozoiti, kteří jsou schopni aktivně infikovat buňky hostitele. Proces excystace *in vitro* byla zkoumána různými metodami zejména u střevních druhů kryptosporidií (Robertson et al., 1993; Kato et al., 2001; Smith et al., 2005; Pecková et al., 2016). Pro excystaci střevních druhů je důležitá stimulace například kyselými složkami, pankreatickými enzymy nebo působením žlučových solí. Ovšem zdá se, že druhy infikující žaludek potřebují pouze zvýšenou teplotu (Gold et al., 2001; Widmer et al., 2007).

Widmer et al. (2007) ve své studii zkoumal vlivy působící na excystaci čtyř druhů kryptosporidií: *C. muris* RN66, *C. andersoni*, *C. parvum* a *C. hominis*. Bylo prokázáno, že hlavním faktorem pro vyvolání excystace žaludečních druhů (*C. muris*, *C. andersoni*) je inkubace při teplotě 37 °C. Ve studii byl použit izolát *C. muris* RN66 (Taylor et al., 1999) udržovaný v Nu/Nu myších, zakoupený od Waterborne Inc., New Orleans, Louisiana. Widmer prokázal, že zahřátí oocyst žaludečních kryptosporidií, je dostatečné k excystaci, ovšem nebyl zde zkoumán vliv jednotlivých teplot. V této práci byl naopak zkoumán počet excystovaných oocyst v průběhu teplotních změn při postupném zvyšování od 21 do 44 °C a teplota 37 °C byla vyhodnocena jako optimální.

V práci jsme použili izolát *C. muris* CAT21 z přirozeně infikované kočky domácí. Tělesná teplota kočky domácí (*Felis catus*), zdravého dospělého jedince, je udávána v rozmezí 36,7–38,9 °C (Levy et al., 2015). V této práci jsme stanovili, že optimální teplotou pro excystaci *C. muris* CAT21 je 37 °C, což je shodná teplota, jako udává Widmer et al. (2007). Při této teplotě excystovalo až 92 % oocyst. Dále byl zaznamenán velmi vysoký počet excystovaných oocyst i při teplotách 38 a 39 °C (89–91 % excystovaných oocyst). Je tedy zřejmé, že optimální teplota pro excystaci je tedy zároveň přirozenou tělesnou teplotou původního hostitele. Toto tvrzení je v souladu s předcházející bakalářskou prací, v rámci které bylo zjištěno, že optimální teplota pro excystaci žaludeční kryptosporidie *C. andersoni* (pocházející z přirozeně infikovaného skotu) je taktéž stejná, jako jeho fyziologická tělesná teplota, a to 40 °C (Dudáková, 2022). Taktéž Schulzová ve své práci zkoumala vlivy na excystaci žaludeční kryptosporidie hlodavců *C. proliferans*. Ve výsledcích uvádí, že optimální teplotou pro

excystaci je 38 °C a zvyšování teploty nad 40 °C už nemělo na excystaci významný vliv (Schulzová, 2022). Oba druhy kryptosporidií prošli zřejmě během evoluce adaptací na přirozenou tělesnou teplotu svých hostitelů, aby se při excystaci uvolňovalo co nejvíce infekčních sporozoitů, což je pro infekčnost kryptosporidie nejvýhodnější.

Schopnost kryptosporidií infikovat různé orgány gastrointestinálního traktu je příkladem adaptace patogenu na hostitelské prostředí vlivem evoluce. Jednou z přirozených bariér zažívacího traktu je nízké pH žaludku, které brání organismus před různými patogeny. Choroboplodné zárodky jsou v kyselém prostředí zničeny. Žaludek tímto vytváří velmi nehostinné prostředí, ve kterém přežívá jen malý počet patogenů (Moran, 2005). Z tohoto důvodu by pozornost měla být věnována žaludečním druhům (*C. muris*, *C. andersoni*), které mají schopnost přizpůsobit se nevlídnému prostředí žaludku. Ovšem větší množství studií se zabývá spíše problematikou střevních druhů z důvodu většího rozšíření mezi lidmi (Robertson et al., 1993; Pecková et al., 2016).

Melicherová et al. (2016) se ve své studii zaměřili na excystaci *C. proliferans*. Zkoumali vliv různých médií na rychlost excystace oocyst a současně sledovali vliv specifického média na motilitu sporozoitů. Oocysty nebyly předem ošetřeny, jako například při pokusech s *C. parvum* (Pecková et al., 2016) a inkubační teplota byla nastavena na 37 °C. Nejvíce vyexcystovaných oocyst (50 %) a současně i nejvyšší motilita sporozoitů byla sledována u média RPMI 1640 s 5% obsahem bovinního sérového albuminu. Excystace oocyst se také zvyšovala v čistém RPMI, ovšem vliv na motilitu sporozoitů byl zanedbatelný. Melicherová et al. (2016) použili RPMI médium o pH 6,9 – 7,2. Dále Melicherová et al. (2016) uvádí, že přidáním 0,6% HCl, čímž dojde ke snížení pH média, nedochází k výraznému zvyšování excystace a nízké pH prostředí žaludku má spíše negativní vliv na excystaci oocyst žaludečních druhů kryptosporidií. Výsledky této a předchozích prací ukazují stejný trend (Dudáková, 2022; Schulzová 2022). V této práci jsme zaznamenali zhruba polovinu excystovaných oocyst *C. muris* CAT21 při hodnotách pH 2 a 3 a maximální množství při hodnotách pH 6 – pH 7, což odpovídá výsledkům předešlým studiím *C. andersoni* a právě s *C. proliferans* (Dudáková, 2022; Schulzová 2022). Anderson (1991) při studiu přirozených infekcí skotu způsobených druhem *C. andersoni* poukázal na fakt, že u infikovaných zvířat byla pozorována změna na sliznici slezu a zvýšení pH žaludečního obsahu. K obdobným výsledkům dospěli i Kváč et al. (2016) a Marková (2022), kteří zkoumali pato-fyziologické změny v žaludku myši a mastomyši při infekci *C. proliferans*. Tyto výsledky naznačují, že kryptosporidie svou přítomností v žaludku hostitele

ovlivňují jeho fyziologické funkce a vyšší pH prostředí je pro žaludeční kryptosporidie zcela jistě výhodnější. Navíc úprava pH žaludku se běžně používá pro zvýšení šance na přežití sporozitů kryptosporidií v žaludku hostitele při experimentálních infekcích (Sateriale et al. 2021). Toto přežití souvisí právě s hodnotou pH, kdy při nízkých hodnotách dochází k vysoké aktivaci aktino-myozinového motoru a rychlému vyčerpání sporozoitů a jejich smrti (Křest'ánová 2024).

V rámci našeho experimentu byly používány oocysty s maximální dobou skladování 14 dnů, a to z důvodu nízké odolnosti oocyst na kterou u tohoto kmene poukázala Tinavská (2023). Například oocysty střevního druhu *C. parvum* si zachovávají infektivitu více než osm měsíců, jsou tedy extrémně odolné při skladování v chladných, temných a vlhkých podmínkách (Robertson et al., 1992). Toto souvisí i se schopností zachovat si celistvost stěny oocysty, která chrání infekční sporozoity. *Cryptosporidium andersoni*, *C. proliferans* a *C. muris* jsou všechny žaludeční druhy, odolnost jejich oocyst je značně odlišná od střevních druhů, respektive druhu *C. parvum*. Oocysty *C. andersoni* si zachovávají infektivitu po dobu 5–6 měsíců a postupně dochází k jejich degradaci, ovšem většina oocyst zůstává kompaktní (Kváč et al., 2007). Oocysty *C. proliferans* se jeví jako strukturně velmi stabilní a zůstávají infekční po dobu až 6 měsíců (Schulzová, 2022). Na základě výsledků předešlých studií *C. muris* CAT21 až 90 % oocyst ztrácí svou integritu již během 2 měsíců skladování (Tinavská, 2023). Při této práci se ukázalo, že optimální stáří oocyst pro měření excystace průtokovým cytometrem je 14 dnů, aby nedocházelo k negativnímu ovlivňování výsledků degradací stěn oocyst a uvolňováním sporozoitů.

Závěr

V práci byl prokázán vliv teploty a pH prostředí na excystaci žaludeční kryptosporidie *Cryptosporidium muris* CAT21. Optimální teplota pro excystaci je 37 °C. Vysoké teploty od 40 do 44 °C nemají vliv na počet excystovaných oocyst. Vliv na excystaci oocyst má i doba, po kterou jsou oocysty vystavené konkrétní teplotě. Vliv expozice je signifikantní při optimálních teplotách kolem 37 °C. S rostoucím pH prostředí dochází k nárůstu počtu excystovaných oocyst až do pH 6, které se zdá být optimální pro excystaci *C. muris* CAT21.

Seznam použité literatury

Abrahamsen, M. S., Templeton, T. J., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Zhu, G., Lancto, C. A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G. A., Xu, P., Bankier, A. T., Dear, P. H., Konfortov, B. A., Spriggs, H. F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L., Kapur, V. (2004). Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, 304(5669), 441–445.

Alvarez-Pellitero P., Sitja-Bobadilla A. (2002). *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1007–1021

Anderson, B. C. (1991). Experimental infection in mice of *Cryptosporidium muris* isolated from a camel. *The Journal of Protozoology*, 38(6), 16S–17S.

Anderson, B. C. (1998). Cryptosporidiosis in bovine and human health. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 3036–3041

Arrowood, M. J., Sterling, C. R. (1987). Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *Journal of Parasitology*, 73(2), 314–319.

Aydin, Y., Ozkul, I. A. (1996). Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Veterinary Parasitology*, 66(3–4), 257–262.

Baxby, D., Blundell, N., Hart, C. A. (1984). The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *Epidemiology & Infection*, 93(2), 317–323.

Bessoff, K., Spangenberg, T., Foderaro, J. E., Jumani, R. S., Ward, G. E., Huston, C. D. (2014). Identification of *Cryptosporidium parvum* active chemical series by repurposing the open access malaria box. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2731–2739.

Billand, S. J., Zahedi, A., Oskam, C., Murphy, B., Ryan, U. (2020). *Cryptosporidium bollandi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidii) from angelfish (*Pterophyllum scalare*) and oscar fish (*Astronotus ocellatus*). *Experimental Parasitology*, 217, 107956.

Bones, A. J., Jossé, L., More, C., Miller, C. N., Michaelis, M., Tsaousis, A. D. (2019). Past and future trends of *Cryptosporidium* in vitro research. *Experimental Parasitology*, 196, 28–37

Bonnin, A., Lapillonne, A., Petrella, T., Lopez, J., Chaponnier, C., Gabbiani, G., Robine, S., Dubremetz, J. F. (1999). Immunodetection of the microvillous cytoskeleton molecules villin and ezrin in the parasitophorous vacuole wall of *Cryptosporidium parvum* (protozoa: Apicomplexa). *European Journal of Cell Biology*, 78(11), 794–801.

Bornay-Llinares, F. J., da Silva, A. J., Moura, I. N. S., Myjak, P., Pietkiewicz, H., Kruminis-Łozowska, W., Graczyk, T. K., Pieniazek, N. J. (1999). Identification of *Cryptosporidium felis* in a Cow by Morphologic and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1455–1458.

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

Campbell, I., Tzipori, A., Hutchison, G., Angus, K. (1982). Effect of disinfectants on survival of cryptosporidium oocysts. *Veterinary Record*, 111(18), 414–415.

Chang, Y., Li, S., Wang, L., Wang, K., Li, J., Li, X., Jian, F., Wang, R., Zhang, S., Zhang, L. (2023). Micro-RNA expression profile of BALB/c mouse glandular stomach in the early phase of *Cryptosporidium muris* infection. *Experimental Parasitology*, 253, 108603.

Casemore, D. P., Sands, R. L., Curry, A. (1985). *Cryptosporidium* species a "new" human pathogen. *Journal of Clinical Pathology*, 38(12), 1321–1336.

Chichino, G., Bruno, A., Cevini, C., Atzori, C., Gatti, S., Scaglia, M. (1991). New rapid staining methods of *Cryptosporidium* oocysts in stools. *The Journal of Protozoology*, 38(6), 212S–214S.

Cruz-Saavedra, L., Arévalo, V. A., Garcia-Corredor, D., Jiménez, P. A., Vega, L., Pulido-Medellín, M., Ortiz-Pineda, M., Ramírez, J. D. (2023). Molecular detection and characterization of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Blastocystis* in captive wild animals rescued from central Colombia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 22, 1–5.

Cunha, F. S., Peralta, R. H. S., Peralta, J. M. (2019). New insights into the detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in Brazilian studies: a review. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 61.

Current, W. L., Reese, N. C. (1986). A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of Protozoology*, 33(1), 98–108.

Dąbrowska, J., Sroka, J., Cencek, T. (2023). Investigating *Cryptosporidium* spp. Using Genomic, Proteomic and Transcriptomic Techniques: Current Progress and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12867.

Dong, S., Yang, Y., Wang, Y., Yang, D., Yang, Y., Shi, Y., Li, C., Li, L., Chen, Y., Jiang, Q., Zhou, Y. (2020). Prevalence of *Cryptosporidium* Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Parasitologica*, 65(4), 882–889.

Dudáková, H. (2022). Faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií přežvýkavců. České Budějovice. Bakalářská práce. Fakulta zemědělská a technologická JČU. pp. 37.

Elliot, A., Morgan, U. M., RC, A. T. (1999). Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45(3), 139–142.

Fall, A., Thompson, R. C. A., Hobbs, R. P., Morgan-Ryan, U. (2003). Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *The Journal of Parasitology*, 89(2), 399–402

Fayer, R., Guidry, A., Blagburn, B. L. (1990). Immunotherapeutic efficacy of bovine colostral immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infection and Immunity*, 58(9), 2962–2965.

Fayer, R., Phillips, L., Anderson, B. C., Bush, M. (1991). Chronic cryptosporidiosis in a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22(2), 228–232.

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

Feng, Y., Yang, W., Ryan, U., Zhang, L., Kváč, M., Koudela, B., Modrý, D., Li, N., Fayer, R., Xiao, L. (2011). Development of a Multilocus Sequence Tool for Typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1), 34–41.

Feng, Y., Li, N., Roellig, D. M., Kelley, A., Liu, G., Amer, S., Tang, K., Zhang, L., Xiao, L. (2017). Comparative genomic analysis of the IId subtype family of *Cryptosporidium parvum*. *International Journal for Parasitology*, 47(5), 281–290.

FitzGerald, L., Bennett, M., Ng, J., Nicholls, P., James, F., Elliot, A., Slaven, M., Ryan, U. (2011). Morphological and molecular characterisation of a mixed *Cryptosporidium muris*/*Cryptosporidium felis* infection in a cat. *Veterinary Parasitology*, 175(1–2), 160–164.

Forney, J. R., Vaughan, D. K., Yang, S., Healey, M. C. (1998). Actin-dependent motility in *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *The Journal of Parasitology*, 84(5), 908–913.

Garcia-R, J. C., French, N., Pita, A., Velathanthiri, N., Shrestha, R., Hayman, D. (2017). Local and global genetic diversity of protozoan parasites: Spatial distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(7).

Gharpure, R., Perez, A., Miller, A. D., Wikswo, M. E., Silver, R., Hlavsa, M. C. (2019). Cryptosporidiosis Outbreaks — United States, 2009–2017. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *68*(25), 568–572.

Gold, D., Stein, B., Tzipori, S. (2001). The utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium parvum* and infection of tissue culture. *The Journal of Parasitology*, *87*(5), 997–1000.

Graczyk, Z., Chomicz, L., Kozłowska, M., Kazimierczuk, Z., Graczyk, T. K. (2011). Novel and promising compounds to treat *Cryptosporidium parvum* infections. *Parasitology Research*, *109*(3), 591–594.

Guérin, A., Striepen, B. (2020). The Biology of the Intestinal Intracellular Parasite *Cryptosporidium*. *Cell Host & Microbe*, *28*(4), 509–515.

Guo, Y., Cebelinski, E., Matusевич, C., Alderisio, K. A., Lebbad, M., McEvoy, J., Roellig, D. M., Yang, C., Feng, Y., Xiao, L. (2015). Subtyping Novel Zoonotic Pathogen *Cryptosporidium* Chipmunk Genotype I. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(5), 1648–1654.

Heiges, M. (2006). CryptoDB: a *Cryptosporidium* bioinformatics resource update. *Nucleic Acids Research*, *34*(90001), D419–D422.

Henriksen, S. A., Pohlenz, J. F. L. (1981). Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *22*(3-4), 594.

Hijjawi, N. S., Meloni, B. P., Ryan, U. M., Olson, M. E., Thompson, R. C. A. (2002). Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 32(14), 1719–1726.

Hikosaka, K., Nakai, Y. (2005). A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Parasitology Research*, 97(5), 373–379.

Holubová, N., Zikmundová, V., Limpouchová, Z., Sak, B., Konečný, R., Hlásková, L., Rajský, D., Kopacz, Z., McEvoy, J., Kváč, M., (2019). *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *European Journal of Protistology*, 69, 70–87.

Holubová, N., Tůmová, L., Sak, B., Hejzlarová, A., Konečný, R., McEvoy, J., Kváč, M. (2020). Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. *Parasites & Vectors*, 13(1), 340.

Hooda, P. S., Edwards, A. C., Anderson, H. A., Miller, A. (2000). A review of water quality concerns in livestock farming areas. *Science of The Total Environment*, 250(1–3), 143–167.

Hosea, D., Katsumata, T., Uga, S., Kohno, S., Ranuh, I. G., anagi, T. (2000). Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(1), 70–72.

Højlyng, N., Holten-Andersen, W., Jepsen, S. (1987). Cryptosporidiosis: A case of airborne transmission. *The Lancet*, 330(8553), 271–272.

Horčíčková, M., Čondlová, Š., Holubová, N., Sak, B., Květoňová, D., Hlásková, L., Konečný, R., Sedláček, F., Clark, M., Giddings, C., McEvoy, J., Kváč, M. (2019). Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology*, 146(2), 220–233.

Innes, E. A., Chalmers, R. M., Wells, B., Pawlowic, M. C. (2020). A one health approach to tackle cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology*, 36(3), 290–303.

Iseki, M., (1986). Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Japanese Journal of Parasitology*, 35(6), 521–526.

Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S., Takada, S. (1989). Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitology Research*, 75(3), 218–222.

Iseki, M. (1979). *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Japanese Journal of Parasitology*, 28, 285–307.

Jex, A. R., Smith, H. v, Monis, P. T., Campbell, B. E., Gasser, R. B. (2008). *Cryptosporidium*--biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, 26(4), 304–317.

Ježková, J., Prediger, J., Holubová, N., Sak, B., Konečný, R., Feng, Y., Xiao, L., Rost, M., McEvoy, J., Kváč, M. (2021). *Cryptosporidium rattii* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in the Czech Republic. *Parasitology*, 148(1), 84–97.

Jirků, M., Valigurová, A., Koudela, B., Křížek, J., Modrý, D. Šlapeta, J. (2008). New species of *Cryptosporidium tyzzer*, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*, 55(2), 81–94.

Kato, S., Jenkins, M. B., Ghiorse, W. C., Bowman, D. D. (2001). Chemical and physical factors affecting the excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *The Journal of Parasitology*, 87(3), 575–581

Kar, S., Gawlowska, S., Dauschies, A., Bangoura, B. (2011). Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Veterinary Parasitology*, 177(3–4), 366–370.

Khurana, S., Chaudhary, P. (2018). Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Tropical Parasitology*, 8(1), 2

Koch, K. L., Phillips, D. J., Aber, R. C., Current, W. L. (1985). Cryptosporidiosis in hospital personnel: evidence for person-to-person transmission. *Annals of Internal Medicine*, 102(5), 593–596.

Kodádková, A., Kváč, M., Ditrich, O., Sak, B., Xiao, L. (2010). *Cryptosporidium muris* in a Reticulated Giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). *Journal of Parasitology*, 96(1), 211–212.

Kotloff, K. L., Nasrin, D., Blackwelder, W. C., Wu, Y., Farag, T., Panchalingham, S., Sow, S. O., Sur, D., Zaidi, A. K. M., Faruque, A. S. G., Saha, D., Alonso, P. L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ahmed, S., ... Levine, M. M. (2019). The incidence, aetiology, and adverse clinical consequences of less severe diarrhoeal episodes among infants and children residing in low-income and middle-income countries: a 12-month case-control study as a follow-on to the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). *The Lancet Global Health*, 7(5), e568–e584.

Koudela, B., Modrý, D., Vítovec, J. (1998). Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. *Veterinary Parasitology*, 76(3), 181–188.

Křesťanová, M., Motilita sporozoitů kryptosporidií, České Budějovice. Teze. Fakulta zemědělská a technologická JČU. pp. 59 s.

Kváč, M., Vítovec, J. (2003). Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one Herd of Beef Cattle. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(9), 451–457.

Kváč, M. (2008). Žaludeční kryptosporidie a kryptosporidóza savců. České Budějovice. Habilitační práce. Zemědělská fakulta JČU. pp. 111.

Kváč, M., Sak, B., Květoňová, D., Ditrich, O., Hofmanová, L., Modrý, D., Vítovec, J., Xiao L. (2008). Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Veterinary Parasitology*, 153(3–4), 363–367.

Kváč, M., Hanzlíková, D., Sak, B. a Květoňová, D. (2009). Prevalence and age related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 160(3–4), 319–322.

Kváč, M., Kestřánová, M., Květoňová, D., Kotková, M., Ortega, Y., McEvoy, J., Sak, B. (2012). *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Experimental Parasitology*, 131(1), 107–110.

Kváč, M., Kestřánová, M., Pinková, M., Květoňová, D., Kalinová, J., Wagnerová, P., Kotková, M., Vítovec, J., Ditrich, O., McEvoy, J., Stenger, B., Sak, B. (2013). *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology*, 191(3–4), 218–227.

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

Kváč, M., Hofmannová, L., Ortega, Y., Holubová, N., Hořčíčková, M., Kicia, M., Hlásková, L., Květoňová, D., Sak, B., McEvoy, J. (2017). Stray cats are more frequently infected with zoonotic protists than pet cats. *Folia Parasitologica*, 64.

Levine, N. D. (1980). Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *The Journal of Parasitology*, 66(5), 830–834.

Li, J., Ryan, U., Guo, Y., Feng, Y., Xiao, L. (2021). Advances in molecular epidemiology of cryptosporidiosis in dogs and cats. *International Journal for Parasitology*, 51(10), 787–795.

Lindsay, D. S., Upton, S. J., Owens, D. S., Morgan, U. M., Mead, J. R., Blagburn, B. L. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(1), 91–95.

Lindsay, D. S., Woods, K. M., Upton, S. J., Blagburn, B. L. (2000). Activity of decoquinolate against *Cryptosporidium parvum* in cell cultures and neonatal mice. *Veterinary Parasitology*, 89(4), 307–311.

Liu, J., Platts-Mills, J. A., Juma, J., Kabir, F., Nkeze, J., Okoi, C., Operario, D. J., Uddin, J., Ahmed, S., Alonso, P. L., Antonio, M., Becker, S. M., Blackwelder, W. C., Breiman, R. F., Faruque, A. S. G., Fields, B., Gratz, J., Haque, R., Hossain, A., ... Houpt, E. R. (2016). Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. *The Lancet*, 388(10051), 1291–1301.

Liu, S., Roellig, D. M., Guo, Y., Li, N., Frace, M. A., Tang, K., Zhang, L., Feng, Y., Xiao, L. (2016). Evolution of mitosome metabolism and invasion-related proteins in *Cryptosporidium*. *BMC Genomics*, 17(1), 1006.

Love, M. S., Beasley, F. C., Jumani, R. S., Wright, T. M., Chatterjee, A. K., Huston, C. D., Schultz, P. G., McNamara, C. W. (2017). A high-throughput phenotypic screen identifies clofazimine as a potential treatment for cryptosporidiosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), e0005373.

Lucio-Forster, A., Griffiths, J. K., Cama, V. A., Xiao, L., Bowman, D. D. (2010). Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends in Parasitology*, 26(4), 174–179.

Ma, P., Soave, R. (1983). Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*, 147(5), 824–828.

Mac Kenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., Davis, J. P. (1994). A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted through the Public Water Supply. *New England Journal of Medicine*, 331(3), 161–167.

Manjunatha, U. H., Vinayak, S., Zambriski, J. A., Chao, A. T., Sy, T., Noble, C. G., Bonamy, G. M. C., Kondreddi, R. R., Zou, B., Gedeck, P., Brooks, C. F., Herbert, G. T., Sateriale, A., Tandel, J., Noh, S., Lakshminarayana, S. B., Lim, S. H., Goodman, L. B., Bodenreider, C., ... Diagana, T. T. (2017). A *Cryptosporidium* PI(4)K inhibitor is a drug candidate for cryptosporidiosis. *Nature*, 546(7658), 376–380.

Mauzy, M. J., Enomoto, S., Lancto, C. A., Abrahamsen, M. S., Rutherford, M. S. (2012). The *Cryptosporidium parvum* transcriptome during in vitro development. *PLoS ONE*, 7(3), e31715.

McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Couturier, M. R., Humphries, R. M. (2014). Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(3), 712–720.

Meisel, J. L., Perera, D. R., Meligro, C., Rubin, C. E. (1976). Overwhelming Watery Diarrhea Associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70(6), 1156–1160.

Melicherová, J., Ilgová, J., Kváč, M., Sak, B., Koudela, B., Valigurová, A. (2014). Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology*, 141(2), 287–303.

Ming, Z., Zhou, R., Chen, X. M. (2017). Regulation of host epithelial responses to *Cryptosporidium* infection by microRNAs. *Parasite Immunology*, 39(2), e12408.

Mirzaghavami, M., Sadraei, J., Pirestani, M., Bahadory, S. (2023). The role of some free-ranging animals in the transmission of multi-host species of *Cryptosporidium* spp. *Iranian Journal of Parasitology*.

Moran, J. (2005). Tropical dairy farming: feeding management for small holder dairy farmers in the humid tropics. Australia: Landlinks Press. ISBN: 978-0-643-09313-3

Morgan, U. M., Xiao, L., Fayer, R., Graczyk, T. K., Lal, A. A., Deplazes, P., Thompson, R. C. A. (1999). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* from captive reptiles using 18S rDNA sequence data and random amplified polymorphic DNA analysis. *The Journal of Parasitology*, 85(3), 525.

Mosier, D. A. (2004). *Cryptosporidium*. In *Encyclopedia of Gastroenterology* (pp. 527–529). Elsevier.

Nader, J. L., Mathers, T. C., Ward, B. J., Pachebat, J. A., Swain, M. T., Robinson, G., Chalmers, R. M., Hunter, P. R., van Oosterhout, C., Tyler, K. M. (2019). Evolutionary genomics of anthroponosis in *Cryptosporidium*. *Nature Microbiology*, 4(5), 826–836.

Neto, R. C., dos Santos, L. U., Sato, M. I. Z., Franco, R. M. B. (2010). *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, southeast Brazil. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 62(1), 217–222.

Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A., Yardley, J. H. (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70(4), 592–598.

O’Leary, J. K., Sleator, R. D., Lucey, B. (2021). *Cryptosporidium* spp. diagnosis and research in the 21st century. *Food and Waterborne Parasitology*, 24, e00131.

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

Paperna, I., Vilenkin, M. (1996). Cryptosporidiosis in the gourami *Trichogaster leeri*: description of a new species and a proposal for a new genus, *Piscicryptosporidium*, for species infecting fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27, 95–101

Pavlásek, I. (1994). [Localization of endogenous developmental stages of *Cryptosporidium meleagridis* Slavin, 1955 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds]. *Veterinarni Medicina*, 39(12), 733–742.

Pavlásek, I. (1999). Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Remedia Clinical Microbiology*, 3, 290–301.

Pavlásek, I., Ryan, U. (2007). The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Veterinary Parasitology*, 144(3–4), 349–352.

Pecková, R., Stuart, P. D., Sak, B., Květoňová, D., Kváč, M., Foitová, I. (2016). Statistical comparison of excystation methods in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Veterinary Parasitology*, 230, 1–5.

Petry, F. (2004). Structural Analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microscopy and Microanalysis*, 10(5), 586–601.

Peralta, R. H. S., Velásquez, J. N., Cunha, F. de S., Pantano, M. L., Sodr , F. C., Silva, S. da, Astudillo, O. G., Peralta, J. M., Carnevale, S. (2016). Genetic diversity of *Cryptosporidium* identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(1), 30–36.

Pereira, S. J., Ramirez, N. E., Xiao, L., Ward, L. A. (2002). Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(5), 715–718.

Pohjola, S. (1984). Negative staining method with nigrosin for the detection of cryptosporidial oocysts: a comparative study. *Research in Veterinary Science*, 36(2), 217–219.

O'Donoghue, P. J. (1995). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, 25(2), 139–195.

Qi, M., Huang, L., Wang, R., Xiao, L., Xu, L., Li, J., Zhang, L. (2014). Natural infection of *Cryptosporidium muris* in ostriches (*Struthio camelus*). *Veterinary Parasitology*, 205(3–4), 518–522.

Quiroz, E. S., Bern, C., MacArthur, J. R., Xiao, L., Fletcher, M., Arrowood, M. J., ... Lal, A. (2000). An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(2), 695–700.

Ramirez, N. E., Sreevatsan, S. (2006). Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Veterinary Parasitology*, 136(3–4), 201–213.

Rasmussen, K. R., Larsen, N. C., Healey, M. C. (1993). Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. *Infection and Immunity*, 61(4), 1482–1485.

Ren, X., Zhao, J., Zhang, L., Ning, C., Jian, F., Wang, R., Lv, C., Wang, Q., Arrowood, M. J., Xiao, L. (2012). *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, 130(3), 274–281.

Reese, N. C., Current, W. L., Ernst, J. V., Bailey, W. S. (1982). Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31(2), 226–229.

Relat, R. M. B., O'Connor, R. M. (2020). *Cryptosporidium*: host and parasite transcriptome in infection. *Current Opinion in Microbiology*, 58, 138–145.

Rhee, J. K., Seu, Y. S., Park, B. K. (1991). Isolation and identification of *Cryptosporidium* from various animals in Korea. II. Identification of *Cryptosporidium muris* from mice. *The Korean Journal of Parasitology*, 29(2), 149–159.

Rhee, J. K., Kim, H. C., Eun, G. S. (1998). Infection kinetics and developmental biology of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in Korean native kids and corriedale lambs. *The Korean Journal of Parasitology*, 36(3), 171–181.

Rhee, J. K., So, W. S., Kim, H. C. (1999). Age-dependent resistance to *Cryptosporidium muris* (strain MCR) infection in golden hamsters and mice. *The Korean Journal of Parasitology*, 37(1), 33–37.

Rhee, J. K., Yook, S. Y., Park, B. K. (1995). Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in mice. *The Korean Journal of Parasitology*, 33(4), 377.

Robertson, L. J., Campbell, A. T., Smith, H. V. (1992). Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11), 3494–3500.

Robertson, L. J., Campbell, A. T., Smith, H. v. (1993). *In vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, 106(1), 13–19.

Rolando, R. F. R., Silva, S. da, Peralta, R. H. S., Silva, A. J. da, Cunha, F. de S., Bello, A. R., Peralta, J. M. (2012). Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4), 476–479.

Ryan, U. M., Xiao, L., Read, C., Suliman, I. M., Monis, P., Lal, A. A., Fayer, R., Pavlásek, I. (2003). A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *The Journal of Parasitology*, 89(4), 809–813.

Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L. (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, 141(13), 1667–1685.

Ryan, U. M., Papparini, A., Tong, K., Yang, R., Gibson-Kueh, S., O'hara, A., Lymbery, A. Xiao, L. (2015). *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*, *150*, 31–35.

Ryan, U., Zahedi, A., Feng, Y., Xiao, L. (2021). An update on zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes in humans. *Animals*, *11*(11), 3307.

Samuelson, J., Bushkin, G. G., Chatterjee, A., Robbins, P. W. (2013). Strategies to discover the structural components of cyst and oocyst walls. *Eukaryotic Cell*, *12*(12), 1578–1587.

Santín, M., Trout, J. M., Vecino, J. A. C., Dubey, J. P., Fayer, R. (2006). *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Veterinary Parasitology*, *141*(3–4), 334–339.

Sargent, K. D., Morgan, U. M., Elliot, A., Thompson, R. C. (1998). Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. *Veterinary Parasitology*, *77*(4), 221–227.

Sateriale, A., Gullicksrud, J. A., Engiles, J. B., McLeod, B. I., Kugler, E. M., Henao-Mejia, J., Zhou, T., Ring, A. M., Brodsky, I. E., Hunter, C. A., & Striepen, B. (2021). The intestinal parasite *Cryptosporidium* is controlled by an enterocyte intrinsic inflammasome that depends on NLRP6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(2).

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. v., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L., Griffin, P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(1), 7–15.

Siddiki, A. M. A. M. Z., Wastling, J. M. (2009). Charting the proteome of *Cryptosporidium parvum* sporozoites using sequence similarity-based BLAST searching. *Journal of Veterinary Science*, *10*(3),

Scorza, V., Tangtrongsup, S. (2010). Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp. infections in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(3), 163–169.

Schulzová, T. (2022). Faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií hlo-
davců. České Budějovice. Diplomová práce. Fakulta zemědělská a technologická JČU.
pp. 43.

da Silveira-Neto, L., Inácio, S., Oliveira, L. N., Bresciani, K. (2015). Is cryptosporidi-
osis an underestimated disease in cats? *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(1), 1–6.

Smith, H. V., Nichols, R. A., Grimason, A. M. (2005). *Cryptosporidium* excystation
and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, 21(3), 133–142.

Snelling, W. J., Lin, Q., Moore, J. E., Millar, B. C., Tosini, F., Pozio, E., Dooley, J. S.
G., Lowery, C. J. (2007). Proteomics analysis and protein expression during sporozoite
excystation of *Cryptosporidium parvum* (Coccidia, Apicomplexa). *Molecular &
Cellular Proteomics*, 6(2), 346–355.

Strong, W. B., Gut, J., Nelson, R. G. (2000). Cloning and sequence analysis of a highly
polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein
and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen Pproducts. *In-
fection and Immunity*, 68(7), 4117–4134.

Tandel, J., English, E. D., Sateriale, A., Gullicksrud, J. A., Beiting, D. P., Sullivan, M.
C., Pinkston, B., Striepen, B. (2019). Life cycle progression and sexual development
of the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*. *Nature Microbiology*, 4(12),
2226–2236.

Tinavská, J. (2023). Vnitrodruhová variabilita *Cryptosporidium muris*. České Budějo-
vice. Diplomová práce. Fakulta zemědělská a technologická JČU. pp. 43.

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

Tyzzer, E. E. (1910). An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of Medical Research*, 23(3), 487–510.

Tyzzer, E.E. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a Coccidium. *Archiv für Protistenkunde*, 26, 394.

Tyzzer, E. E. (1929). Coccidiosis in gallinaceous birds. *Am. J. Hyg.* 10:269-383.

Tzipori, S. (1983). Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiological Reviews*, 47(1), 84–96.

Valigurová, A., Jirků, M., Koudela, B., Gelnar, M., Modrý, D., Šlapeta, J. (2008). Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *International Journal for Parasitology*, 38(8–9), 913–922.

Verweij, J. J., Blangé, R. A., Templeton, K., Schinkel, J., Brienen, E. A. T., van Rooijen, M. A. A., van Lieshout, L., Polderman, A. M. (2004). Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1220–1223.

Vinayak, S., Pawlowic, M. C., Sateriale, A., Brooks, C. F., Studstill, C. J., Bar-Peled, Y., Cipriano, M. J., Striepen, B. (2015). Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Nature*, 523(7561), 477–480.

Volf, P., Horák P., 2007. Paraziti: a jejich biologie. Praha/Kroměříž: TRITON.

Wang, L., Cao, L., Zheng, S., Chang, Y., Zhang, K., Zhang, S., Zhang, L. (2021). Molecular identification and biological characterization of *Cryptosporidium muris* from camels (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasites & Vectors*, 14(1), 365.

Widmer, G., Klein, P., Bonilla, R. (2007). Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology*, *134*(11), 1583–1588.

Widmer, G., Sullivan, S. (2012). Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunology*, *34*(2–3), 61–71.

Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A. A., Montali, R. J., Fayer, R., Lal, A. A. (1999). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(4), 1578–1583.

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*(14), 1773–1785.

Xiao, L., Ryan, U. M. (2004). Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *17*(5), 483–490.

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

Yuda, M., Iwanaga, S., Shigenobu, S., Kato, T., Kaneko, I. (2010). Transcription factor AP2-Sp and its target genes in malarial sporozoites. *Molecular Microbiology*, *75*(4),

Zhang, K., Fu, Y., Li, J., Zhang, L. (2022). Public health and ecological significance of rodents in *Cryptosporidium* infections. *One Health*, *14*, 100364.

Zhao, W., Zhou, H., Huang, Y., Xu, L., Rao, L., Wang, S., Wang, W., Yi, Y., Zhou, X., Wu, Y., Ma, T., Wang, G., Hu, X., Peng, R., Yin, F., Lu, G. (2019). *Cryptosporidium* spp. in wild rats (*Rattus* spp.) from the Hainan Province, China: Molecular detection, species/genotype identification and implications for public health. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *9*, 317–321.

Zhou, R., Gong, A. Y., Eischeid, A. N., Chen, X. M. (2012). miR-27b targets KSRP to coordinate TLR4-mediated epithelial defense against *Cryptosporidium parvum* infection. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002702.

Zhou, R., Gong, A. Y., Chen, D., Miller, R. E., Eischeid, A. N., Chen, X. M. (2013). Histone deacetylases and NF- κ B signaling coordinate expression of CX3CL1 in epithelial cells in response to microbial challenge by suppressing miR-424 and miR-503. *PLoS One*, 8(5), e65153.

