

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

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Agropodnikání

Katedra: Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Vedoucí katedry: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Diverzita, fylogenetika a biologie různých izolátů

*Cryptosporidium muris*

Autor: Nikola Havrdová

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

**České Budějovice, duben 2014**

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

V Českých Budějovicích dne 11. 4. 2014

.....  
Nikola Havrdová

Touto cestou bych ráda poděkovala především mému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost. Dále pak všem pracovníkům laboratoře Veterinární a humánní protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za ochotu, přátelské jednání a cenné rady.

Tato práce byla finančně podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LH11061).

## ABSTRACT

Byly popsány morfologické, biologické a molekulární charakteristiky dvou různých izolátů *Cryptosporidium muris*, HZ206 a TS03. Oocysty *C. muris* TS03 o velikosti  $7,77 \pm 0,23 \times 5,2 \pm 0,08 \mu\text{m}$  s indexem tvaru  $1,48 \pm 0,02$  ( $n = 100$ ) byly morfometricky delší a širší než *C. muris* HZ206 o velikosti oocyst  $7,62 \pm 0,40 \times 6,63 \pm 0,09 \mu\text{m}$ ,  $1,32 \pm 0,02$  ( $n = 100$ ), ( $p = 0,034$ ). Oocysty obou izolátů *C. muris* TS03 a HZ206 získaných z přirozeně infikovaného hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) a myši domácí (*Mus musculus musculus*) byly infekční pro naivní 8-týdenní krysy malé (*Mastomys coucha*). Zatímco prepatentní doba *C. muris* TS03 se pohybovala v rozmezí 19 – 21 dní po infekci (DPI) a zvířata vylučovala oocysty až do konce experimentu (120 DPI), zvířata infikovaná HZ206 začala vylučovat oocysty 13 – 15 DPI s patentní periodou 63 – 112 DPI. Kumulovaná hodnota intenzity infekce (AUC) u zvířat infikovaných TS03 se pohybovala od 250.000.000 do 800.000.000 oocyst za patentní periodu (OPP) a u HZ206 v rozmezí 11.000.000 – 35.000.000 OPP. Histologické vyšetření prokázalo masivní infekce kryptosporidií ve žlázovém epitelu žaludku. Histopatologické změny měly nezánettlivý charakter včetně výrazné dilatace infikovaných částí žláz s atrofií a metaplazií žlázových epiteliálních buněk. Infekce TS03 ovlivnila velikost žaludku. Zatímco fyziologická hmotnost žaludku u naivních a HZ206-infikovaných krys malých ve věku 12 týdnů byla v rozmezí  $0,61 \pm 0,06$  g, respektive  $0,70 \pm 0,17$  g, abnormální zvětšení žaludku bylo pozorováno u zvířat infikovaných izolátem TS03 ( $3,23 \pm 0,51$  g). Nebyl pozorován žádný vliv na příjem krmiva u testovaných skupin. Fylogenetickou analýzou genů kódujících malou podjednotku rDNA, aktin, MS1, MS2, MS3 a MS16 bylo zjištěno, že *C. muris* TS03 je geneticky odlišné od ostatních *C. muris* izolátů. Závěrem lze říci, že morfologické, genetické a biologické vlastnosti podporují popsání *Cryptosporidium muris* TS03 jako nový samostatný druh.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** *Cryptosporidium muris*; infekce; patogenita; fylogeneze; morfologie oocyst

## SUMMARY

The morphological, biological, and molecular characteristics of various isolates of *Cryptosporidium muris*, predominantly HZ206 and TS03 were described. Oocysts of *C. muris* TS03 measuring  $7.77 \pm 0.23 \times 5.20 \pm 0.08 \mu\text{m}$  with a length to width ratio of  $1.48 \pm 0.02$  (n = 100) were morphometrically larger than *C. muris* HZ206 oocysts measuring  $7.62 \pm 0.40 \times 6.63 \pm 0.09 \mu\text{m}$ ;  $1.32 \pm 0.02$  (n = 100) ( $p=0.034$ ). Oocysts of both *C. muris* TS03 and HZ206 isolates obtained from naturally infected *Tachyoryctes splendens* and *Mus musculus musculus*, respectively, were infectious for naïve 8-week-old *Mastomys coucha*. While the prepatent period of *C. muris* TS03 was 19 – 21 days post infection (DPI) and the animals did not lost infection within 120 DPI, animals infected with HZ206 start to shed oocysts 13 – 15 DPI with patent period 63 – 112 DPI. The accumulated value of infection intensity (AUC) in TS03 infected animals ranged from 250,000,000 to 800,000,000 oocysts per patent period (OPP) and HZ206 from 11,000,000 to 35,000,000 OPP. Histologically, a massive infection of cryptosporidia was detected in the glandular epithelium of stomach. Histopathological changes had a non-inflammatory character and included distinctive dilatation of infected parts of the glands with atrophy and metaplasia of the glandular epithelial cells. Infection with TS03 influenced the size of the stomach. While physiological weight of stomach of naïve 12-week old mastomys and those infected with HZ206 were  $0.61 \pm 0.06 \text{ g}$  and  $0.70 \pm 0.17 \text{ g}$ , respectively, abnormal enlargement of stomach was observed in animals infected with TS03 ( $3.23 \pm 0.51 \text{ g}$ ). There was no effect on feed intake among tested groups. Phylogenetic analyses based on small subunit rDNA, actin, MS1, MS2, MS3 and MS16 gene sequences revealed that *C. muris* TS03 is genetically distinct from other *C. muris* isolates. In conclusion, morphological, genetic, and biological data support the establishment of *Cryptosporidium muris* TS03 as a new species.

**KEY WORDS:** *Cryptosporidium muris*; infection; pathogenicity; phylogeny; oocysts morphology

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>9</b>
2.1. HISTORIE .....	9
2.2. TAXONOMIE .....	10
2.3. VÝVOJOVÝ CYKLUS .....	10
2.4. PŘENOS A PRŮBĚH INFEKCE.....	12
2.5. HOSTITELSKÁ SPECIFITA .....	13
2.6. KLINICKÉ PROJEVY A IMUNITNÍ ODPOVĚĎ HOSTITELE PŘI KRYPTOSPORIDIÓZE.....	15
2.7. TERAPIE A PREVENCE .....	18
2.8. ŽALUDEČNÍ KRYPTOSPORIDIE HLODAVCŮ .....	19
2.8.1. <i>Cryptosporidium muris</i> Tyzzer, 1907 .....	20
2.8.2. <i>Cryptosporidium andersoni</i> Lindsay et al., 2000.....	22
<b>3. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>24</b>
<b>4. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>25</b>
4.1. MATERIÁL.....	25
PARAZITI.....	25
EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA .....	25
4.2. METODIKA .....	25
4.2.1. POUŽITÉ METODY.....	25
4.2.1.1. BARVENÍ OOCYST KRYPTOSPORIDIÍ ANILIN-KARBOL-METHYL VIOLETÍ (Miláček a Vítovec 1985).....	25
4.2.1.2. MIKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ .....	26
4.2.1.3. HODNOCENÍ INTENZITY INFEKCE .....	26
4.2.1.4. PURIFIKACE OOCYST .....	26
4.2.1.4.1. SACHARÓZOVÝ GRADIENT (Arrowood a Sterling 1987) .....	26
4.2.1.4.2. CESIUM CHLORIDOVÝ GRADIENT .....	27
4.2.1.5. IZOLACE DNA .....	28
4.2.1.6. MORFOMETRIE OOCYST .....	29
4.2.1.7. HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ .....	29
4.2.1.7.1. BARVENÍ HEMATOXYLIN-EOSIN .....	31
4.2.1.7.2. BARVENÍ DLE WOLBACHA .....	31
4.2.1.7.3. BARVENÍ PAS.....	31
4.3. GENOTYPIZACE.....	32
4.4. GELOVÁ ELEKTROFORÉZA.....	35

4.5. IZOLACE Z GELU .....	36
4.6. SEKVENACE A FYLOGENETICKÁ ANALÝZA .....	36
4.7. DESIGN EXPERIMENTŮ .....	36
4.7.1. HODNOCENÍ PRŮBĚHU INFEKCE A INTENZITY INFEKCE .....	37
4.7.2. HODNOCENÍ PATOGENITY .....	37
4.7.3. HODNOCENÍ VLIVU INFEKCE NA PŘÍJEM POTRAVY.....	37
4.8. STATISTICKÁ ANALÝZA.....	37
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>39</b>
5.1. MOFOLOGIE A MORFOMETRIE OOCYST .....	39
5.2. PRŮBĚH INFEKCE.....	40
5.3. FYLOGENETICKÁ ANALÝZA.....	40
5.4. HISTOPATOLOGICKÉ ZMĚNY NA SLIZNICI.....	46
5.5. KONVERZE KRMIVA A HMOTNOST ŽALUDKU .....	51
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>53</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>57</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>58</b>

## 1. ÚVOD

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou celosvětově rozšíření jednobuněční intracelulární paraziti infikující gastrointestinální trakt (GIT) ryb, plazů, ptáků a savců včetně člověka a hospodářských či domácích zvířat (O'Donoghue 1995). U imunokompetentních jedinců způsobují tyto prvoci vodnatý průjem, ale u pacientů se sníženou imunitou mohou způsobovat dehydratující chronické průjmy s fatálními následky (Guk et al. 2004; Sunnotel et al. 2006). Infekční stádia, oocysty, jsou velmi odolná nepříznivým podmínkám prostředí a přežívají velmi dlouhou dobu. Ve vhodných podmínkách (vlhká půda, povrchová voda) si mohou zachovat svou infekčnost až šest měsíců (Fayer et al. 1998).

V rámci rodu *Cryptosporidium* rozlišujeme dvě fylogenetické větve kryptosporidií. Druhy a genotypy infikující střevo nebo žaludek (Xiao et al. 2004a). Zatímco biologie včetně patogenity a hostitelské specifity střevních kryptosporidií je poměrně dobře probádána, žaludeční druhy a genotypy stojí na okraji zájmu. Jedním z důvodů je relativně nízká infekčnost pro člověka a obecně přijímaný fakt o velmi nízké patogenitě pro hostitele (Anderson 1998; Esteban et Anderson 1995; Kváč et al. 2008a).

Pouze v ojedinělých případech byl v souvislosti s žaludeční kryptosporidiózou popsán pokles mléčné produkce dojníc nebo ztráty tělesné kondice až do stádia anorexie s následným úhynem zvířat (Anderson 1998; Esteban et Anderson 1995; Pospischil et al. 1987). Dále byl u skotu zaznamenán pokles přírůstku oproti kontrole až o 0,5 kg, pokles laktace o 13 %, vyšší pH v abomasu (4,5 – 5,0) a trojnásobné zvýšení hmotnosti infikované části slezu (Anderson 1998).

Recentní údaje ukazují, že žaludeční kryptosporidie savců představují pravděpodobně kryptické skupiny samostatných druhů s odlišnou hostitelskou specifitou a patogenitou (Feng et al. 2011; Kváč et al. 2008b; Melicherová et al. 2014).



## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. HISTORIE

Rod *Cryptosporidium* byl popsán již na začátku 20. století, celosvětového významu se mu dostalo až v osmdesátých letech spolu s popisem prvních lidských infekcí, pandemií AIDS a zvyšujícím se výskytem kontaminací vody a potravin vedoucí k vzniku rozsáhlých epidemií (Casemore et al. 1985).

V roce 1907 popsal Ernest Edvard Tyzzer jako první životní cyklus prvoka, kterého našel ve sliznici žaludku laboratorních myši a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). Stejný autor popsal v roce 1912 další druh kryptosporidie s vývojovým cyklem v tenkém střevě myši *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). Třetím druhem v pořadí bylo *C. meleagridis* popsané v roce 1955 u krůt (Slavin 1955). Poději, byly popsány další druhy kryptosporidií hadů, ještěrek, želv (Graczyk 2008), obojživelníků (Arcay et Bruzal 1993; Crawshaw et Mehren 1987; Green et al. 2003; Jirků et al. 2008; Wright et Whitaker 2001), ptáků (Ryan et Xiao 2008) a ryb (Alvarez-Pellitero et al. 2004).

Kryptosporidie nebyly v první polovině 20. století považovány za lékařsky či veterinárně významné a nebyl proto prováděn žádný intenzivní výzkum (Wetzel 1938). Zájem o tyto parazity dramaticky vzrostl po prvních prokazatelných kryptosporidiových infekcích lidí (Lasser et al. 1979; Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976; Weisburger et al. 1979) a zejména masivní epidemie způsobené kontaminací vodního zdroje v Milwaukee (Wisconsin, USA), kdy bylo postiženo více než 400 000 osob (MacKenzie et al. 1994; Peng et al. 1997). Tyto události podměnily studium biologie rodu *Cryptosporidium*, zejména s důrazem na detekci různých vývojových stádií kryptosporidií v prostředí a u nejrůznějších hostitelů, prevenci a léčbu onemocnění. V roce 1985 popsali Upton a Current první případy abomasální kryptosporidiózy skotu a oddělili od sebe druhy *C. parvum* a *C. muris* (Upton et Current 1985), které byly rok předtím Levinem mylně sjednoceny v jeden druh (Levine 1984).

První zaznamenaná humánní nákaza *C. muris* se projevila u dvou děvčat v Indonésii (Katsumata et al. 2000). Od této doby bylo zaznamenáno více infekcí ve Francii (Guyot et al. 2001), Thajsku (Tiangtip et Jongwutiwes 2002), Keni (Gatei et al. 2002), Peru (Palmer et al. 2003) a v Jižní Indii (Muthusamy et al. 2006). *Cryptosporidium muris* má široké hostitelské spektrum

zahrnující myši a jiné hlodavce, některé přežvýkavce, primáty, psy, kočky a králíky (Iseki et al. 1989; Xiao et al. 2004).

## 2.2. TAXONOMIE

Kryptosporidie jsou v současnosti řazeny do čeledi Cryptosporiidae a kmene Apicomplexa. Dříve byly kryptosporidie na základě vývojového cyklu v GIT nesprávně řazeny mezi kokcidie (Fayer et al. 1997a). Na základě fylogenetické analýzy genu kódujícího RNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA) je rod *Cryptosporidium* považován za součást třídy Gregarina (Carreno et al. 1999), s níž ho pojí společná nepřítomnost plastidového genomu (Zhu et al. 2000) a antigenní příbuznost zjištěná monoklonálními protilátkami (Bull et al. 1998).

Původní zařazení do třídy Coccidea přisuzovalo kryptosporidiím striktní hostitelskou specifitu, což mělo za následek popsání více jak 20 druhů kryptosporidií (Corliss 1994; Fayer et al. 1997b). Studie mezidruhových infekcí a morfologie oocyst tuto domněnku mylně vyvrátily a tím se některé druhy staly neplatnými (Levine 1984). Na konci 20. století byla většina nezařazených genotypů kryptosporidií označována jako různé genotypy druhu *C. parvum*. Rozvoj molekulární genetiky a narůstající počet experimentálních studií prokázal platnost původní teorie o hostitelské specifitě jednotlivých druhů/genotypů kryptosporidií. V současné době je známo 31 druhů kryptosporidií a více než 100 nezařazených izolátů kryptosporidií je uváděno pod označením genotypu, který udává hostitelskou specifitu, přičemž se předpokládá, že většina z dosud popsaných genotypů jsou samostatné druhy (Fayer et al. 2007; Kváč et al. 2014; Šlapeta 2013).

## 2.3. VÝVOJOVÝ CYKLUS

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou jedno-hostitelští paraziti mající složitý životní cyklus zahrnující čtyři fáze – excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie. Samotný vývojový cyklus se dělí na sexuální a asexuální reprodukční fázi. Dále je možno podle průběhu vývojového cyklu dělit zástupce rodu *Cryptosporidium* na dvě různé skupiny. U první skupiny dochází k vývoji v žaludečním epitelu a u druhé ve střevním epitelu. Druhy infikující epitel střev

vytvářejí menší a kulaté oocysty, zatímco druhy vyvíjející se v pravém žaludku svého hostitele mají větší a oválný tvar (Current et al. 1986).

Kryptosporidie způsobí změny v mikrovilech enterocytů, ty se prodlužují, obklopí sporozoit a vzájemně splynou, čímž sporozoita uzavrou v parazitoformním vaku (Melicherová et al. 2014). Tuto lokalizaci si kryptosporidie zachovávají s velmi krátkými přestávkami strávenými v lumen po celou dobu endogenní fáze životního cyklu (Goebel et Braendler 1982).

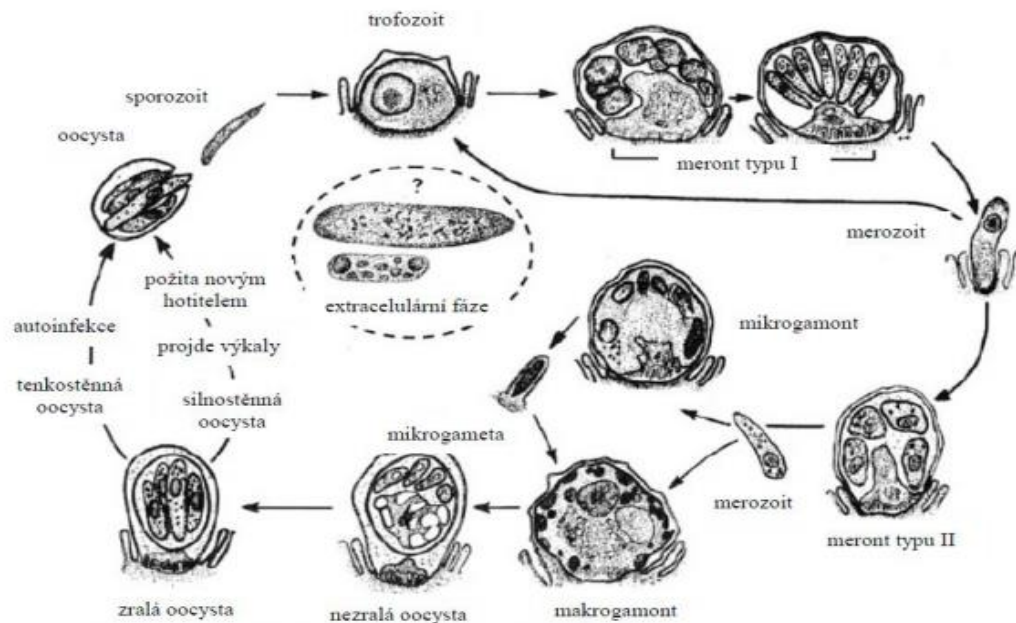
Vlastní vývojový cyklus začíná pozřením životaschopných oocyst vnímavým hostitelem (obrázek 1). Oocysty se dostanou do GIT nebo do dýchacího traktu, kde dochází k excystaci a uvolnění čtyř infekčních sporozoitů aktivně napadajících buňky epitelu (Hijawi et al. 2002).

Začíná merogonie, kde dochází k dělení jádra a buněk trofozoitů. Postupně vznikají dva typy merontů. Meronti I. typu se dále množí asexuálně, zatímco meronti II. typu vstupují do sexuální fáze (gametogonie) (Current et al. 1986).

V gametogonii (sexuální fáze) jsou vytvářeny dvě sexuální stádia, vícejaderné mikrogamonty, které dávají vzniknout mikrogametocytům a jednojaderné makrogamonty, které dávají vzniknout makrogametocytům. Z mikrogametocytů se uvolňují mikrogamety, které splynou s makrogametami za vzniku zygoty.

Zygota prochází fází endogenní sporulace, kdy se mění na oocystu, ve které se tvoří čtyři sporozoiti. Vzniklé oocysty jsou dvojího typu – tenkostěnné a silnostěnné. Tenkostěnné oocysty excystují v hostiteli a jsou zodpovědné za autoinfekci a silnostěnné, velmi odolné oocysty vylučované do vnějšího prostředí slouží k přenosu infekce na vnímavé jedince (Current 1988). Přítomnost tenkostěnných oocyst byla prokázána jen u druhu *C. parvum*. Větší množství (80 %) opouští tělo hostitele trusem a jsou schopny infikovat další hostitele.

**Obrázek 1.** Schématické znázornění životního cyklu kryptosporidií (Fayer 2008, upraveno)



## 2.4. PŘENOS A PRŮBĚH INFEKCE

Infekční oocysty jsou do prostředí uvolňovány především výkaly hostitele, případně sputem. Ve vnějším prostředí jsou velice odolné a za vhodných podmínek si mohou zachovat infekčnost i po dobu 6 měsíců (Bednárska et al. 2003; Fayer 2004; Ramirez et al. 2004). Oocysty odolávají klasickým dezinfekčním úpravám vody, jako je chlorování (Dolejš 2004).

Díky své všudypřítomnosti v životním prostředí a schopnosti infekce mnoha hostitelů, včetně člověka, je známo několik způsobů přenosu. Nejčastějším je přímý kontakt, pozření kontaminované potravy či vody a kontaktem s nakaženým jedincem (Feng 2008; Ziegler et al. 2007). Za nejvýznamnější zdroj přenosu kryptosporidií je v dnešní době považována voda – pitná i rekreační (Bednárska et al. 2007).

Prepatentní období, doba od pozření infekčních oocyst po vyloučení oocyst do vnějšího prostředí, je závislá na hostiteli, druhu a genotypu kryptosporidie a infekční dávce (Hijjawi et al. 2002). Mezní hodnota je 3 – 24 dnů. Inkubační doba trvá přibližně 5 – 7 dní (Fayer et al. 2005). Vlastní patentní doba, vylučování oocyst do vnějšího prostředí, trvá nejčastěji v rozmezí 1 – 20 dní. Tato doba je také ovlivněna faktory jako je imunitní stav, věk, druh hostitele a druh a genotyp kryptosporidie (Anderson 1987; Enemark et al. 2003; Fayer et al. 2005;

Hijjawi et al. 2002; Iseki 1979; Kváč et al. 2007, 2008, 2013, 2014; Lindsay et al. 2000; Masuno et al. 2006; Matsui et al. 2001; Pospischil et al. 1987; Tzipori et Ward 2002). Přehled patentních a prepatentní období některých druhů kryptosporidií je uveden v tabulce 1.

**Tabulka 1.** Patentní a prepatentní doba některých druhů kryptosporidií

DRUH	HOSTITEL	PREPATENTNÍ	PATENTNÍ
		DOBA	DOBA
(dny)			
<i>C. andersoni</i> Lindsay et al., 2000	skot	18	>90
<i>C. baileyi</i> Current et al., 1986	kuře	4 – 24	18
<i>C. bovis</i> Fayer et al., 2005	skot	10 – 12	18
<i>C. felis</i> Iseki, 1979	kočka	5 – 6	7 – 10
<i>C. galli</i> Pavlásek, 1999	drůbež	5	6
<i>C. hominis</i> Morgan-Ryan et al., 2002	člověk	4 – 5	dle stavu imunitního systému
<i>C. muris</i> Tyzzer, 1907	myš	6 – 21	20 – 30
<i>C. parvum</i> Tyzzer, 1912	člověk	4 – 22	dle stavu imunitního systému
<i>C. scrofarum</i> Kváč et al., 2013a	prase	6 – 7	>30
<i>C. suis</i> Ryan et al., 2004	prase	2 – 9	9 – 15
<i>C. tyzzeri</i> Ren et al., 2011	myš	6 – 7	24 – 28

## 2.5. HOSTITELSKÁ SPECIFITA

V rámci rodu *Cryptosporidium* lze odlišit 3 skupiny kryptosporidií dle hostitelské specificity. První skupinu tvoří druhy s nízkou hostitelskou specificitou. Typickými zástupci jsou *C. parvum* a *C. ubiquitum*. *Cryptosporidium parvum* je považováno za nejméně hostitelsky specifický druh a bylo detekováno a experimentálně přeneseno na celou řadu hostitelů včetně člověka a je předpokládána vnímavost všech savců (Fayer 2004). Dále sem patří druh *C. melagridis*, který je infekční jak pro savce, tak pro ptáky (Ditrich et al. 1991; Slavin 1955).

Druhou skupinu tvoří druhy, které jsou specifické pro určité skupiny hostitelů. Například *C. andersoni* je typickým parazitem skotu a dalších polygastrů (Anderson 1991, 1998; Esteban et Anderson 1995; Kváč et Vítovec 2003;

Kváč et al. 2008; Lindsay et al. 2000). Stejně tak *C. muris* je dominantním druhem u hlodavců (Anderson 1991; Fayer et al. 1991; Kváč et al. 2008a; Ryan et al. 2003).

U ostatních druhů a genotypů se předpokládá úzká hostitelská specifita (tabulka 2). Nicméně řada úzce hostitelsky specifických druhů a genotypů byla popsána jako původci lidské kryptosporidiózy (Caccio et al. 2002; Ditrich et al. 1991; Guyot et al. 2001; Pedraza-Diaz et al. 2000, 2001; Xiao et al. 2001) (tabulka 3).

**Tabulka 2.** Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*

DRUH	HOSTITEL	LOKALIZACE
<i>C. andersoni</i> Lindsay et al., 2000	skot	slez
<i>C. baileyi</i> Current et al., 1986	drůbež	bursa Fabricii
<i>C. bovis</i> Fayer et al., 2005	skot	tenké střevo
<i>C. canis</i> Fayer et al., 2001	psi	tenké střevo
<i>C. cichlidis</i> Paperna et Vilenkin, 1996	ryby	střevo*
<i>C. cuniculus</i> Robinson et al., 2010	králík	tenké střevo
<i>C. ducismarci</i> Traversa 2010	želvy	střevo*
<i>C. fayeri</i> Ryan et al., 2008	klokani	střevo*
<i>C. felis</i> Iseki, 1979	kočky	tenké střevo
<i>C. fragile</i> Jirků et al., 2008	obojživelníci	žaludek
<i>C. galli</i> Pavlásek, 1999	ptáci	žláznatý žaludek
<i>C. hominis</i> Morgan-Ryan et al., 2002	člověk	tenké střevo
<i>C. marcopodum</i> Ryan et Power, 2008	klokan	střevo*
<i>C. meleagridis</i> Slavin, 1955	ptáci	tenké střevo
<i>C. molnari</i> Alvarez-Pellitero et Sitjá-Bobadilla, 2002	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. muris</i> Tyzzer, 1907	hlodavci	žaludek
<i>C. nasorum</i> Hoover et al., 1981	ryby	střevo*
<i>C. parvum</i> Tyzzer, 1912	savci	tenké střevo
<i>C. reichenbacklinkei</i> Paperna et Vilenkin, 1996	čichavec	střevo*
<i>C. ryanae</i> Fayer et al., 2008	skot	střevo
<i>C. scophthalmi</i> Alvarez-Pellitero et al., 2004	platýs	střevo
<i>C. serpentis</i> Levine et al., 1980	plazi	žaludek
<i>C. scrofarum</i> Kváč et al., 2013	prasata	střevo
<i>C. suis</i> Ryan et al., 2004	prasata	tlusté střevo
<i>C. tyzzeri</i> Ren et al., 2012	myš	tenké střevo
<i>C. ubiquitousum</i> Fayer et al., 2010	skot	střevo
<i>C. viatorum</i> Elwin et al., 2012	člověk	střevo*
<i>C. varanii</i> Pavlásek et al., 1995	plazi	žaludek, tenké střevo
<i>C. wrairi</i> Vetterling et al., 1971	morčata	tenké střevo
<i>C. xiaoi</i> Fayer et Santín, 2009	ovce	střevo
<i>C. erinacei</i> Kváč et al., 2014	ježek	střevo

\* lokalizace dle fylogenetické pozice, nebylo experimentálně ověřeno

**Tabulka 3.** Druhy a genotypy kryptosporidií infikující člověka

<b>DRUH / GENOTYP</b>	<b>INFEKCE ČLOVĚKA</b>	<b>HLAVNÍ ZDROJ OOCYST</b>
<i>C. hominis</i> §	vysoká	člověk
<i>C. parvum</i> §	vysoká	člověk, tele
<i>C. canis</i>	střední/vysoký	pes
<i>C. felis</i>	střední/vysoký	kočka
<i>C. melagridis</i> §	střední/vysoký*	krůta
<i>C. viatorum</i> #	střední/vysoký*	člověk#
<i>C. andersoni</i>	nízká	skot
<i>C. eriancei</i>	nízká	ježek
<i>C. cuniculus</i> §	nízká	člověk, králík
<i>C. fayeri</i>	nízká	klokan
<i>C. muris</i> §	nízká	hlodavci
<i>C. scrofatum</i>	nízká	prase
<i>C. suis</i>	nízká	prase
<i>C. tyzzeri</i> §	nízká	hlodavec
<i>C. ubiquum</i> §	nízká	skot, ovce, koza
<i>C. wrairi</i>	nízká	morče, prase
chipmunk genotype	nízká	veverka
horse genotype	nízká	kůň
monkey genotype	nízká	opice
skunk genotype	nízká	skunk

\* v závislosti na geografické poloze, § druh/genotyp infekční pro laboratorní myši; # přirozený hostitel je neznámý

## 2.6. KLINICKÉ PROJEVY A IMUNITNÍ ODPOVĚĚ HOSTITELE PŘI KRYPTOSPORIDIÓZE

Zástupci rodu *Cryptosporidium* způsobují onemocnění zvané kryptosporidióza. Klinické projevy tohoto onemocnění závisí na imunitním stavu hostitele a lokalizaci parazita v hostiteli.

U imunokompetentních i imunodeficientních jedinců bývá hlavním symptomem infekce kryptosporidiiemi s lokalizací v tenkém střevě akutní vodnatý průjem způsobený poškozením střevních buněk (Sterling et al. 1986), který se ale ne vždy musí projevit (Haupt et al. 2005; Pettoelo-Mantovani et al. 1995; Turkcapar et al. 2002). Dalšími příznaky mohou být křečovitá bolest břicha, nechutenství, zvracení, horečka, malátnost, únava a zvýšené pocení (Fayer 2003; Thompson 2005).

Průměrná doba trvání nemoci se pohybuje v rozmezí do 3 – 26 dnů, nejčastěji však 12 dní. Pokud je místem infekce tlusté střevo, onemocnění probíhá bez typických symptomů (Vítovec et al. 2006). Kryptosporidióza způsobená

žaludečními kryptosporidii probíhá rovněž asymptomaticky, pouze v několika málo případech byly popsány příznaky spojené s kachexií (Anderson 1987; Pospischil et al. 1987).

Příznaky akutní střevní kryptosporidie zahrnují ztrátu chuti k jídlu, apatii a váhový úbytek. Rychlá ztráta živin a tekutin během průjmů způsobuje dehydrataci. Protože střevní buňky jsou narušeny, absorpce živin je omezená a hostitel tak přes trávicí trakt ztrácí více živin, než přijímá (Mason et al. 1981). To rovněž narušuje imunitní systém mláďat a způsobuje ho přístupnější sekundární infekci. Jakmile tělo vyčerpá zásoby živin, jako jsou minerální látky a bílkoviny, rychle nastává smrt (Thamsborg et al. 1990a,b).

U imunodeficitních jedinců bývá onemocnění chronické, velmi často spojené s diseminací do dalších orgánů, například do respiračního traktu, slinivky či do močového měchýře (Current et al. 1991; Fayer et al. 1997b). Šíří se do dalších úseků zažívacího traktu (duodenum, žaludek, jícen, kolon a rektum). Dále postihuje sliznice žlučovýchodů, vývody pankreatu a dýchací trakt. Konečný průběh infekce závisí na stupni imunodeficiencie (Flanigan et al. 1992).

V lidské populaci je ve srovnání se střevními druhy výzkum imunitní odpovědi proti žaludečním druhům kryptosporidií na okraji zájmu, přestože právě nízká patogenita, absence klinických příznaků a dlouhá prepatentní a patentní perioda umožňuje dlouhodobé sledování imunitní odpovědi u řady modelových organizmů. Navíc podstatnou výhodou je vnímavost dospělých jedinců s plně vyvinutým imunitním systémem k infekci a možnost snadné, dlouhodobé pasáže parazita v laboratorních podmínkách (Kváč et al. 2007; McDonald et al. 1992).

Přirozená imunita jako první registruje přítomnost patogenů v organismu a zodpovídá za prvotní nespecifickou obrannou odpověď hostitele. Významnou složkou přirozené imunity je komplement, jehož aktivace vede k odstranění patogenu. K nespecifické imunitě řadíme i buňky bez primárních imunitních funkcí, jako jsou epiteliální buňky, které jsou také schopny za určitých okolností sekrece cytokinů. Přirozená imunita sice nedisponuje tvorbou paměťových buněk, ale její velkou výhodou je rychlost, na přítomnost patogenů v organismu reaguje během několika minut (Murphy et al. 2008).

Protože kryptosporidie parazitují přímo na buňkách epitelu, produkce různých zánět stimulujících molekul epiteliálními buňkami v místě infekce je důležitou složkou nespecifické imunitní odpovědi. Chemokiny produkované



při kryptosporidióze ovlivňují migraci imunitních buněk do místa infekce (Laurent et al. 1997).

Přestože kryptosporidiová infekce vede k produkci specifické protilátkové odpovědi, bylo prokázáno, že B-lymfocyty nehrají v procesu samovyléčení důležitou úlohu a převládá názor, že hlavním způsobem, jakým hostitel eliminuje parazita, je buňkami zprostředkovaná imunita (Riggs 2002; Thoedos 1998). Řada dalších studií dokazuje, že buněčná imunita a T-lymfocyty jsou hlavním ochranným faktorem proti kryptosporidiovým infekcím (Abrahamsen et al. 1997; Boher et al. 1994). Další důkaz o nezbytnosti buněčné imunity a T-lymfocytů při kontrole kryptosporidiózy podala studie, kde se imunokompetentní myši s depletovanými T-lymfocyty nedokázaly vyléčit z infekce *C. muris* (McDonald et al. 1992). McDonald et al. (1992, 1996) považuje imunologický stav hostitele za rozhodující faktor ovlivňující rozsáhlost nákazy a schopnost hostitele jí eliminovat. Popsal schopnost imunosuprimovaných kmenů laboratorních myší zdotat nákazu *C. muris* po peritoneální injekci lymfocytů neinfikovaných imunokompetentních myší. Ve studiích věnujících se imunitní reakci hostitele se předpokládal větší význam  $CD4^+$  T-lymfocytů (McDonald et al. 1996). Na význam  $CD8^+$  T-lymfocytů migrujících do sliznice při infekci upozornila Jalovecká et al. (2010). Žádoucím výsledkem odpovědi imunitního systému je samovyléčení (self-cure effect), které nastává u imunokompetentních jedinců (Chappel et al. 1999; Xiao et al. 2004a).

Specifická imunitní odpověď je dosud jediným známým efektivním mechanismem vedoucím k vyléčení hostitele z kryptosporidiózy, protože dosud nebyla popsána žádná účinná terapie (Hommer et al. 2003). Většina dosud známých poznatků o imunitní odpovědi na kryptosporidiovou infekci pochází ze studií provedených na *C. parvum*, střevním druhu, který je ale věkově specifický a dospělá zvířata k němu nejsou vnímavá (Tyzzer 1912).

Významnou odlišností od střevních druhů je rezistence hostitele vůči reinfekci jak stejným druhem, tak i jiný druhem/genotypem žaludečních kryptosporidií po překonání infekce (Kváč et al. 2008a; McDonald et al. 1992).

Kváč et al. (2008) provedl výzkum zaměřený na patologické znaky u přežvýkavců infikovaných žaludečnickými druhy kryptosporidií. V experimentu byl použit izolát *C. andersoni* LI03 získaný z holštýnského skotu, izolát *C. muris* RN66 z potkana (*Rattus norvegicus*), izolát *C. muris* TS03 z hlodouna východoafrického

(*Tachyoryctes splendens*) a izolát *C. muris* CB03 z velblouda (*Camelus bactrianus*). Výzkum prokázal, že izolát *C. andersoni* je infekční pouze pro skot, zatímco jehňata a kůzlata jsou vnímána k *C. muris* získaného z velblouda. Izoláty z krysy, nebyly v experimentu infekční pro žádné ze zvířat (telata, jehňata a kůzlata). Histopatologický nálezn byl pozitivní u všech experimentálně infikovaných zvířat v abomasu a byl charakterizován dilatací a epiteliální metaplazií infikovaných žaludečních žlázek bez známek zánětu v *lamina propria*. Zvířata neprojevovala žádné klinické příznaky. Nález se shodoval s výsledky předcházejících studií (Anderson 1987; Iseki et al. 1989; Kváč et Vítovec 2003).

## 2.7. TERAPIE A PREVENCE

Za prevenci je nutné na prvním místě považovat základní hygienické návyky (Feng 2008). Nejvýznamnějším faktorem, ovlivňující životaschopnost oocyst kryptosporidií ve vnějším prostředí, je teplota. Teplota nad 65 °C po dobu 20 minut a vroucí voda po dobu 1 minuty stejně tak jako i zmrazení pod -20 °C kryptosporidie spolehlivě devitalizuje. Pravděpodobně nejspolehlivějším prostředkem jak inaktivovat oocysty kryptosporidií je jejich ozonizace a úprava vody UV zářením (Betancourt et Rosei 2004).

Navzdory dlouhodobému intenzivnímu výzkumu v oblasti léčby a kontroly kryptosporidiózy, během kterého bylo vyzkoušeno velké množství terapeutických a profylaktických preparátů k léčbě přirozených i experimentálních infekcí laboratorních hlodavců (potkani, myši a křečci), přežvýkavců (skot) nebo buněčných kultur, včetně nitazoxanidu používaného při léčbě lidských kryptosporidióz, nejsou v současné době k dispozici žádné univerzální léčebné preparáty s vysokou účinností (Hommer et al. 2003; Mele et al. 2003; Naciri 1993; Rehg 1991a-c; Stockdale et al. 2007). Stejně tak není známá žádná účinná chemoterapeutická látka vhodná k léčbě imunokompromitovaných jedinců, i když existují léčiva zkracující dobu trvání průjmů a snižující množství vylučovaných oocyst (Ryan et al. 2003).

Vzhledem k epidemiologické významnosti jsou prakticky všechny studie zaměřeny na léčbu infekcí způsobených střevními druhy kryptosporidií, zejména druhem *C. parvum* a účinky většiny testovaných preparátů proti žaludečním kryptosporidiím nejsou známy. V případě žaludeční kryptosporidiózy,

kdy mohou být zvířata infekční po celý svůj život, je způsob prevence velmi problematický (Kváč et al. 2008a,b; Lindsay et al. 2000).

## 2.8. ŽALUDEČNÍ KRYPTOSPORIDIE HLODAVCŮ

V současné době jsou známy pouze dva druhy kryptosporidií parazitující v žaludečních žlázách savců, *C. andersoni* a *C. muris*, u nichž byla dosud popsána řada izolátů, odlišujících se zejména v hostitelské specifitě (Feng et al. 2011; Kodádková et al. 2010; Kváč et al. 2007, 2008, 2009; Lindsay et al. 2000; Morgan et al. 2000; Tyzzer 1910; Xiao et al. 2004a). Protože hostitelská specifita je jedním ze základních znaků odlišujících od sebe jednotlivé druhy (Xiao et al. 2004a), předpokládá se, že oba žaludeční druhy parazitující u savců představují komplex skrytých druhů, stejně jako to bylo prokázáno u střevních druhů kryptosporidií (Feng et al. 2011; Kváč et al. 2008).

Žaludeční kryptosporidie nezpůsobují žádné klinické příznaky a nelze plně zjistit ani všechny makroskopické změny. Za charakteristické histopatologické změny jsou považovány hypertrofie, atrofie a metaplazie žláznatého epitelu a dilatace infikovaných žláz (Anderson 1987; Aydin et Özkul 1996; Kváč et Vítovec 2003; Masuno et al. 2006; Özkul et Aydin 1994). Při abomasální kryptosporidíoze skotu bylo zjištěno zduření sliznice vnitřního povrchu slezu se změněnou strukturou vnitřního povrchu sliznice vyvolanou širokým otevřením vývodů infikovaných žláz (Kváč et Vítovec 2003; Masuno et al. 2006).

V ojedinělých případech byly popsány zánětlivé infiltráty v *lamina propria*, především v místě infikovaných buněk při vysokých infekčních dávkách *C. muris* u myši, koinfekci *C. muris*-like s bakterií podobné *Helicobacter heilmannii* u opic nebo skotu s dlouhodobou chronickou infekcí *C. andersoni* (Dubey et al. 2002; Taylor et al. 1999).

Prepatetní období u hlodavců BALB/c a *M. coucha* infikovaných *C. muris* (kmen TS03) se značně liší. U *M. coucha* byly patologické změny na postižené žaludeční tkáni pozorovány 14 DPI a infekce trvala po celou dobu chronické fáze. Naproti tomu žaludeční tkáň u BALB/c myši vykazovaly malé pozorovatelné změny, které zmizely 21 DPI (Melicherová et al. 2014).

### 2.8.1. *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907

Typickými hostiteli *C. muris* jsou hlodavci, hlavně z čeledi myšovitých (*Muridae*). Ovšem další studie, včetně experimentálních, ukázaly velké množství rozličných hostitelů (tabulka 4).

Vysporulované oocysty mají velikost přibližně  $7,5 - 9,8 \times 5,5 - 7,0 \mu\text{m}$  (Iseki 1986).

Infekce *C. muris* není obvykle provázena klinickými příznaky ani zánětlivými procesy v žaludeční sliznici (Iseki et al. 1989; Özkul et Aydin 1994).

V rámci druhu *C. muris* bylo rozlišeno několik kmenů/izolátů, lišících se v sekvenci SSU rDNA, získaných z různých druhů hostitelů (tabulka 5).

**Tabulka 4.** Přehled přirozeně<sup>a</sup> a experimentálně<sup>b</sup> vnímavých hostitelů k infekci *Cryptosporidium muris*

HOSTITEL	CITACE
<b>PRIMÁTI</b>	
Člověk ( <i>Homo sapiens</i> ) <sup>a</sup>	Katsumata et al. 2000
Makak jávský ( <i>Macaca fascicularis</i> ) <sup>a</sup>	Dubey et al. 2002
<b>HLODAVCI</b>	
Morče domácí ( <i>Cavia porcellus</i> ) <sup>a</sup>	Aydin et Özkul 1996
Mara stepní ( <i>Dolichotis patagonum</i> ) <sup>a</sup>	Xiao et al. 2004
Bandikut králíkovitý ( <i>Macrotis lagotis</i> ) <sup>a</sup>	Warren et al. 2003
Hlodoun východoafrický ( <i>Tachyoryctes splendens</i> ) <sup>a</sup>	Kváč et al. 2008
Norník rudý ( <i>Clethrionomys glaelolus</i> ) <sup>a</sup>	Chalmers et al. 1997
Hraboš syslí ( <i>Microtus brandtii</i> ) <sup>b</sup>	Modrý et al. 2012
Křeček zlatý ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) <sup>b</sup>	Rhee et al. 1999
Křečík Roborovského ( <i>Phodopus roborovskii</i> ) <sup>a</sup>	Pavlásek et Lávička 1995
Myš bodlinatá ( <i>Acomys cahirimus</i> ) <sup>b</sup>	Kváč (neublikováno)
Myšice křovinná ( <i>Apodemus sylvaticus</i> ) <sup>a</sup>	Chalmers et al. 1997
Krysa mnohobradavková ( <i>Mastomys natalensis</i> ) <sup>b</sup>	Neumayerová et Koudela 2008
Krysa malá ( <i>Mastomys coucha</i> ) <sup>b</sup>	Kváč et al. 2007
Myš západoevropská ( <i>Mus musculus domesticus</i> ) <sup>a, b</sup>	Chalmers et al. 1997
Myš domácí ( <i>Mus musculus</i> ) <sup>a, b</sup>	Tyzzer 1907
Potkan obecný ( <i>Rattus norvegicus</i> ) <sup>a, b</sup>	Iseki et al. 1989
Pískomil mongolský ( <i>Meriones unguiculatus</i> ) <sup>b</sup>	Koudela et al. 1998
Burunduk páskovaný ( <i>Eutamias sibiricus</i> ) <sup>a</sup>	Hůrková et al. 2003
Veverka popelavá ( <i>Sciurus carolinensis</i> ) <sup>a</sup>	Feng et al. 2007
<b>ZAJÍCOVCI</b>	
Králík divoký ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) <sup>a</sup>	Aydin et Özkul 1996

**Tabulka 4.** Přehled přirozeně<sup>a</sup> a experimentálně<sup>b</sup> vnímavých hostitelů k infekci *Cryptosporidium muris* - pokračování

<b>HOSTITEL</b>	<b>CITACE</b>
<b>ŠELMY</b>	
Kočka domácí ( <i>Felis catus</i> ) <sup>a</sup>	Iseki et al. 1989
Pes domácí ( <i>Canis familiaris</i> ) <sup>a</sup>	Aydim et Özkul 1996, Lupo et al. 2008
Kojot préríjní ( <i>Canis latrans</i> ) <sup>a</sup>	Trout et al. 2006
<b>PLOUTVONOŽCI</b>	
Tuleň kroužkovaný ( <i>Phoca hispida</i> ) <sup>a</sup>	Santín et al. 2005
<b>DAMANI</b>	
Daman skalní ( <i>Procapra capensis</i> ) <sup>a</sup>	Esteban et Anderson 1995
<b>SUDOKOPYTNÍCI</b>	
Velbloud dvouhrbý ( <i>Camelus bactrianus</i> ) <sup>a</sup>	Ryan et al. 2005
Koza domácí ( <i>Capra hircus</i> ) <sup>a, b</sup>	Rhee et al. 1998
Kamzík běláč ( <i>Oreamnos americanus</i> ) <sup>a</sup>	Valigurová et al. 2007
Gazela atlantská ( <i>Gazella cuvieri</i> ) <sup>a</sup>	Pospischil et al. 1987
Ovce domácí ( <i>Ovis aries</i> ) <sup>a, b</sup>	Rhee et al. 1998, Ryan et al. 2005, Kváč et al. 2008
Žirafa síťovaná ( <i>Giraffa camelopardalis reticulata</i> ) <sup>a</sup>	Kodádková 2007
Jelenec ušatý ( <i>Odocoileus hemionus</i> ) <sup>a</sup>	Deng et Cliver 1999

**Tabulka 5.** Přehled známých kmenů/izolátů *C. muris* a *C. andersoni* a jejich variabilita v části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rDNA)

DRUH/ IZOLÁT	HOSTITEL	ČÍSLO V GENBANK	LOKALIZACE MUTACÍ V GENU SSU rDNA *									
			40	52	410	422	429-69	443	462	467-69	521	608
<i>C. muris</i> RN 66	<i>Rattus norvegicus</i>	EU24505	C	A	C	T	TA	A	T	-	-	-
<i>C. muris</i> 22	<i>Camelus bactrianus</i>	AF093497	C	A	C	T	TA	A	T	-	-	-
<i>C. muris</i> 34	<i>Procavia campensis</i>	AF093498	C	A	C	T	TA	A	T	-	-	-
<i>C. muris</i> CB03	<i>Camelus bactrianus</i>	EU245044	C	A	C	T	TA	A	T	-	-	-
<i>C. muris</i> TS03	<i>Tachyoryctes splendens</i>	EU245043	T	A	C	T	TA	A	T	TTA	A	-
<i>C. muris</i>	<i>Felis catus</i>	DQ836341	C	G	C	T	TA	A	T	-	-	-
<i>C. muris</i>	<i>Canis familiaris</i>	EU549784	?	?	C	T	TA	A	T	-	-	-
<i>C. muris</i>	<i>Phoca hispida</i>	EU156446	C	A	C	T	TA	G	A	-	-	-
<i>C. muris</i> Kawatbi	<i>Apodemus spesiosus Giraffa</i>	AY642591	T	A	C	C	AT	A	-	-	-	G
<i>C. muris</i> GC07	<i>camelopardalis reticulata</i>	FJ883577	C	C	T	C	AT	A	-	-	-	-
<i>C. andersoni</i> Kawatbi	<i>Bos taurus</i>	AB089285	C	C	T	C	AT	A	-	-	-	-
<i>C. andersoni</i> LI03	<i>Bos taurus</i>	EU245042	C	C	T	C	AT	A	-	-	-	-
<i>C. andersoni</i> 21	<i>Ovis aries</i>	FJ608605	C	A	C	T	TA	A	T	-	-	-

\* pozice nukleotidů v aligmentu. Pozice v jednotlivých sekvencích se liší kvůli gapům vzniklým v porovnávaných sekvencích (781 bp).; ? chybějící data; - gap

### 2.8.2. *Cryptosporidium andersoni* Lindsay et al., 2000

Velikost oocyst je 6,9 – 8,7 × 5,5 – 6,9 μm (Lindsay et al. 2000). *Cryptosporidium andersoni* přirozeně se vyskytující u skotu se ukázalo být plně infekční i pro laboratorní myši (Matsubayashi et al. 2005). Infekce *C. andersoni* byla popsána také u křavy malé – *Mastomys coucha* (Kvác et al. 2007).

Parazit z rodu *Cryptosporidium* osidluje žlázy slezu u skotu, byl poprvé popsán až v roce 1985 (Upton et Current 1985), a protože byl morfologicky totožný s druhem *C. muris* získaným z trusu velblouda dvouhrbého – *Camelus bactrianus* (Anderson 1991), byly tyto dosud neznámé a pro myši neinfekční kryptosporidie označeny *C. muris*-like. Na základě molekulárních analýz a rozdílné hostitelské specifity byl izolát *C. muris*-like infikující slez skotu později popsán a pojmenován

jako samotný druh *C. andersoni* (Lindsay et al. 2000), pro druh infekční pro myši zůstal zachován název *C. muris*.

*Cryptosporidium andersoni* není běžným druhem infikujícím člověka, přesto několik nálezů již bylo prokázáno (Guyot et al. 2001; Leoni et al. 2006).

Klinické příznaky nejsou u infekce *C. andersoni* obvykle přítomny, u skotu ale byla prokázána souvislost mezi infekcí *C. andersoni* a poklesem produkce mléka a nižšími váhovými přírůstky (Esteban et Anderson 1995). Přehled hostitelů vnímavých k *C. andersoni* je uveden v tabulce 6.

Stejně jako v rámci druhu *C. muris*, také u *C. andersoni* je rozlišováno několik kmenů/izolátů získaných z různých druhů hostitelů, lišících se v sekvenci genu kódujícího SSU rDNA (tabulka 5).

**Tabulka 6.** Přehled hostitelů *Cryptosporidium andersoni*

<b>HOSTITEL</b>	<b>PŘIROZENÁ INFEKCE</b>
<b>PRIMÁTI</b>	
Člověk ( <i>Homo sapiens</i> )	Guyot et al. 2001
<b>HLODAVCI</b>	
Krysa malá ( <i>Mastomys coucha</i> )	Kváč et al. 2007
Myš západoevropská ( <i>Mus domesticus</i> )	Matsubayashi et al. 2004
Pískomil mongolský ( <i>Meriones unguiculatus</i> )	Koudela et al. 1998
Pískomil Tristramův ( <i>Meriones tristrami</i> )	Ondráčková 2007, Kváč et al. 2013
Křeček zlatý ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	Lv et al. 2009
Pískomil saharský ( <i>Gerbillus gerbillus</i> )	Ondráčková 2007, Kváč et al. 2013
Pískomil veverkaocásý ( <i>Sekeetamys calurus</i> )	Ondráčková 2007, Kváč et al. 2013
Svišť stepní ( <i>Marmota bobac</i> )	Ryan et al. 2003
Křeček sibiřský ( <i>Phodopus sungorus</i> )	Lv et al. 2009
Křeček trpasličí ( <i>Phodopus campgelli</i> )	Lv et al. 2009
<b>SUDOKOPYTNÍCI</b>	
Velbloud dvouhrbý ( <i>Camelus bactrianus</i> )	Anderson 1991
Zubr evropský ( <i>Bison bonasus</i> )	Ryan et al. 2003
Tur domácí ( <i>Bos taurus</i> )	Lindsay et al. 2000
Ovce domácí ( <i>Ovis aries</i> )	Wang et al. 2010

### 3. CÍLE PRÁCE

1. Molekulárně charakterizovat různé kmeny druhu *C. muris*, zejména kmen TS03 pocházející z *Tachyoryctes splendens* a HZ206 získaný z *Mus musculus*.
2. Popsat morfometrické rozdíly oocyst studovaných kmenů *C. muris*.
3. Popsat patogenitu a průběh infekce výše zmíněných kmenů druhu *C. muris*.
4. Posoudit vliv infekce na příjem krmiva u infikovaných hostitelů.



## **4. MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1. MATERIÁL**

#### **PARAZITI**

*Cryptosporidium muris* izolát TS03 získaný z přirozeně infikovaného hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*). V laboratorních podmínkách udržován v kryse malé (*Mastomys coucha*).

*Cryptosporidium muris* izolát HZ206 získaný z přirozeně infikované myši domácí (*Mus musculus*). V laboratorních podmínkách udržován v SCID (Severe Combined Immunodeficiency) myších.

DNA izoláty *C. muris* HZ3093, HZ3094, HZ3095 a HZ3192 získané z volně žijících myší domácích.

#### **EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA**

Osmi-týdenní krysa malá (*Mastomys coucha*, vlastní chov PaÚ BC AVČR, v.v.i.)

### **4.2. METODIKA**

#### **4.2.1. POUŽITÉ METODY**

##### **4.2.1.1. BARVENÍ OOCYST KRYPTOSPORIDIÍ ANILIN-KARBOL-METHYL VIOLETÍ (Miláček a Vítovec 1985)**

#### **ROZTOKY**

1. Roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti; 1 ml anilinu; 1 g fenolu; 30 ml alkoholu; 70 ml dH<sub>2</sub>O).
2. 2% kyselina sírová.
3. Tartrazin (1% roztok tartrazinu v 1% kyselině sírové).

#### **POSTUP**

1. Tenký nátěr trusu na podložním skličku fixovat methanolem v plameni;
2. zchlazený vzorek barvit roztokem methylvioleti po dobu 30 minut;
3. důkladně opláchnout vodovodní vodou a 1 – 3 minuty diferencovat v 2% kyselině sírové;

4. opět opláchnout pod tekoucí vodou a dobarvit roztokem tartrazinu přibližně 3 minuty;
5. opláchnout, usušit a mikroskopicky vyhodnotit.

#### **4.2.1.2. MIKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ**

Tato metoda je založena na principu specifického barvení oocyst v nátěru trusu a jejich odlišení od ostatních objektů. Vzhledem k velikosti oocyst jsou žaludeční druhy kryptosporidií mnohem snáze detekovány pomocí koncentračních nebo barvicích metod jak ve vzorcích trusu, tak i ve vzorcích vody a půdy (Barwick et al. 2000). Oválné cysty měří v průměru  $7,5 \times 5,5 \mu\text{m}$ . Uvnitř oocysty se nacházejí čtyři sporozoiti a výrazné reziduální tělísko.

Nátěr trusu byl obarven metodou dle Miláčka a Vítovce (1985) a prohlížen světelným mikroskopem (Olympus IX 70) při zvětšení  $1000\times$  za použití imerzního oleje.

#### **4.2.1.3. HODNOCENÍ INTENZITY INFEKCE**

Při nízké intenzitě byly počítány všechny oocysty nalezené na preparátu, při vysoké intenzitě byl počítán počet oocyst ve 30 náhodných zorných polích. Ze zjištěných údajů (hmotnost trusu, počet zorných polí a počet oocyst na sklíčku) byla odhadnuta intenzita infekce a vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu (OPG, oocysts per gram) (Kváč et al. 2007).

#### **4.2.1.4. PURIFIKACE OOCYST**

Trus s oocystami *C. muris* TS03 nebo HZ206 byl zhomogenizován v třecí misce přečištěn pomocí sacharózového gradientu (4.2.1.4.1.) a následně dočištěn na cesium chloridovém gradientu (4.2.1.4.2.). Dále byl získaný izolát přefiltrován přes sítko o velikosti ok  $10 \mu\text{m}$ .

##### **4.2.1.4.1. SACHARÓZOVÝ GRADIENT (Arrowood a Sterling 1987)**

###### **ROZTOKY**

1. Sheaterův cukerný roztok (259 ml deionizované vody ( $\text{dH}_2\text{O}$ ); 405 g cukru; 7,29 g fenolu).

2. 1% PBS Tween (1% Tween 20 v PBS (phosphate buffered saline, 1 l dH<sub>2</sub>O; 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O; 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).
3. Pracovní Sheaterovy roztoky  
roztok 1: 1 + 2 (1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly 1% PBS Tween)  
roztok 2: 1 + 4 (1 díl Sheaterova roztoku + 4 díly 1% PBS Tween)

## POSTUP

1. Trus zhomogenizovat ve třecí misce a vzniklou suspenzi přecedit přes čajové sítko;
2. do silnostěnných centrifugačních skleněných zkumavek (objem 100 ml) navrstvit gradient (1. vrstva 30 ml Sheaterův roztok 1; 2. vrstva 30 ml Sheaterův roztok 2);
3. 15 ml suspenze oocyst v destilované vodě navrstvit na sacharózový gradient;
4. centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C;
5. odsát horní 1/3 objemu, supernatant přenést do čisté zkumavky a doplnit dH<sub>2</sub>O;
6. centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C a opakovat krok 5 a opět centrifugovat;
7. 1/2 objemu odsát, opět doplnit dH<sub>2</sub>O a centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C;
8. pelet s oocystami uchovávat při 4 °C v dH<sub>2</sub>O.

### 4.2.1.4.2. CESIUM CHLORIDOVÝ GRADIENT

#### ROZTOKY

1. Roztok cesium chloridu (21,07 g CsCl (>99% čistota + 100 ml dH<sub>2</sub>O).
2. PBS (pH 7,2).

#### POSTUP

1. Trus po přečištění na sacharózovém gradientu centrifugovat 10 minut při 1450 g a 4 °C;
2. odebrat supernatant a sediment obsahující oocysty resuspendovat v 0,5 ml PBS;

3. do čisté mikrozkušavky přidat 1 ml CsCl a převrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS;
4. centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C;
5. odebrat 1 ml supernatantu s oocystami a naředit v nadbytku PBS;
6. centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C;
7. odebrat supernatant a vzorek opět centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C;
8. přečištěné oocysty skladovat v dH<sub>2</sub>O při 4 °C.

#### **4.2.1.5. IZOLACE DNA**

Izolace byla provedena pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex).

#### **SOUČÁSTI KITU**

1. Elution Buffer D 200 µl/vzorek.
2. Lysis Buffer P.
3. Proteinase K lyofylizát.
4. Promývací pufry Wash I a Wash II.
5. Binding Buffer P.
6. Kolony se sběrnými zkumavkami.
7. InviAdsorb zkumavky.

#### **POSTUP**

1. K 200 mg trusu přidat skleněné 0,5 mm kuličky; 0,8 – 1,2 ml Lysis Buffer P a rozbít 1 minutu při maximální rychlosti užitím bead beateru (Fast Prep 24 Instrument, MP Bio);
2. inkubovat v termobloku 10 minut při 95 °C;
3. centrifugovat 1 minutu při 13 400 g;
4. veškerý supernatant přenést do InviAdsorb zkumavek, zvortexovat a 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě a následně centrifugovat 3 minuty při 13 400 g;
5. supernatant přepipetovat do čistých 1,5 ml mikrozkušavek, centrifugace 3 minuty 13 400 g;

6. do čistých 1,5 ml mikrozkušavek napipetovat 25  $\mu$ l Proteinase K a přidat 400  $\mu$ l supernatantu, zvortexovat;
7. inkubovat v termobloku 10 minut při 70 °C;
8. připipetovat 400  $\mu$ l Binding Buffer P, zvortexovat;
9. přenést veškerý objem na kolony se sběrnými mikrozkušavkami a inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a následně centrifugovat 1 minutu při 13 400 g;
10. vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, napipetovat 500  $\mu$ l Wash I a centrifugovat 1 minutu při 13 400 g;
11. vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, napipetovat 800  $\mu$ l Wash II a centrifugovat 1 minutu 13 400 g;
12. vylít odpad a opět centrifugovat 3 minuty při 13 400 g;
13. kolonu dát na čistou 1,5 ml mikrozkušavku, na kolonu napipetovat 200  $\mu$ l přehřáté dH<sub>2</sub>O;
14. inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.

#### **4.2.1.6. MORFOMETRIE OOCYST**

Velikost oocyst *Cryptosporidium muris* byla měřena vždy u 100 ks purifikovaných oocyst pomocí digitální analýzy obrazu (software M.I.C. Quick Photo Pro v 2.0 software, Olympus Camedia C-5060 WIDEZOOM, 5.1 megapixels digitální kamera; Mikroskop Olympus IX70; za použití imerzního objektivu - zvětšení 1000 $\times$ ). Byla měřena délka a šířka oocyst a byl vypočítán index tvaru.

#### **4.2.1.7. HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ**

Žaludky usmrcených krys malých byly fixovány 24 hodin ve fixačním roztoku Davidson a dále přendány do zásobního roztoku Davidson, kde byly vzorky uchovány do dalšího zpracování. Histologické řezy byly zpracovány standardní parafínovou metodou. Histologické řezy tkáně byly nabarveny hematoxylin-eosinem, metodou PAS a Wolbachovou modifikací Giemsova barvení. Výsledky byly porovnány s neinfikovanými zvířaty, které byly vyšetřeny stejnými postupy.

## ROZTOKY

1. Davidson zásobní roztok (1 díl glycerinu; 2 díly koncentrovaného formolu; 3 díly 96% alkoholu; 3 díly dH<sub>2</sub>O);
2. Davidson fixační roztok (9 dílů zásobního roztoku; 1 díl kyseliny octové);
3. I. vzestupná alkoholová odvodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; 96% alkohol; aceton; xylen a xylen);
4. parafinová řada (4 následné roztoky parafínu, 1:3, 1:1, 3:1, 100% parafín);
5. alkoholová sestupná zavodňovací odparafinovací řada (xylen; xylen; xylen; 96% alkohol; 96% alkohol; 80% alkohol; 70% alkohol; dH<sub>2</sub>O a dH<sub>2</sub>O);
6. II. vzestupná zavodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96%alkohol; 96% alkohol; karboxylen; karboxylen; xylen; xylen a xylen);
7. kanadský balzám.

## POSTUP

1. Vzorky odvodňovat I. vzestupnou alkoholovou řadou po 60 minutách vyměnit roztok;
2. v posledním roztoku nechat 90 minut;
3. prosytit parafínem (2 - 4 hodiny v parafínu I; 4 - 6 hodin v parafínu II; 8-12 hodin v parafínu III, 8 - 12 hodin ve 100% parafínu);
4. vzorky zalít do čistého parafínu, vytvořit bločky, zhotovit 5 µm silné histologické řezy a připravit preparáty na podložní sklíčko a nechat 24 hodin na plotně o teplotě 42 °C;
5. preparáty odparafinovat alkoholovou sestupnou zavodňovací řadou vždy po 5 minutách;
6. vzorky nabarvit (barvení hematoxylin-eosin; barvení dle Wolbacha) a po barvení pokračovat v odvodňování II. alkoholovou vzestupnou řadou vždy po 5 minutách, v karboxylenech ponechat pouze 1 minutu;
7. vzorky zamontovat do kanadského balzámu a nechat sušit při teplotě 42 °C;
8. prohlížet světelným mikroskopem (Olympus IX70) pod vhodným zvětšením.

#### **4.2.1.7.1. BARVENÍ HEMATOXYLIN-EOSIN**

1. Vzorčky barvit 10 minut v hematoxylinu (0,5 g hematoxylinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 500 ml dH<sub>2</sub>O + 25 g síranu hlinito-amonného + 0,1 g jodičnanu sodného + 20 ml kyseliny octové);
2. 10 minut oplachovat pod tekoucí vodou;
3. 5 minut barvit vzorčky v eosinu (0,5 g eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 250 ml dH<sub>2</sub>O + 10 ml kyseliny octové).

#### **4.2.1.7.2. BARVENÍ DLE WOLBACHA**

1. Barvit pracovním roztokem Giemsa přes noc (zásobní roztok – 4 ml kalafuny do 100 ml 96% etanol; zásobní roztok – 1 ml zásobního roztoku do 100 ml 96% etanolu);
2. opláchnout deionizovanou vodou;
3. opláchnout 96% etanolem;
4. ponořit do pracovního diferenciálního roztoku kalafuny (zásobní roztok – 10 g kalafuny do 100 ml 96% etanolu; pracovní roztok – 1 ml zásobního roztoku do 100 ml 96% etanolu) na několik sekund;
5. opláchnout 96% etanolem;
6. pokračovat II. vzestupnou alkoholovou odvodňovací řadou, začínat až na 96% etanolu.

#### **4.2.1.7.3. BARVENÍ PAS**

##### **ROZTOKY**

1. Schiffovo reagens (100 ml H<sub>2</sub>O; 1 g basický fuchsin; 10 ml 1N kyselina chlorovodíková; 1 g pyrosiřičitan draselný; 0,5 g aktivní uhlí).
2. Siřičitá voda (5 ml 1N kyseliny chlorovodíkové; 0,5 g pyrosiřičitan draselný; 100 ml dH<sub>2</sub>O).

##### **POSTUP**

1. Odparafinovat řezy;
2. vložit na 10 minut do roztoku kyseliny jodisté (0,8 g do 100 ml dH<sub>2</sub>O);
3. 10 minut oplachovat pod tekoucí vodou;
4. na 30 minut vložit do Schiffova reagens;

5. 5 minut prát ve 2 lázních sířičité vody a poté oplachovat 15 min pod tekoucí vodou;
6. 1 – 2 minut ponořit do hematoxylinu;
7. opláchnout v 96% alkoholu, butylalkoholu, xylenu.

### 4.3. GENOTYPIZACE

Vyizolovaná DNA byla použita pro amplifikaci SSU rDNA, AKTIN, MS1, MS2, MS3, MS16 pomocí nested PCR (Feng et al. 2011; Jiang et al. 2005; Sulaiman et al. 2002).

DNA byla amplifikována v termocykleru za použití programu:

1. Počáteční denaturace po dobu 3 minuty při 94 °C;
2. 35 cyklů zahrnující denuraci 45 s při 94 °C;
3. nasedací teploty primerů – tabulka 10 – 15;
4. extenze 60 s při 72 °C;
5. finální extenze 7 minut při 72 °C.

Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 2 µl primárního PCR produktu. Protokoly pro reakční směsi PCR jsou uvedeny v tabulce 7 – 9. Sady primerů pro amplifikaci části genu v tabulce 10 – 15.

**Tabulka 7.** Rozpis koncentrací reagensů primární a sekundární reakce pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribosomální podjednotku *Cryptosporidium* spp.

PRIMÁRNÍ REAKCE			SEKUNDÁRNÍ REAKCE		
REAGENCIE	KONCENTRACE	OBJEM (µl)	REAGENCIE	KONCENTRACE	OBJEM (µl)
H <sub>2</sub> O	-----	<b>12,70</b>	H <sub>2</sub> O	-----	<b>13,10</b>
MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)	<b>1,20</b>	MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)	<b>1,20</b>
10×pufr	-----	<b>2,00</b>	10×pufr	-----	<b>2,00</b>
dNTP	10 mM	<b>0,40</b>	dNTP	10 mM	<b>0,40</b>
forward	10 µM	<b>0,40</b>	forward	10 µM	<b>0,40</b>
reverse	10 µM	<b>0,40</b>	reverse	10 µM	<b>0,40</b>
BSA	(10 mg/ml)	<b>0,40</b>	-----	-----	
taq	(1U/1µl)	<b>0,50</b>	taq	(1U/1µl)	<b>0,50</b>
DNA	-----	<b>2,00</b>	DNA	-----	<b>2,00</b>
<b>CELKEM</b>	-----	<b>20,00</b>	<b>CELKEM</b>	-----	<b>20,00</b>

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *C. parvum*.



**Tabulka 8.** Rozpis koncentrací reagensů primární a sekundární reakce pro amplifikaci genu kódujícího AKTIN *Cryptosporidium* spp.

PRIMÁRNÍ REAKCE			SEKUNDÁRNÍ REAKCE		
REAGENCIE	KONCENTRACE	OBJEM (μl)	REAGENCIE	KONCENTRACE	OBJEM (μl)
H <sub>2</sub> O	-----	<b>11,20</b>	H <sub>2</sub> O	-----	<b>12,10</b>
MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)	<b>1,20</b>	MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)	<b>1,20</b>
10×buffer	-----	<b>2,00</b>	10×buffer	-----	<b>2,00</b>
dNTP	10 mM	<b>0,40</b>	dNTP	10 mM	<b>0,40</b>
forward	10 μM	<b>0,40</b>	forward	10 μM	<b>0,40</b>
reverse	10 μM	<b>0,40</b>	reverse	10 μM	<b>0,40</b>
BSA	(10 mg/ml)	<b>0,40</b>	BSA	(10 mg/ml)	
taq	(1U/1μl)	<b>1,00</b>	taq	(1U/1μl)	<b>1,00</b>
DNA	-----	<b>3,00</b>	DNA	-----	<b>2,50</b>
<b>CELKEM</b>	-----	<b>20,00</b>	<b>CELKEM</b>	-----	<b>20,00</b>

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *C. parvum*.

**Tabulka 9.** Rozpis koncentrací reagensů primární a sekundární reakce pro amplifikaci genu kódujícího MS1, MS2, MS3 a MS16 *Cryptosporidium* spp.

PRIMÁRNÍ REAKCE			SEKUNDÁRNÍ REAKCE		
REAGENCIE	KONCENTRACE	OBJEM (μl)	REAGENCIE	KONCENTRACE	OBJEM (μl)
H <sub>2</sub> O	-----	<b>19,45</b>	H <sub>2</sub> O	-----	<b>20,65</b>
MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)	<b>1,80</b>	MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)	<b>1,80</b>
10×buffer	-----	<b>3,00</b>	10×buffer	-----	<b>3,00</b>
dNTP	10 mM	<b>0,60</b>	dNTP	10 mM	<b>0,60</b>
forward	10 uM	<b>0,60</b>	forward	10 uM	<b>0,60</b>
reverse	10 uM	<b>0,60</b>	reverse	10 uM	<b>0,60</b>
BSA	10mg/1ml	<b>1,20</b>	BSA	10mg/1ml	-----
taq	(5U/1μl)	<b>0,75</b>	taq	(5U/1μl)	<b>0,75</b>
DNA	-----	<b>2,00</b>	DNA	-----	<b>2,00</b>
<b>CELKEM</b>	-----	<b>30,00</b>	<b>CELKEM</b>	-----	<b>30,00</b>

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *C. andersoni*.

**Tabulka 10.** Sety primerů a nasedací teploty pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku *Cryptosporidium* spp.

SSU									
PRIMÁRNÍ REAKCE 55 °C									
F1	TTC	TAG	AGC	TAA	TAC	ATG	CG		
R1	CCC	ATT	TCC	TTC	GAA	ACA	GGA		
SEKUNDÁRNÍ REAKCE 55 °C									
F2	GGA	AGG	ATT	ATA	TTT	ATT	AGA	TAA	AG
R2	CTC	ATA	AGG	TGC	TGA	AGC	AGT	A	

**Tabulka 11.** Sety primerů a nasedací teploty pro amplifikaci genu kódujícího AKTIN *Cryptosporidium* spp.

<b>AKTIN</b>									
<b>PRIMÁRNÍ REAKCE 50 °C</b>									
F1	ATG	CCV	GGW	RTW	ATG	GTD	GGT	ATG	
R1	GGD	GCA	ACR	ACY	TTR	ATC	TTC		
<b>SEKUNDÁRNÍ REAKCE 45 °C</b>									
F2	GAY	GAR	GCH	CAR	TCV	AAR	AGR	GTA	T
R2	TTD	ATY	TTC	ATD	GTH	GAH	GGW	GC	

**Tabulka 12.** Sety primerů a nasedací teploty pro amplifikaci genu kódujícího MS1 *Cryptosporidium* spp.

<b>MS1</b>									
<b>PRIMÁRNÍ REAKCE 55 °C</b>									
F1	ACC	ATC	TAG	AGA	TAA	CGA	GCG	A	
R1	GAA	TCA	GAA	GAT	GAG	CGA	CAA		
<b>SEKUNDÁRNÍ REAKCE 55 °C</b>									
F2	CGT	GAT	AGT	GGG	TAT	GAA	TTG	GAC	A
R2	CGA	CTG	CGA	TAC	TCA	CGT	CCT		

**Tabulka 13.** Sety primerů a nasedací teploty pro amplifikaci genu kódujícího MS2 *Cryptosporidium* spp.

<b>MS2</b>									
<b>PRIMÁRNÍ REAKCE 55 °C</b>									
F1	TTG	CAA	CTG	TAC	CTA	AAT	TAG	TA	
R1	GTG	AGA	CTT	CTG	GGG	TCC	TGA		
<b>SEKUNDÁRNÍ REAKCE 52 °C</b>									
F2	TCA	TGA	CGC	GTC	ATA	CCA	ACA		
R2	ACT	TAG	ACA	GTT	CTA	TGC	TGA		

**Tabulka 14.** Sety primerů a nasedací teploty pro amplifikaci genu kódujícího MS3 *Cryptosporidium* spp.

<b>MS3</b>									
<b>PRIMÁRNÍ REAKCE 55 °C</b>									
F1	AAC	CAA	GTG	AAT	CAC	GAA	CTT		
R1	TTG	CTT	TAA	GTG	TAG	AGC	ATA	CAA	
<b>SEKUNDÁRNÍ REAKCE 55 °C</b>									
F2	GCA	ATA	TCT	TCG	ACG	ATC	CCA		
R2	ATG	GGA	ATA	ATT	CTT	CAT	CAT	CAA	

**Tabulka 15.** Sety primerů a nasedací teploty pro amplifikaci genu kódujícího MS16 *Cryptosporidium* spp.

<b>MS16</b>									
<b>PRIMÁRNÍ REAKCE 50 °C</b>									
F1	GAA	GAG	GTC	GAA	GTT	AAG	CTA		
R1	GAC	AAT	CAT	CTA	AAT	CGT	GTT		
<b>SEKUNDÁRNÍ REAKCE 55 °C</b>									
F2	AAG	TTT	CAT	CTA	GGT	ACA	CTA	AGA	
R2	CAC	TAC	CTA	ATC	TCG	TGT	ACT	T	

#### 4.4. GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Výsledný PCR produkt byl detekován na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (302 nm) transiluminátorem (Ultra-Lum Inc, USA) a dokumentován (High Performance UV Transilluminator, Biotech, ČR).

#### ROZTOKY

1. 50× TAE pufr (242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 l 0,5 M EDTA pH 8,00).
2. Agaróza (Serva Electrophoresis, Germany).
3. 100 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc., Canada).
4. Ethidium-bromid (10 mg.ml<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich, USA).

#### POSTUP

1. 1× TAE pufr smíchat s agarózou (120 ml TAE pufru + 1,2 g agarózy);
2. rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou přibližně na 50 °C;
3. přidat ethidium-bromid, promíchat;
4. gel nalít do formy, vložit hřebeny, nechat cca 20 minut tuhnout;
5. po ztuhnutí vyjmout hřebeny a vložit do vany na elektroforézu s TAE puftrem;
6. do jedné jamky pipetovat 100 bp Ladder, do ostatních 20 µl produktu sekundární PCR;
7. spustit elektroforézu (o napětí 85 V na dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA);

8. pro vizualizaci DNA fragmentů použít UV transiluminátor.

#### **4.5. IZOLACE Z GELU**

Produkty izolovat pomocí QIAquick Gel Extraction kitu (QIAGEN) dle doporučení výrobce.

1. Pozitivní fragment vyříznout z gelu a vložit do 1,5 ml mikrozkušavky se 400 µl QG pufru;
2. inkubace 10 minut při 50 °C;
3. přepipetovat veškerý objem na kolonu, centrifugace 1 minut při 13 400 g;
4. vylít odpad ze sběrné zkumavky, přidat 500 µl QG;
5. vylít odpad a promýt 700 µl PE pufrem, inkubace 5 minut;
6. vylít odpad, centrifugace 3 minut při max g, otočit zkumavku v centrifuze o 180 °, centrifugace 3 minut na 13 400 g;
7. kolonu dát na čistou 1,5 ml mikrozkušavku a připipetovat 30 µl PCR vody předehřáté na 50 °C, centrifugace 3 minut při 13 400 g.

#### **4.6. SEKVENACE A FYLOGENETICKÁ ANALÝZA**

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátor ABI123130 za použití sekundárních primerů. Získané nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí programu Chromas Pro v 1.32 ([www.technilysium.com.au/chromas.html](http://www.technilysium.com.au/chromas.html)) a poté pomocí programů ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/SlustalIX/>) a BioEdit porovnány se sekvenacemi uloženými v databázi GenBank.

Fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií byly vypočteny metodou Neighbor-Joining (Saitou et Nei 1987). Byl použit dvou-parametrový distanční model dle Kimury (Kimura 1980). Bootstrapový konsenzus výsledných stromů byl získán na základě 1000 opakování. Ke konstrukci fylogenetických stromů byl použit program MEGA5.

#### **4.7. DESIGN EXPERIMENTŮ**

Celkem 94 8-týdenních krys malých (*Mastomys coucha*) bylo rozděleno na tři skupiny I. kontrolní skupina (n= 30), II. pokusná skupina infikovaná oocystami

*C. muris* TS03 (n=30) a III. pokusná skupina infikovaná oocystami *C. muris* HZ206 (n=30). Čtyři krysy malé byly utraceny ihned na počátku experimentu (0 DPI). Všechna pokusná zvířata byla infikována jícni sondou odpovídajícím kmenem *C. muris* v dávce v počtu  $1 \times 10^6$  oocyst/zvíře v 200  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Kontrolní zvířata byla inokulována 200  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Všechny skupiny byly tvořeny jak samci, tak samicemi v poměru 1:1. Všechna zvířata byla před začátkem experimentu zvážena s přesností na 0,1 g. Každé zvíře bylo chováno v samostatné chovné nádobě.

#### **4.7.1. HODNOCENÍ PRŮBĚHU INFEKCE A INTENZITY INFEKCE**

V průběhu prvních 28 dnů po infekci byly vzorky trusu odebírány každý den, následně pak každých 7 dnů. Odebrané vzorky trusu byly obarveny metodou dle Miláčka a Vítovce (4.2.1.1.) a mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost oocyst *C. muris*. U mikroskopicky pozitivních vzorků byla odhadnuta intenzita infekce kryptosporidií.

#### **4.7.2. HODNOCENÍ PATOGENITY**

Každých 28 dní byly zabity 4 zvířata (vždy dva samci a dvě samice) z každé skupiny. Byla sledována velikost a hmotnost žaludku a poměr žláznaté a nežláznaté tkáně žaludku. Histopatologické změny žaludeční sliznice v důsledku infekce *C. muris* byly zhodnoceny pomocí histologických metod (4.2.1.7.). Výsledky byly porovnány s neinfikovanými zvířaty, které byly vyšetřeny stejnými postupy.

#### **4.7.3. HODNOCENÍ VLIVU INFEKCE NA PŘÍJEM POTRAVY**

Každých 7 dní byly mastomyši váženy s přesností na 0,1 g pro zjištění přírůstku živé hmotnosti. Na počátku experimentu bylo každému zvířeti poskytnuto 200 g krmiva a pitná voda *ad libitum*. Ve stejný den, kdy byla zvířata vážena, byl zbytek krmiva převážen (s přesností na 0,1 g) a následně bylo krmivo doplněno na hodnotu 200 g.

#### **4.8. STATISTICKÁ ANALÝZA**

Výsledky jednotlivých dílčích studií byly statisticky vyhodnoceny pomocí chí-kvadrát testu a studentova t-testu. K testování nulové hypotézy byl použit test T2 Hotelling. U experimentálně infikovaných zvířat byly kumulované hodnoty

intenzity infekce vypočteny jako poměr plochy pod křivkou (AUC, area under the curve). Rozdíly v průběhu infekce mezi všemi skupinami experimentálně infikovaných zvířat byly testovány pomocí studentova t-testu. Bonferroniho korekce byla provedena vzhledem k mnohačetným srovnáním jednotlivých skupin zvířat v experimentu. Všechny statistické výpočty byly provedeny v programovacím prostředí R 2.15.0 (R Development Core Team, 2007) a EpiInfo (TM), 7.1.1.14 (CDC, USA, Atlanta).

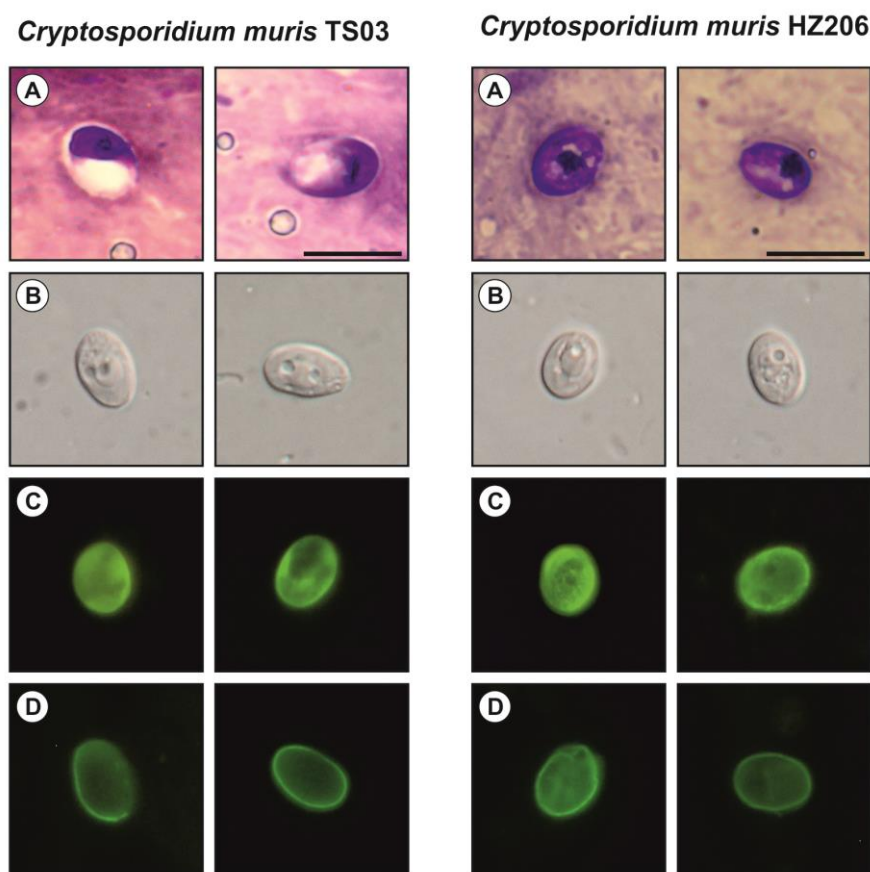
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. MOFOLOGIE A MORFOMETRIE OOCYST

Pomocí analýzy obrazu byla vyhodnocena morfologie oocyst *C. muris* TS03 a HZ206 a byla proměřena jejich velikost. Výsledky analýzy prokázaly, že jak oocysty kmene TS03, tak HZ206 jsou z hostitele vylučovány plně vysporulované. Každá oocysta obsahovala 4 sporozoity a viditelné reziduální tělísko oocysty. Stěna oocysty byla u obou kmenů bezbarvá a tenká. Výsledky měření a následná statistická analýza prokázala odlišnost ve velikosti a tvaru oocyst sledovaných izolátů.

Zatímco oocysty *C. muris* TS03 byly  $7,77 \pm 0,23 \times 5,2 \pm 0,08 \mu\text{m}$  s poměrem délka k šířce  $1,48 \pm 0,02 \mu\text{m}$  ( $n = 100$ ) morfometricky větší a užší než oocysty *C. muris* HZ206  $7,62 \pm 0,40 \times 6,63 \pm 0,09 \mu\text{m}$ ,  $1,32 \pm 0,02 \mu\text{m}$  ( $n = 100$ ) ( $p = 0,034$ ) (obrázek 2).

**Obrázek 2.** Oocysty *Cryptosporidium muris* TS03 a *Cryptosporidium muris* HZ206 zobrazené různými barvicími technikami: (A) diferenciální interferenční contrast; (B) specifické barvení aniline–karbol–methyl violetí; (C) anti-*Cryptosporidium* FITC-konjugované protilátky; (D) barvení fenol-auraminem. Měřítka = 5  $\mu$ m.



## 5.2. PRŮBĚH INFEKCE

V průběhu celého experimentu nedošlo k úhynu žádného z kontrolních ani experimentálně infikovaných zvířat. U infikovaných zvířat nebyly pozorovány žádné klinické příznaky onemocnění, zejména průjmy.

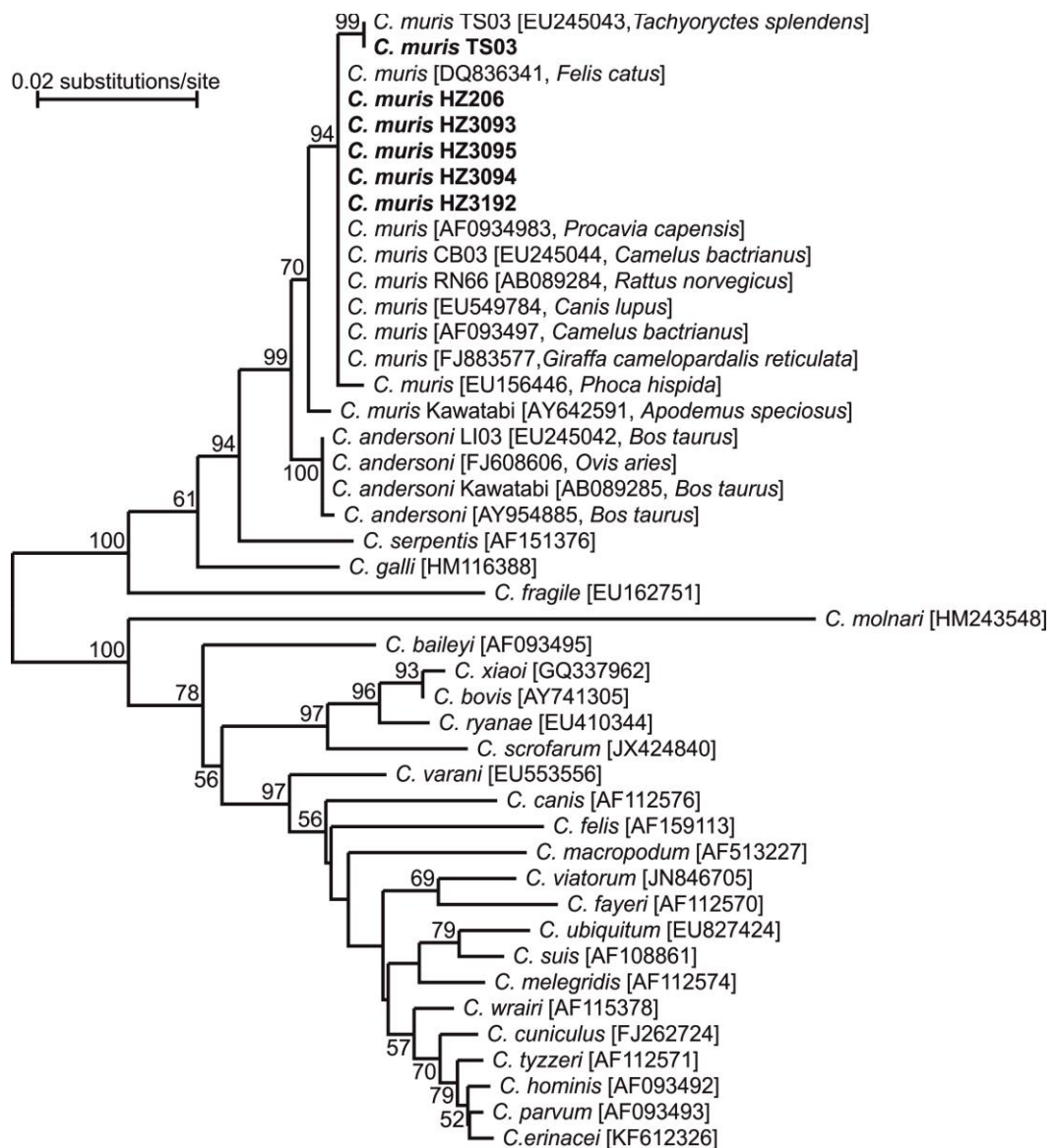
## 5.3. FYLOGENETICKÁ ANALÝZA

V rámci studia vnitrodruhové variability *C. muris* byly získány částečné sekvence genu kódující malou ribosomální podjednotku (SSU), aktin a hypotetické proteiny MS1, MS2, MS3 a MS16 celkem u 6 různých izolátů *C. muris* pocházejících z myši domácích (*Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus*) a hlodouna východoafrického (*Tachyorectes splendens*). Zatímco izoláty *C. muris* pocházejících



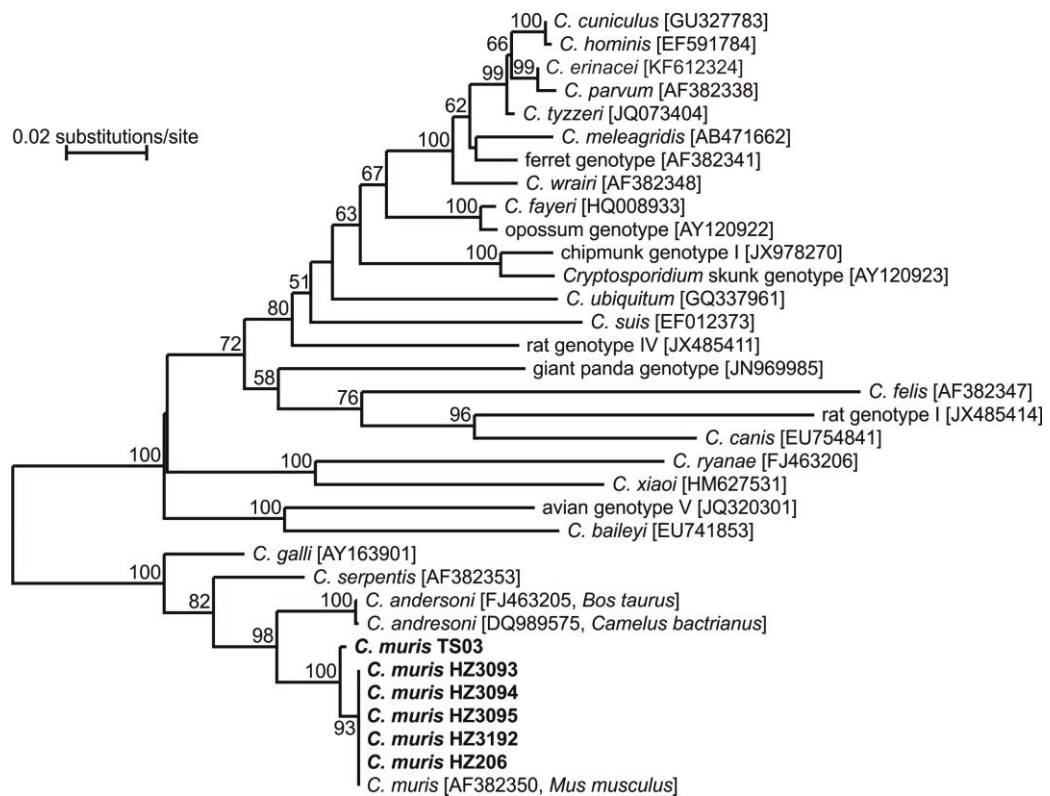
z přirozeně infikovaných myší domácích (HZ206, HZ3093, HZ3094, HZ3095 a HZ3192) byly 100% identické s typovým kmenem *C. muris* RN66, podobnost SSU sekvence izolátu TS03 byla s těmito izoláty 99,4 % (obrázek 3).

**Obrázek 3.** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z myší domácích (*Mus musculus*) (HZ206, HZ3093, HZ3094, HZ3095 a HZ3192) a hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) - TS03 s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku, vytvořený metodou neighbor-joining (1000× bootstrap). Znázorněny podpory větví více než 50 %.



Fylogenetická analýza sekvencí genu kódující aktin ukázala, že všechny testované izoláty z myši domácích (HZ206, HZ3093, HZ3094, HZ3095 a HZ3192) jsou identické jak mezi sebou navzájem, tak i se sekvencí *C. muris* uloženou v GenBank a získanou z myši domácí (*Mus musculus*, AF382350). Sekvence genu kódujícího aktin získaná z *C. muris* TS03 byla s výše uvedenými sekvencemi identická z 99,4 % (obrázek 4).

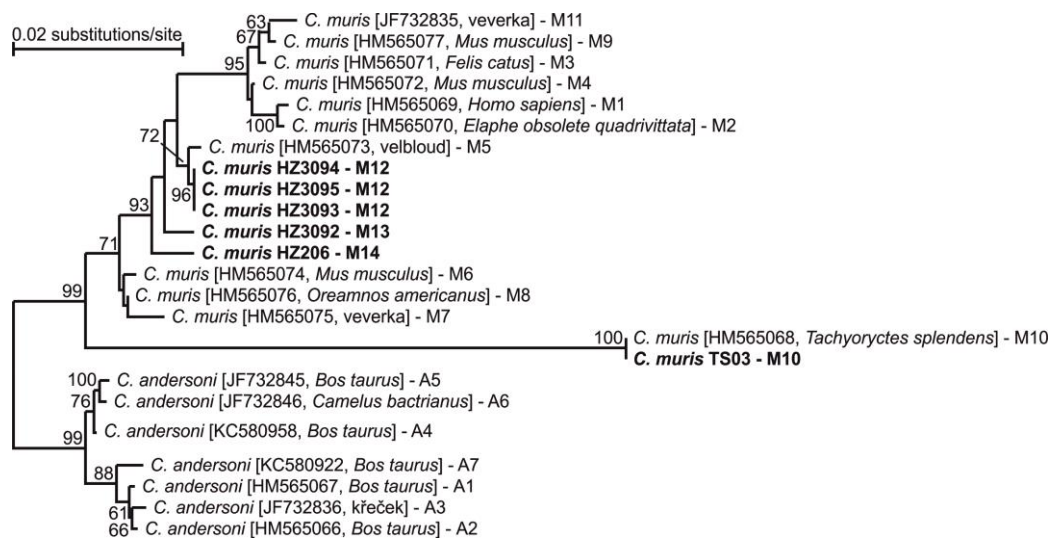
**Obrázek 4.** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z myši domácích (*Mus musculus*) (HZ206, HZ3093, HZ3094, HZ3095 a HZ3192) a hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) - TS03 s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího aktin, vytvořený metodou neighbor-joining. (1000× bootstrap). Znáznorněny podpory větví více než 50 %.



Fylogenetická analýza lokusů MS1, MS2, MS3 a MS16 prokázala vysoký polymorfismus v mikrosatelitních a minisatelitních sekvencích. V rámci analýzy sekvencí získaných z různých izolátů žaludečních kryptosporidií savců (*C. muris* a *C. andersoni*) byly identifikovány 3 skupiny s odlišným množstvím nukleotidových substitucí v neopakujícím se regionu. V každé skupině bylo detekováno různé množství mikrosatelitních a minisatelitních opakování.

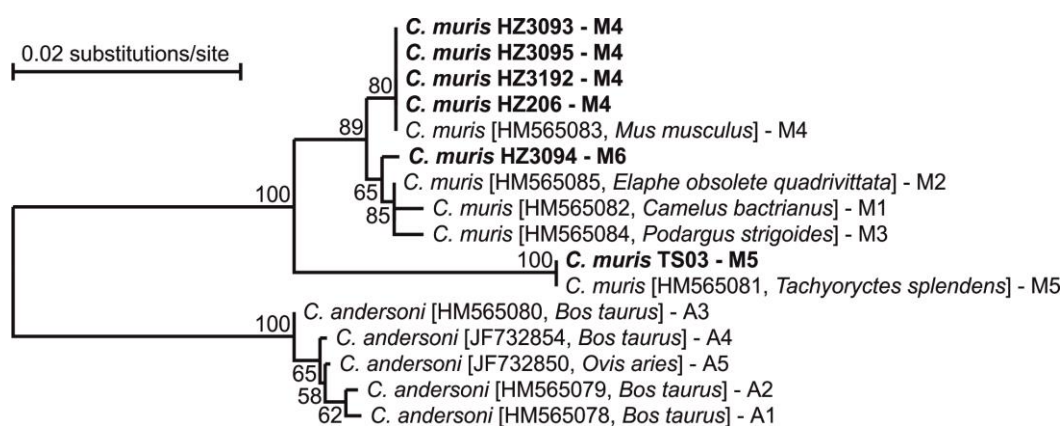
Všechny subtypy detekované v lokusu MS1 nebyly dosud nikdy popsány. Izoláty (HZ3093, HZ3094 a HZ3095) byly popsány jako nový subtyp M12 a izoláty HZ3092 a HZ206 jako subtypy M13 a M14. *Cryptosporidium muris* TS03 vytváří samostatnou fylogenetickou skupinu mezi izoláty *C. andersoni* a ostatními izoláty *C. muris* (obrázek 5).

**Obrázek 5.** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z myši domácích (*Mus musculus*) (HZ206, HZ3093, HZ3094, HZ3095 a HZ3192) a hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) - TS03 s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího MS1, vytvořený metodou neighbor-joining (1000× bootstrap). Znázorněny podpory větví více než 50 %.



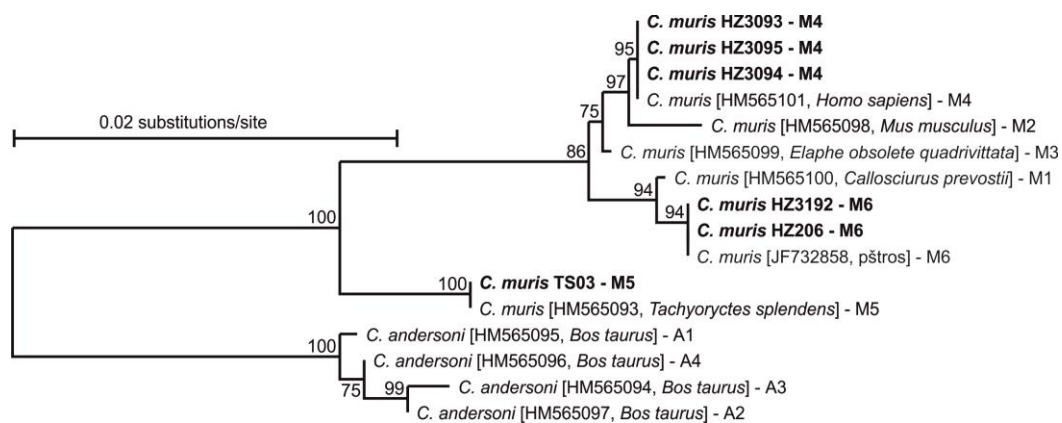
V rámci genu MS2 byly detekovány 3 subtypy *C. muris*. Izoláty z myší domácích (HZ206, HZ3093, HZ3095 a HZ3192) byly identické s již dříve popsáním subtypem M4 (HM565083). Izolát *C. muris* HZ3094 byl detekován jako nový subtyp M6. Sekvence *C. muris* TS03, byla identická se subtypem M5 (sekvence pocházející ze stejného izolátu charakterizovaná před 5 lety) a vytváří samostatnou skupinu v rámci žaludečních kryptosporidií (obrázek 6).

**Obrázek 6.** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z myší domácích (*Mus musculus*) (HZ206, HZ3093, HZ3094, HZ3095 a HZ3192) a hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) - TS03 s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího MS2, vytvořený metodou neighbor-joining (1000× bootstrap). Znázorněny podpory větví více než 50 %.



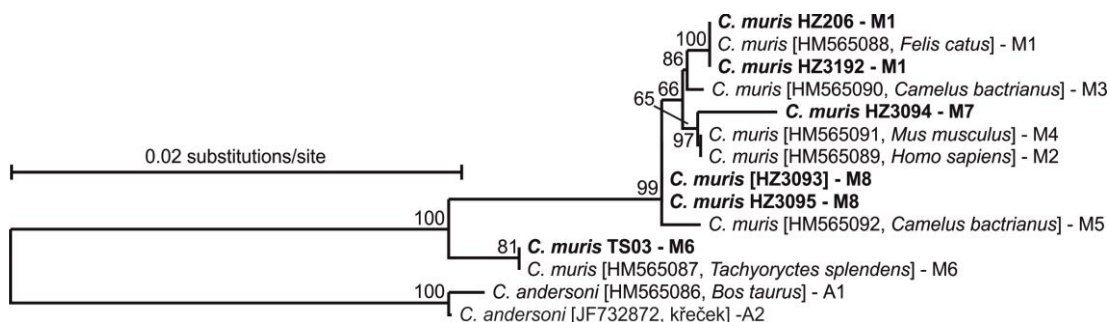
Analýza genu MS3 prokázala samostatnou fylogenetickou pozici *C. muris* TS03, který vytváří samostatný subtyp M5 (HM565093). Izoláty získané z myší domácích byly identické s již dříve popsányými subtypy M4 (HM565101) a M6 (JF732858), (obrázek 7).

**Obrázek 7.** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z myší domácích (*Mus musculus*) (HZ206, HZ3093, HZ3094, HZ3095 a HZ3192) a hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) - TS03 s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího MS3, vytvořený metodou neighbor-joining (1000× bootstrap). Znázorněny podpory větví více než 50 %.



Největší variability byla detekována v lokusu MS16, kde bylo detekováno 5 různých subtypů. Izoláty HZ206 a HZ3192 byly identické s již známým subtypem M1 (HM565088). *Cryptosporidium muris* HZ3094 bylo detekováno jako nový samostatný subtyp M7. Taktéž izoláty HZ3093 a HZ3095 byly identifikovány jako nový subtyp M8. Izolát *C. muris* TS03 byl identický se subtypem M6 (HM565087) a vytvářel samostatnou fylogenetickou skupinu mezi *C. andersoni* a *C. muris* (obrázek 8).

**Obrázek 8.** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z myši domácích (*Mus musculus*) (HZ206, HZ3093, HZ3094, HZ3095 a HZ3192) a hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) - TS03 s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího MS16, vytvořený metodou neighbor-joining (1000× bootstrap). Znázorněny podpory větví více než 50 %.

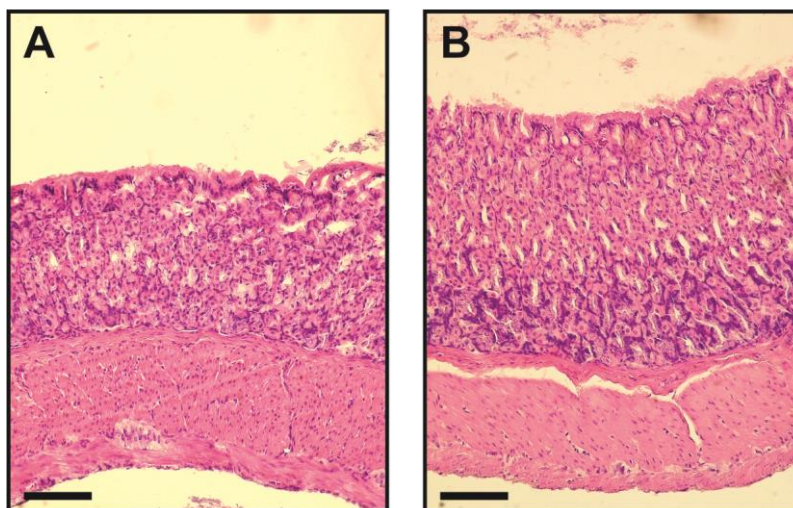


#### 5.4. HISTOPATOLOGICKÉ ZMĚNY NA SLIZNICI

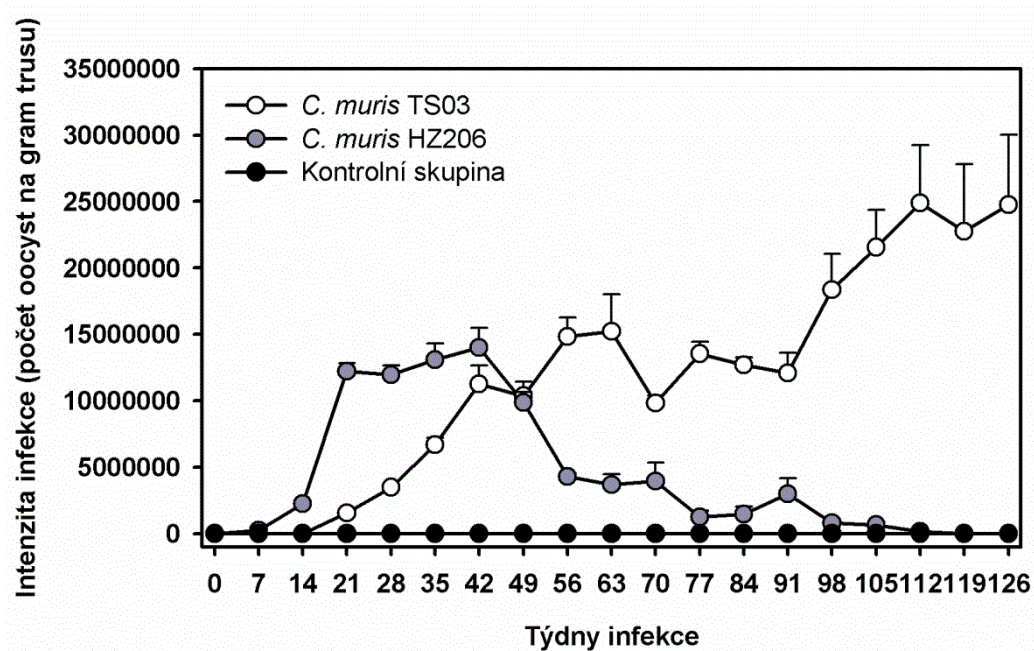
Histologické vyšetření žaludku kontrolních (neinfikovaných) zvířat neprokázalo u žádného zvířete přítomnost vývojových stádií *C. muris* ani v žláznaté, ani nežláznaté části žaludku. Slizniční epitel žaludku kontrolních zvířat byl klidný, pravidelný bez patologických změn, bez aktivace v žlázách s neparnou produkcí hlenu (obrázek 9). Vývojová stádia kryptosporidií byla nalezena pouze v žláznaté části žaludku a to jak u zvířat infikovaných *C. muris* TS03, tak *C. muris* HZ206. U zvířat obou skupin byla již po 1 měsíci po infekci zjištěna masivní infekce odpovídající množství vylučovaných oocyst v trusu (graf 1, obrázek 10). Histopatologické změny na žaludeční sliznici u zvířat infikovaných *C. muris* TS03 byly charakterizované výraznou dilatací žláz, epitel byl dlaždicovitě metaplazovaný.

Infikovaný žláznový epitel byl ve srovnání s epitelem kontrolních výrazně vyšší, místně proliferující do lumen žaludku a vytvářející papilární struktury. Makroskopicky byly na sliznici žaludku pozorovány papily často splývající v léze květákovitého tvaru (obrázek 11). V *lamina propria* infikovaného žláznového epitelu nebyly nalezeny žádné zánětlivé infiltráty. Sliznice zvířat infikovaných *C. muris* HZ206 byla v porovnání s infekcemi kmenem TS03 méně hyperplasmatická bez výrazného zesílení. Taktéž tvorba hlenu byla v porovnání s infekcemi vyvolanými kmenem TS03 výrazně nižší (téměř srovnatelná s kontrolní skupinou). Od 2. měsíce byl pozorován ústup infekce od spodních vrstev epitelu. Vývojová stádia kryptosporidií byla detekována pouze do 1/3 až 1/2 žláz. Od 4. měsíce nebyla pomocí histologických metod nalezena žádná vývojová stádia kryptosporidií u zvířat s infekcí *C. muris* HZ206. Od 2. měsíce po infekci byla na rozdíl od kontrolních zvířat a skupiny HZ206 zaznamenána u zvířat infikovaných kmenem TS03 zvýšená tvorba hlenu (obrázek 12).

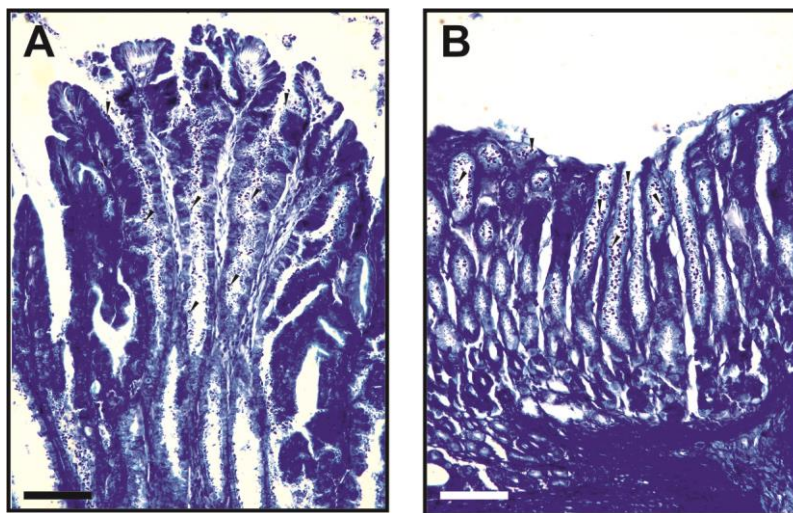
**Obrázek 9.** Histologický řez žaludeční sliznicí (žláznatá část) krysy malé (*Mastomys coucha*) ve věku **A**) 2 měsíců a **B**) 5 měsíců. Měřítko = 100  $\mu$ m.



**Graf 1.** Intenzita infekce *Cryptosporidium muris* TS03 a *Cryptosporidium muris* HZ206 oproti kontrolním zvířatům.

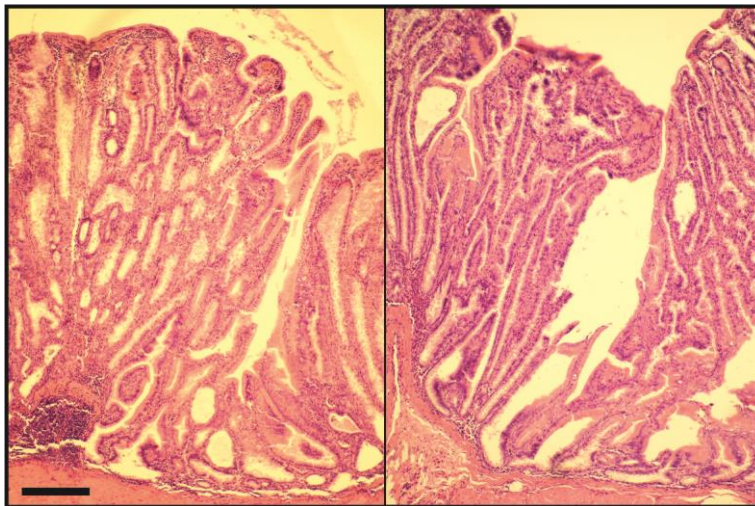


**Obrázek 10.** Histologický řez žaludeční sliznicí (žláznatá část) krysy malé (*Mastomys coucha*) infikované **A)** *Cryptosporidium muris* TS03 a **B)** *Cryptosporidium muris* HZ206. Vývojová stádia kryptosporidií (šipky) v žlázách; 2 měsíc po infekci; Wolbachova modifikace Giemsova barvení; měřítko = 100  $\mu$ m.

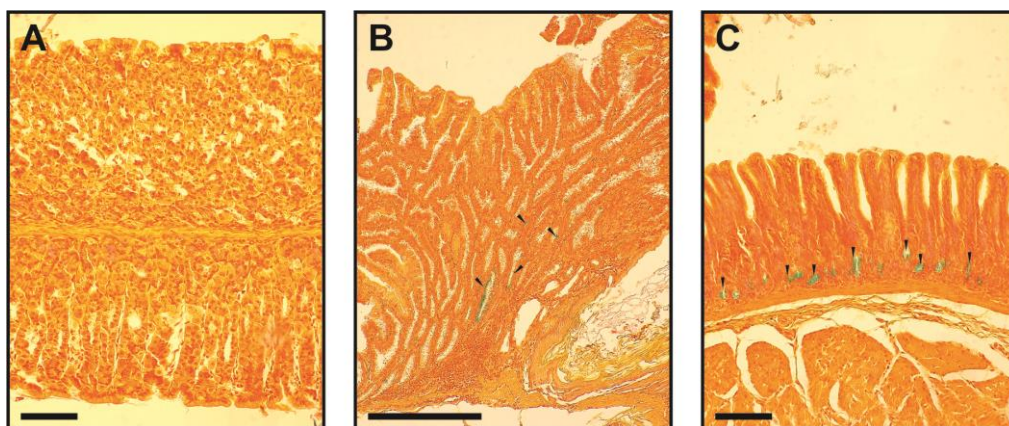




**Obrázek 11.** Histologické řezy žaludeční sliznicí (žláznatá část) krysy malé (*Mastomys coucha*) 5 měsíců po infekci. Proliferující epitel v lumen žaludku vytvářející papilární struktury. Měřítko = 20  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 12.** Histologický řez žaludeční sliznicí (žláznatá část) krysy malé (*Mastomys coucha*) - **A**) kontrolní skupina; **B**) infekce *Cryptosporidium muris* TS03 **C**) infekce *Cryptosporidium muris* HZ206. Barvení PAS – barvení hlenu (modrá barva, šipky); 1 měsíc po infekci; měřítko = 100  $\mu\text{m}$ .



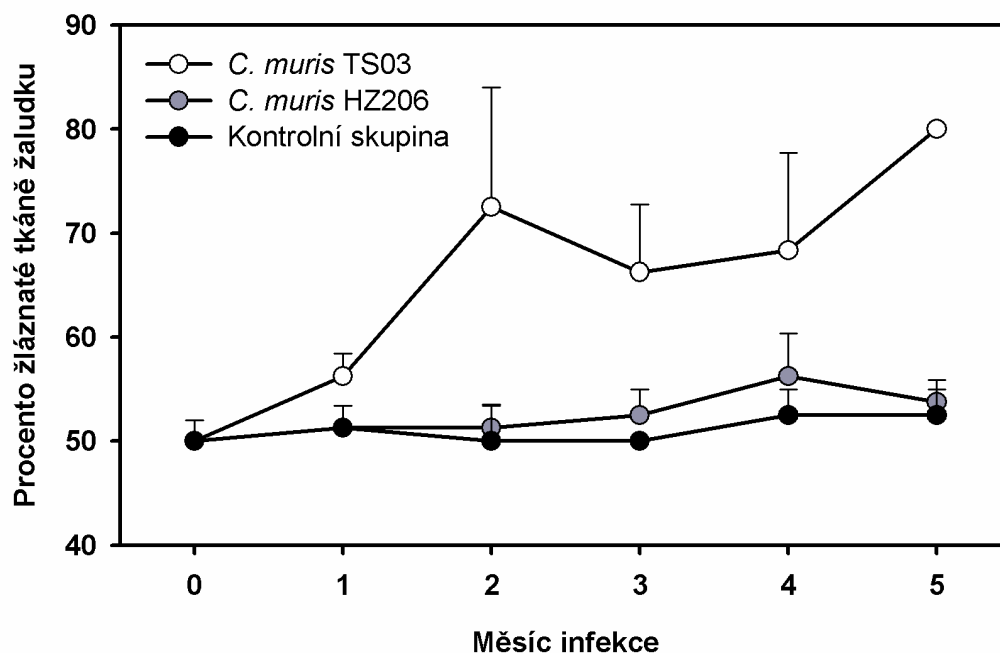
Pomocí analýzy obrazu histologických řezů žláznatého epitelu žaludků jak zdravých, tak i infikovaných krys nebyly zjištěny významné změny ve výšce podslizničního vaziva, svaloviny nebo pobřišnice, naopak výrazné změny byly zaznamenány ve výšce epitelu (tabulka 16). U krys malých infikovaných *C. muris* HZ206 bylo v prvním měsíci zaznamenáno výrazné zvýšení epitelu žláznaté části žaludku o 270 % oproti kontrole s následným pozvolným snižováním výšky epitelu sliznice dosahující 150 – 220 % ve srovnání s kontrolní skupinou od 3. měsíce po infekci. Naproti tomu u zvířat s infekcí vyvolanou *C. muris* TS03 bylo pozorováno pozvolné zvětšování epitelu sliznice s maximálním nárůstem v 5. měsíci po infekci dosahující 650 % oproti kontrole (graf 2).

**Tabulka 16.** Morfometrické parametry jednotlivých částí žláznaté sliznice žaludku krysy malé (*Mastomys coucha*) v závislosti na věku a infekci vyvolané *Cryptosporidium muris* TS03 nebo *Cryptosporidium muris* HZ206.

MĚSÍC PO INFEKCI	VÝŠKA ČÁSTÍ ŽLÁZNATÉ SLIZNICE ŽALUDKU (µm)											
	KONTROLA				<i>C. muris</i> HZ206				<i>C. muris</i> TS03			
	EP	PV	S	P	EP	PV	S	P	EP	PV	S	P
0	251,6	148,0	18,9	44,9	251,3	148,0	18,9	44,9	251,6	148,0	18,9	44,9
1	276,5	139,7	15,6	36,4	746,4	128,9	21,5	32,3	438,7	173,0	20,1	29,3
2	283,6	133,6	13,9	32,8	454,6	271,9	20,2	31,6	899,5	152,2	21,3	46,3
3	315,8	145,3	20,6	41,6	482,5	180,8	23,2	46,1	1154,5	147,0	23,2	38,7
4	305,6	141,9	25,7	53,9	674,9	187,1	22,5	44,8	1277,3	132,4	22,1	24,9
5	284,9	130,4	14,4	36,0	513,5	175,1	22,7	43,9	1870,5	189,3	48,6	71,0
6	329,2	105,8	15,8	32,3	627,5	174,7	27,2	60,9	1997,7	213,2	26,0	35,3

EP – epitel; PV – podslizniční vazivo; S – svalovina; P – pobřišnice

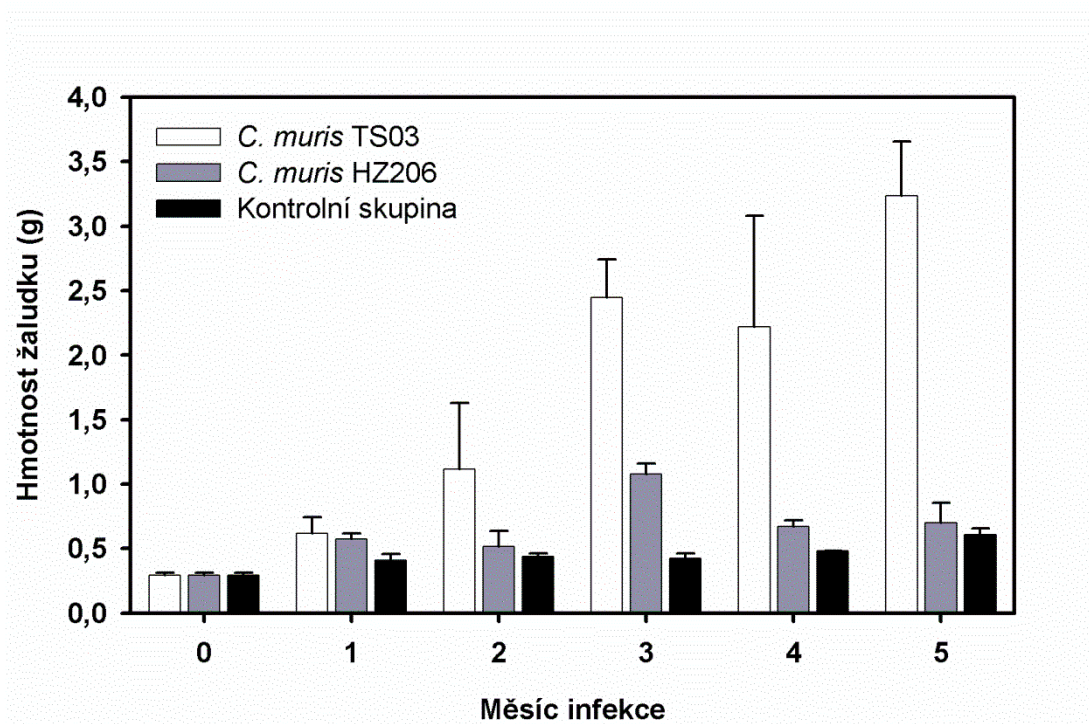
**Graf 2.** Procentuální zvětšení epitelu sliznice žláznaté části žaludku krysy malé (*Mastomys coucha*) v závislosti na věku a infekci vyvolané *Cryptosporidium muris* TS03 nebo *Cryptosporidium muris* HZ206 oproti kontrolním zvířatům.



### 5.5. KONVERZE KRMIVA A HMOTNOST ŽALUDKU

Statistická analýza neprokázala vliv infekce na celkovou spotřebu krmiva ( $p > 0,05$ ), nicméně krysy malé infikované *C. muris* TS03 spotřebovaly nejméně krmiva na 1 g přírůstku živé hmotnosti (tabulka 17). Hmotnost žaludku všech sledovaných skupin se zvyšovala v průběhu experimentu. Zatímco u kontrolní skupiny došlo jen k nepatrnému zvětšení hmotnosti v důsledku růstu zvířat (fyziologická změna), u zvířat infikovaných *C. muris* TS03 bylo již od 1. měsíce po infekci zaznamenáno zvýšení hmotnosti žaludku, která dosáhla maximální průměrné hodnoty 1,65 g na konci sledování (graf 3). U zvířat infikovaných *C. muris* HZ206 bylo pozorováno nepatrné zvětšení hmotnosti do 3. měsíce po infekci s následným poklesem na téměř fyziologickou hodnotu (graf 3).

**Graf 3.** Hmotnost žaludku v průběhu infekce krys malých (*Mastomys coucha*) *Cryptosporidium muris* TS03 a *Cryptosporidium muris* HZ206 oproti kontrolní skupině.



**Tabulka 17.** Průměrná spotřeba krmiva a hmotnost krys malé (*Mastomys coucha*) v průběhu infekce *Cryptosporidium muris* TS03 a *Cryptosporidium muris* HZ206 oproti kontrolním zvířatům.

SKUPINA	POHLAVÍ	POČÁTEČNÍ HMOTNOST (g)	KONEČNÁ HMOTNOST (g)	CELKOVÁ SPOŘEBA KRMIVA (g)	PRŮMĚRNÁ SPOTŘEBA KRMIVA NA 1 GRAM PŘÍRŮSTKU (g)
Kontrolní skupina	Samci	46,1 ± 2,9	66,3 ± 1,45	960,6 ± 10,7	47,6
	Samice	40,3 ± 1,1	60,6 ± 2,1	911,9 ± 45,3	44,9
<i>C. muris</i> TS03	Samci	37,2 ± 2,0	64,3 ± 4,8	931,4 ± 42,9	34,4
	Samice	36,9 ± 5,6	65,5 ± 7,8	949,5 ± 60,8	33,2
<i>C. muris</i> HZ206	Samci	43,5 ± 2,9	76,9 ± 10,1	953,4 ± 169,8	28,5
	Samice	37,3 ± 2,5	71,8 ± 15,3	1052,2 ± 85,5	30,5

## 6. DISKUZE

V rámci rodu *Cryptosporidium* lze na základě tvaru a velikosti oocyst rozlišit dva morfotypy oocyst (Kváč et al. 2014, Upton et Curent 1985; Vítovec et al. 2006), přičemž uvnitř jednotlivých skupin je podobnost mezi velikostí a tvarem oocyst velmi podobná a rutinním vyšetřením trusu jsou oocysty jednotlivých druhů/genotypů obtížně odlišitelné. Žaludeční kryptosporidie vytvářejí oválné oocysty o velikosti okolo 7 – 10  $\mu\text{m}$ . Do současné doby byla popsána morfometrie více než 30 izolátů žaludečních kryptosporidií (Ryan et Xiao 2014). Morfologické studie uvádí velikost plně vysporulovaných oocyst *C. muris* v rozmezí 6,2 – 9,8  $\times$  5,0 – 7,0  $\mu\text{m}$  (Chalmers et al. 1994, 1997; Iseki 1986), zatímco u *C. andersoni* v rozmezí 6,2 – 10,5  $\times$  4,6 – 8,0  $\mu\text{m}$  (Wang et al. 2008). V rámci obou dvou žaludečních druhů lze pozorovat vysokou variabilitu ve velikosti oocyst, která může být způsobena buď různou technikou měření, nebo existencí skrytých druhů v rámci *C. muris* a *C. andersoni* (Feng et al. 2011; Kváč et al. 2008). Tento předpoklad potvrzují výsledky Kváče et al. (2013a), kteří pomocí experimentálních infekcí prokázali, že velikost oocyst je charakteristická vlastnost druhu a není závislá na typu hostitele. Oocysty *C. muris* TS03 jsou při rutinní diagnostice neodlišitelné od oocyst *C. muris* HZ206. Následné detailní morfometrické analýzy však prokázaly, že oocysty *C. muris* TS03 jsou v porovnání *C. muris* HZ206 více protáhlé s indexem tvaru 1,48. Obdobně byla nedávno popsána morfologická odlišnost oocyst u dvou fylogeneticky příbuzných druhů, *C. parvum* a *C. erinacei*. Stejně jako v našem případě, nelze oocysty obou zmíněných střevních kryptosporidií od sebe rozlišit při rutinním vyšetření, nicméně oocysty *C. erinacei* jsou mírně protáhlejšího tvaru (Kváč et al. 2014). Výsledky naší morfometrické studie podporují naši hypotézu, že *C. muris* TS03 je samostatným druhem.

*In vitro* studie prokázaly, že jak střevní, tak žaludeční kryptosporidie jsou schopny téměř dokončit svůj vývojový cyklus během 3 dnů (Current et Haynes 1984; Hijjawi et al. 2002, 2004; Smith et al. 2005). Na základě jak experimentálních, tak epidemiologických studií bylo prokázáno, že prepatentní doba střevních kryptosporidií se pohybuje v rozmezí 2 – 4 dnů (Enemark et al. 2003; Iseki 1979; Kváč et al. 2013, 2014; Tzipori 1983). Na rozdíl od střevních kryptosporidií jsou oocysty žaludečních druhů kryptosporidií vylučovány z těla infikovaného hostitele až po více než 1 týdně a déle po infekci. V souladu s výsledky

Matsui et al. (1999), Taylor et al. (1999) a Satoh et al. (2003) jsme popsali 7 denní prepatentní periodu u krys malých infikovaných kmenem *C. muris* HZ206. Naopak krysy malé infikované *C. muris* TS03 začaly vylučovat oocysty až po 18 – 21 DPI, což plně odpovídá dříve publikovaným údajům (Kváč et al. 2008; Melicherová et al. 2014). Vzhledem k tomu, že délka prepatentní periody je závislá na druhu hostitele a druhu parazita a nezávislá na velikosti infekční dávky (Rhee et al. 1995; Zambriski et al. 2013), byly prokázány odlišné biologické vlastnosti sledovaných izolátů *C. muris*. Na druhou stranu, u 21 dní starých myší kmene ICR byla při dávce 2,4 milionu oocyst *C. muris* RN66 pozorována prepatentní perioda v délce 6 dnů a 21 dnů při 100 000 krát nižší dávce (Matsui et al. 2001). Taktéž byly zjištěny výrazné rozdíly v délce patentní periody. Zatímco krysy malé infikované HZ206 se shodně s ostatními studii (Matsui et al. 1999; Rhee et al. 1999; Satoh et al. 2003), ve kterých bylo k infekci různých druhů hlodavců použito izolátů *C. muris* pocházejících tak, jako v našem případě z myší, v průběhu experimentů vyléčily, u krys malých infikovaných *C. muris* TS03 byla pozorována chronická infekce. Tyto výsledky jsou ve shodě s dříve publikovanými pracemi Kváče (2008). Taktéž nebyl zjištěn vliv věku na délku prepatentní a patentní periody u zvířat infikovaných *C. muris* TS03 (Kváč et al. 2008b).

Kryptosporidie jsou obecně považovány za patogeny způsobující vodnaté, nekrvavé průjemové onemocnění svých hostitelů, ale epidemiologické studie ukazují, že klinické příznaky kryptosporidiózy jsou závislé na druhu parazita a druhu hostitele (Ryan et Xiao 2014). Na rozdíl od *C. parvum* nebo *C. hominis*, jež jsou velmi často původci klinické kryptosporidiózy, není u většiny infekcí vyvolaných ostatními střevními a zejména pak žaludečními kryptosporidii pozorován žádný průjem (Argenzio et al. 1990; Ebeid et al. 2003; Kváč et al. 2014; Moon et Bemrick 1981; Němejc et al. 2013; Tzipori et al. 1980, 1983; Vítovec et Koudela 1992). Taktéž v rámci našeho sledování jsme v průběhu experimentů nepozorovali žádné průjemové onemocnění ani jiné klinické příznaky spojené se žaludeční kryptosporidiózou. V minulosti byly popsány případy poklesu produkce dojníc a ztráta kondice až do stádia anorexie u antilop v důsledku žaludeční kryptosporidiózy způsobené *C. andersoni*, respektive *C. muris* (Anderson 1998; Esteban et Anderson 1995; Pospischil et al. 1987). Přestože krysy malé infikované TS03 vykazovaly nižší přírůstek, neprokázali jsme vliv infekce na denní přírůstek

a konverzi živin v závislosti na infekci. Anderson (1998) popsal vliv chronické infekce *C. andersoni* u skotu na morfologické změny abomasu a zaznamenal trojnásobné zvýšení hmotnosti infikované části slezu oproti slezu neinfikovaných zvířat. Až do této doby nebyl obdobný nález publikován. V souladu se zjištěním Andersona jsme popsali šestinásobné zvětšení infikované sliznice žaludku při chronické kryptosporidióze vyvolané *C. muris* TS03.

U žaludečních kryptosporidióz savců nejsou ve většině případů detekovány ani makroskopické, ani mikroskopické změny, zejména pak nejsou přítomny zánětlivé infiltráty v *lamina propria* žaludeční sliznice (Anderson 1987; Iseki et al. 1989; Kváč et Vítovec 2003; Masuno et kol. 2006; Özkul et Audin 1994; Tytzer 1910a). Charakteristickými histopatologickými změnami u infikovaných zvířat jsou dilatované žaludeční žlázy a nepatrné nahromadění lymfatických buněk, bez významného akutního zánětu. Zejména výskyt eosinofilů v *lamina propria* infikovaných oblastí je nápadně malý (Kváč et Vítovec 2003). Nezánětlivé histopatologické změny sliznice při žaludeční kryptosporidióze způsobené *C. muris* TS03 a HZ206 zahrnovaly hyperplazii, hypertrofii, atrofii a metaplazii žláзовého epitelu, s velmi mírnou aktivací hlenových buněk v oblasti dilatovaných infikovaných žláz a plně odpovídaly dříve publikovaným výsledkům (Anderson 1987; Dubey et al. 2002; Kváč et Vítovec 2003, Kváč et al. 2008c; Özkul et Aydin 1994; Pospischil et al. 1987; Taylor et al. 1999). Jalovecká (2010) se zabývala vývojem imunitní odpovědi hostitele na infekci žaludečními kryptosporidiiemi a popsala, že dochází k výraznému zvýšení migrace leukocytů do žaludeční tkáně v druhé polovině patentní periody, což má za následek vyléčení hostitele. U zvířat infikovaných *C. muris* HZ206 jsme v období tzv. samovyléčení nepozorovali žádný nárůst infiltrátů jako například Kváč et al. (2013). V ojedinělých případech byly popsány zánětlivé infiltráty v *lamina propria*, také při vysokých infekčních dávkách nebo při smíšených infekcích s jinými patogeny (Dubey et al. 2002; Masuno et al. 2006; Taylor et al. 1999).

Z naší studie vyplývá, že fylogenetické analýzy založené na SSU, aktinu, MS1, MS2 MS3 a MS16 genech ukázaly, že v rámci *C. muris* existují dvě fylogeneticky odlišné skupiny. Zatímco námi získané izoláty z myši domácích jsou identické jak v rámci SSU, tak i genu kódujícího aktin s ostatními kmeny a izoláty *C. muris*, izolát *C. muris* TS03 vytváří samostatnou fylogenetickou skupinu. Podobnost mezi SSU *C. muris* TS03 s typovým kmenem *C. muris* RN66 je 99,4 %, což je shodné

jako podobnost mezi *C. parvum* a *C. hominis* a méně než podobnost mezi jednotlivými izoláty *C. andersoni* (99,8 – 100 %). V rámci lokusu pro aktin je *C. muris* TS03 shodná s *C. muris* RN66 z 99,4 %. Pro srovnání, podobnost *C. parvum* s *C. hominis* je 98,7 % a s *C. eriancei* 99,5 %. Většina izolátů *C. muris* měla identické sekvence a lišila se pouze v množství kopií mikrosatelitů a minisatelitů. Podobný případ všech zmíněných analýz, vyjímaje SSU a aktin, nastínil Feng et al. (2011) u izolátu *C. muris* TS03, který pocházel z hlodouna východoafrického a od ostatních izolátů *C. muris* se lišil i v nepatrných genetických rozdílech mezi *C. muris* a *C. andersoni*. Kryptosporidie s identickými sekvencemi, které byly získány z izolátu *C. muris* TS03 pocházejícího taktéž z hlodouna východoafrického byla již dříve nalezena u veverek šedých v New Yorku (Feng et al. 2007). Zdá se, že by tato kryptosporidie mohla být pravděpodobně celosvětově rozšířená. Lze podotknout, že izolát získaný z hlodouna východoafrického je molekulárně odlišný od ostatních kmenů a izolátů *C. muris*.



## 7. ZÁVĚR

- Bylo prokázáno, že oocysty jednotlivých izolátů se od sebe morfometricky liší.
- Na rozdíl od krys malých infikovaných *C. muris* HZ206, nedošlo u krys malých infikovaných *C. muris* TS03 k vyléčení.
- Žádný z testovaných izolátů nevyvolal klinické příznaky onemocnění.
- Sliznice žaludku zvířat infikovaných *C. muris* HZ206 byla méně hyperplasmatická bez výrazného zesílení, s vyšší tvorbou hlenu.
- U zvířat s infekcí *C. muris* TS03 bylo pozorováno abnormální zvětšení žláznaté tkáně žaludku.
- Byl pozorován vliv infekce na spotřebu krmiva a přírůstek živé hmotnosti.
- Fylogenetické analýzy prokázaly samostatnou fylogenetickou pozici *C. muris* TS03 v rámci žaludečních kryptosporidií.
- Byly popsány nové subtypy MS genů u izolátů *C. muris* získaných z myši domácích.

Závěrem lze konstatovat, že morfologická a morfometrická data oocyst, nukleotidové sekvence, fylogenetické analýzy a biologické charakteristiky izolátu *C. muris* TS03 jednoznačně ukazují jeho biologickou, genetickou a taxonomickou odlišnost jak od ostatních izolátů *C. muris*, tak od ostatních druhů rodu *Cryptosporidium*. Na základě těchto údajů si dovoluujeme tvrdit, že *C. muris* TS03 by mělo být dle platných pravidel pro popis druhů rodu *Cryptosporidium* popsáno jako samostatný druh.

## 8. LITERATURA

- ABRAHAMSEN M. S., LANCTO C. A., WALCHECK B., LYATON W., JUTILA M. A. 1997. Localization of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes in *Cryptosporidium parvum* infected tissues in naive and immune calves. *Infect. Immun.* 65: 2428–2433.
- ALVAREZ-PELLITERO P., QUIROGA M. I., SITJA-BOBADILLA A., REDONDO M. J., PALENZUELA O., PADRÓS F., VÁZQUEZ S., NIETO J. M. 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. Aquat. Org.* 62: 133–145.
- 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. *Int. J. Parasitol.* 32: 1007–1021.
- ANDERSON B. C. 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.* 24: 235–238.
- ANDERSON B. C. 1991. Experimental infection in mice of *Cryptosporidium muris* isolated from a camel. *J. Protozool.* 38: 16–17.
- ANDERSON B. C. 1998. Cryptosporidiosis in bióvine and huan health. *J. Dairy Sci.* 81: 3036–3041.
- ARCAY L., BRUZAL E. 1993. *Cryptosporidium* en ríos de Venezuela: encuesta epidemiológica de una población humana y fauna en convivencia. *Parasitología al día.* 17: 11–18.
- ARGENZIO R. A., LIACOS J. A., LEVY M. L., MEUTEN D. J., LECCE J. G., POWELL D. W. 1990. Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular infiltration, and impaired glucose-Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. *Gastroenterology* 98: 1129–1140.
- AYDIN Y., ÖZKUL I. A. 1996. Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Vet. Parasitol.* 66: 257–262.

- BEDNÁRSKÁ M., BEJER A., KULIS K., SIŃSKI E. 2003. Biological characterisation of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10: 163–169.
- BEDNÁRSKÁ M., BEJER A., SIŃSKI E., GIOURARDA S., TAMANG L., GRACZYK T. K. 2007. Fluorescent in situ hybridization as a tool to retrospectively identify *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in samples from terrestrial mammalian wildlife. *Parasitol. Res.* 100: 455–460.
- BETANCOURT W. Q., ROSE J. B., 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.* 126: 219–234.
- BOHER Y., PEREZ-SCHAEEL I., CACERES-DITTMAR G., URBINA G., GONZALEZ R., KRAAL G., TAPIA F. J. 1994. Enumeration of selected leukocytes in the small intestine of BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 145–151.
- BULL S., CHALMERS R., STURDEE A. P., CURRY A., KENNAUGH J. 1998. Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Vet. Parasitol.* 77: 195–197.
- CACCIO S., PINTER E., FANTINI R., MEZZAROMA I., POZIO E. 2002. Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 85–86.
- CARRENO R. A., MARTIN D. S., BARTA J. R. 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85: 899–904.
- CASEMORE D. P., SANDS R. L., CURRY A. 1985. *Cryptosporidium* species a "new" human pathogen. *J. Clin. Pathol.* 38: 1321–1336.
- CHALMERS R. M., STURDEE A. P., BULL S. A., MILLER A., WRIGHT S. E. 1997. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol. Res.* 83: 478–482.

- CHALMERS R.M., STURDEE A.P., CASEMORE D.P., CURRY A., MILLER A., PARKER N.D., RICHMOND T.M. 1994. *Cryptosporidium muris* in wild house mice (*Mus musculus*): first report in the UK. Eur. J. Protistol. 30: 151–155.
- CHAPPELL C. L., OKHUYSEN P. C., STERKUNG C. R., WANG C., JAKUBOWSKI W., DUPONT H. L. 1999. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with preexisting anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60: 157–164.
- CORLISS J. O. 1994. An interim utilitarian (“user friendly”) hierarchical classification and characterization of the protist. Acta Protozool. 33: 1–51.
- CRAWSHAW G. J., MEHREN K. G. 1987. Cryptosporidiosis in ZOO and wild animals. In Ippen R., Schröder H. D. (Eds.): Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsbericht des 29. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zootiere vom 20. Mai bis 24. Mai 1987 in Cardiff. Akademie-Verlag, Berlin. pp. 353–362.
- CURRENT W. L. 1988. The biology of *Cryptosporidium*. Am. Soc. Microbiol. News. 54: 605–611.
- CURRENT W. L., GARCIA L. S. 1991. Cryptosporidiosis. Clin. Microbiol. Rev. 4: 325–358.
- CURRENT W. L., HAYNES T. B. 1984. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. Science 224: 603–605.
- CURRENT W. L., UPTON S. J., HAYNES T. B. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. J. Protozool. 33: 289–296.
- DENG M. Q., CLIVER D. O. 1999. Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals. Parasitol. Res. 85: 733–736.
- DITRICH O., PALKOVIC L., STERBA J., PROKOPIC J., LOUDOVA J., GIBODA M. 1991. The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. Parasitol. Res. 77: 44–47.

- DOLEJŠ P. 2004. *Cryptosporidium* a *Giardia*: přehled vodárenské problematiky za první desetiletí po událostech Milwaukee (USA). *Vodní hospodářství* 54: 271–273.
- DUBEY J. P., MARKOVITS J. E., KILLARY K. A. 2002. *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet. Pathol.* 39: 363–371.
- EBEID M., MATHIS A., POSPISCHIL A., DEPLAZES P. 2003. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* genotype I in conventionally reared piglets and lambs. *Parasitol. Res.* 90: 232–235.
- ELWIN K., HADFIELD S. J., ROBINSON G., CROUCH N. D., CHALMERS R. M. 2012. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. *Int. J. Parasitol.* 42: 675–682.
- ENEMARK H. L., AHRENS P., BILLE-HANSEN V., HEEGAARD P. M., VIGRE H., THAMSBORG S. M., LIND P., 2003. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the 'porcine' genotype. *Parasitology* 126: 407–416.
- ESTEBAN E., ANDERSON B.C. 1995. *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *J. Dairy Sci.* 78: 1068–1072.
- FAYER R. 2003. *Cryptosporidium*: From molekules to disease. In Thompson R. C. A., Armson A., Ryan U. M., (Eds.): *Cryptosporidium*: From moleculs to disease. Elsevier. pp. 11–18.
- FAYER R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126: 37–56.
- FAYER R. 2007. General biology. In Fayer R., Xiao L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Second edition, CRC Press, FL, pp. 1–42.
- FAYER R., PHILLIPS L., ANDERSON B. C., BUSH M. 1991. Chronic cryptosporidiosis in a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 22: 228–232.
- FAYER R., SANTÍN M. 2009. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 164: 192–200.

- FAYER R., SANTÍN M., MACARISIN D. 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. In animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172: 23–32.
- FAYER R., SANTÍN M., XIAO L. 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91: 624–629.
- FAYER R., SPEER C. A., DUBEY J. P. 1997a. The general biology of *Cryptosporidium*. In: R. Fayer (Ed.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC press, Boca. Raton. 1–42.
- FAYER R., SPEER C. A., DUBEY J. P. 1997b. The general biology of *Cryptosporidium*. In: R. Fayer (Ed.) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 2–33.
- FAYER R., TROUT J. M., JENKINS M. C. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 84: 1165–1169.
- FAYER R., TROUT J. M., XIAO L., MORGAN U., LAL A. A., DUBEY J. P. 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87: 1415–1422.
- FAYER R., XIAO L. 2008. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2. vyd. IWA Pub. 560.
- FENG Y. 2008. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp. Parasitol.* 124: 128–137.
- FENG Y., ALDERISIO K. A., YANG W., BLANCERO L. A., KUHNE W. G., NADARESKI C. A., REID M., XIAO L. 2007. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6475–6483.
- 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*. *J. Clin. Microbiol.* 49: 34–41.
- FLANIGAN T., WHALEN C., TURNER J., SOAVE R., TOERNER J., HAVLIR D., KOTLER D. 1992. *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Am. Intern. Med.* 116: 840–842.

- GATEI W., ASHFORD R. W., BEECHING N. J., KAWATI S. K., GREENSIL J., HART C. A. 2002. *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 204–206.
- GOEBEL E., BRAENDLER Z. 1982. Ultrastructure of microgametogenesis, mikrogametes and gametogamy of *Cryptosporidium* sp. in the small intestine of mice. *Protistologica* 18: 331–344.
- GRACZYK T. K. 2008. Fish amphibians, and reptiles. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.): *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Second edition. CRC Press. Boca Raton. p. 389–394.
- GREEN S. L., BOULEY D. M., JOSLING C. A., FAYER R. 2003. Cryptosporidiosis associated with emaciation and proliferative gastritis in a laboratory-reared South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comp. Med.* 53: 81–84.
- GUK S. M., YONG T. S., PARK S. J., PARK J. H., CHAI J. Y. 2004. Genotype and animal infectivity of human isolate of *Cryptosporidium parvum* in the Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* 42: 85–89.
- GUYOT K., FOLLET-DUMMOULI N., LELIÉVRE E., SARFATI C., RABODONIRIANA M., NEVEZ G., CAILLIEZ J. C., CAMUS D., DEI-CAS E. 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3472–3480.
- HIJAWI N. S., MELONI B. P., NG'ANZO M., RYAN U. M., OLSON M. E., COX P. T., MONIS P. T., THOMPSON R. C. A. 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int. J. Parasitol.* 34: 769–777.
- HIJAWI 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*. *Int. J. Parasitol.* 32: 1719–1726.
- HOMMER V., EICHHOLZ J., PETRY F. 2003. Effect of antiretroviral protease inhibitor alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 359–364.

- HOOVER D. M., HOERR F. J., CARLTON W. W., HINSMAN E. J. AND FERGUSON H. W. 1981. Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus* Bloch and Schneider. *J. Fish Dis.* 4: 425–428.
- HOUPT E. R., BUSHEN O. Y., SAM N. E., KOHLI A., ASGHARPOUR A., NG C. T., CALFEE D. P. GUERRANT R. L., MARO V., OLE-NGUYAINE S., SHAO J. F. 2005. Short report: Asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73: 520–522.
- HŮRKOVÁ L., HAJDUŠEK O., MODRÝ D. 2003. Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. *J. Wildl. Dis.* 9: 441–444.
- ISEKI M. 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn. J. Parasitol.* 28: 285–307.
- ISEKI M. 1986. Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Parasitol.* 35: 521–526.
- ISEKI M., MAEKAWA T., MORIYA K., UNI S., TAKADA S. 1989. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75: 218–222.
- JALOVECKÁ M., SAK B., KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., KUČEROVÁ Z., SALÁT J. 2010. Activation of protective cell-mediated immune response in gastric mucosa during *Cryptosporidium muris* infection and re-infection in immunocompetent mice. *Parasitol. Res.* 106: 1159–1166.
- JIANG J., ALDERISIO K. A., XIAO L. 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 446–454.
- 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 Parasitol.* 55: 81–94.



- KATSUMATA T., HOSEA D., RANUH I. G., UGA S., YANAGI T., KOHNO S. 2000. Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in huans. Am. J. Med. Hyg. 62: 70–72.
- KIMURA M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111–120.
- KODÁDKOVÁ A. 2007. Žaludeční kryptosporidie exotických zvířat v ZOO. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta, 27 pp.
- KODÁDKOVÁ A., KVÁČ M., DITRICH O., SAK B., XIAO L. 2010. *Cryptosporidium muris* in a reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). J. Parasitol. 96: 211–212.
- KOUDELA B., MODRÝ D., VÍTOVEC J. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. Vet. Parasitol. 76: 181–188.
- KVÁČ M. 2008. Žaludeční kryptosporidie a kryptosporidióza saveců. Habilitační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 60 pp.
- KVÁČ M., HOFMANNOVÁ L., HLÁSKOVÁ L., KVĚTOŇOVÁ D., VÍTOVEC J., MCEVOY J., SAK B. 2014. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. Vet. Parasitol. 201: 9–17.
- KVÁČ M., KESTŘÁNOVÁ M., PINKOVÁ M., KVĚTOŇOVÁ D., KALINOVÁ J., WAGNEROVÁ P., KOTKOVÁ M., VÍTOVEC J., DITRICH O., MCEVOY J., STENGER B., SAK B. 2013a. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). Vet. Parasitol. 31: 218–227.
- KVÁČ M., MCEVOY J., LOUDOVÁ M., STENGER B., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., DITRICH O., RAŠKOVÁ V., MORIARTY E., ROST M., MACHOLÁN M., PIÁLEK J. 2013. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). Int. J. Parasitol. 43: 805–817.
- KVÁČ M., ONDRÁČKOVÁ Z., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B., VÍTOVEC J. 2007. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). Vet. Parasitol. 143: 229–233.

- KVÁČ M., SAK B., KVĚTONOVÁ D., DITRICH O., HOFMANNOVÁ L., MODRÝ D., VÍTOVEC J., XIAO L. 2008b. Infectivity pathogenicity and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Vet. Parasitol.* 153: 363–367.
- KVÁČ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., DITRICH O., HOFMANNOVÁ L., MODRÝ D., VÍTOVEC J., XIAO L., 2008a. Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Vet. Parasitol.* 153: 220–224.
- KVÁČ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., SECOR W. E. 2009. Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet. Parasitol.* 163: 33–38.
- KVÁČ M., SAK B., SALÁT J., KVĚTOŇOVÁ D. 2008c. The role CD8+ T-lymphocytes during gastric *Cryptosporidium muris* strain TS03 infection in mice. abstract PO65. X International workshops on opportunistic protists (IWOP-10), Boston, Massachusetts, USA, pp. 90–91.
- KVÁČ M., VÍTOVEC J. 2003. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med. B* 50: 451–457.
- LASSER K. H., LEWIN K. J., RYNING F. W. 1979. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Hum. Pathol.* 10: 234–240.
- LAURENT F., ECKMANN L., SAVIDGE T. C., MORGAN G., THEODOS C., NACIRI M., KAGNOFF M. F. 1997. *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces polarized secretion of CX-C chemokines. *Infect. Immun.* 65: 5067–5073.
- LEONI F., AMAR C., NICHOLS G., PEDRAZZA-DIAZ S., MCLAUCHLIN J. 2006. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.* 55: 703–707.
- LEVINE N. D. 1984. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *J. Protozool.* 31: 94–98.

- LEVINE N. D., CORLISS J. O., COX F. E., DEROUX G., GRAIN J., HONIGBERG B. M., LEEDALE G. F., LOEBLICH A. R. 3RD, LOM J., LYNN D., MERINFELD E. G., PAGE F. C., POLJANSKY G., SPRAGUE V., VAVRA J., WALLACE F. G., 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27: 37–58.
- LINDSAY D. S., UPTON S. J., OWENS D. S., MORGAN U. M., MEAD J. R., BLAGBURN B. L. 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apikomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukar. Microbiol.* 47: 91–95.
- LUPO P. J., LANGER-CURRY R. C., ROBINSON M., OKHUYSSEN P. C., CHAPPELL C. L. 2008. *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78: 917–921.
- LV C., ZHANG L., WANG R., JIAN F., ZHANG S., NING C., WANG H., FENG C., WANG X., REN X., QI M., XIAO L. 2009. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7692–7699.
- MACKENZIE W. R., HOXIE N. J., PROCTOR M. E., GRADUS M. S., BLAIR K. A., PETERSON D. E., KAZMIERCZAK J. J., ADDISS D. G., FOX K. R., ROSE J. B., DAVIS J. P. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331: 161–167.
- MASON R. W., HARTLEY W. J., TILT L. 1981. Intestinal Cryptosporidiosis in a kid goat. *Austr. Vet. J.* 57: 386–388.
- MASUNO K., YANAI T., HIRATA A., YONEMARU K., SAKAI H., SATOH M., MASEGI T., NAKAI Y. 2006. Morphological and imunohistochemical features of *Cryptosporidium andersoni* in cattle. *Vet. Pathol.* 43: 202–207.
- MATSUBAYASHI M., KIMATA I., ABE N., TANI H., SASAI K. 2004. The detection of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* oocyst in cattle in Japan. *Parasitol. Res.* 93: 504–506.
- MATSUBAYASHI M., KIMATA I., ISEKI M., HAJIRI T., TANI H., SASAI K., BABA E. 2005. Infectivity of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 129: 165–168.

- MATSUI T., FUJINO T., KAJIMA J., TSUJI M. 2001. Infectivity and oocyst excretion patterns of *Cryptosporidium muris* in slightly infected mice. J. Vet. Med. Sci. 63: 319–320.
- MATSUI T., FUJINO T., TSUJI M. 1999. Infectivity to hosts of the endogenous stages of chicken and murine *Cryptosporidium*. J. Vet. Med. Sci. 61: 471–474.
- McDONALD V., DEER R., UNI S., ISEKI M., BANCROFT G. J. 1992. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. Infect. Immun. 60: 3325–3331.
- McDONALD V., ROBINSON H. A., KELLY J. P., BANCROFT G. J. 1996. Immunity to *Cryptosporidium muris* infection in mice is expressed through gut CD4+ intraepithelial lymphocytes. Infect. Immun. 64: 2556–2562.
- MEISEL J. L., PERERA D. R., MELIGRO C., RUBIN C. E. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroenterology 70: 1156–1160.
- MELE R., GÓEZ-MORALES M. A., TOSINI F., POZIO E. 2003. Indinavir reduces *Cryptosporidium parvum* infection in both *in vitro* models. Int. J. Parasitol. 33: 757–764.
- 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 parasitisation. Parasitology 141: 287–303.
- MILÁČEK P., VÍTOVEC J. 1985. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. Folia Parasitol. 50.
- MODRÝ D., HOFMANNOVÁ L., ANTALOVÁ Z., SAK B., KVÁČ M. 2012. Variability in susceptibility of voles (Arvicolinae) to experimental infection with *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. Parasitol. Res. 11: 471–473.
- MOON H. W., BEMRICK W. J. 1981. Fecal transmission of calf cryptosporidia between calves and pigs. Vet. Pathol. 18: 248–255.

- MORGAN U. M., XIAO L., MONIS P. T., SULAIMAN I., PAVLÁSEK I., BLAGBUM B., OLSON M., UPTON S. J., KRAMTSOV N. V., LAL A. A., ELLIOT A., THOMPSON R. C. A. 2000. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology* 120: 457–464.
- MORGAN-RYAN U. M., FALL A., WARD L. A., HIJJAWI N., SULAIMAN I., FAYER R., THOMPSON R. C. A., OLSEN M., LAL A. A., XIAO L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 433–440.
- MURPHY K., TRAVERS P., WALPORT M. 2008. Janeway's Immunobiology, Seventh Edition. Garland Science Publishing 887 pp.
- MUTHUSAMY D., RAO S. S., RAMANI S., MONICA B., BANERJEE I., ABRAHAM O. C., MATHAI D. C., PRIMROSE B., MULIYIL J., WANKE C. A., WARD H. D., KANG G. 2006. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *J. Clin. Microbiol.* 44: 632–634.
- NACIRI M., MANCASSOLA R., YVORÉ P., PEETERS J. E. 1993. The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves. *Vet. Parasitol.* 45: 199–207.
- NĚMEJC K., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., KERNEROVÁ N., ROST M., CAMA V. A., KVÁČ M. 2013. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitol. Res.* 112: 1143–1154.
- NEUMAYEROVÁ H., KOUDELA B. 2008. Effects of low and high temperatures on infectivity of *Cryptosporidium muris* oocysts suspended in water. *Vet. Parasitol.* 153: 197–202.
- NIME F. A., BUREK J. D., PAGE D. L., HOLSCHER M. A., YARDLEY J. H. 1976. Acute enterokolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70: 592–598.
- O'DONOGHUE P. J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis on man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25: 139–195.

- ONDRÁČKOVÁ Z. 2007. Infektivita *Cryptosporidium andersoni* pro různé druhy hlodavců. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta, 42 pp.
- ÖZKUL I. A., AYDIN Y. 1994. Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 55: 129–132.
- PALMER C. J., XIAO L., TERASHIMA A., GUERRA H., GOTUZZO E., SALDÍAS G., BONILLA J. A., ZHOU L., LINDQUIST A., UPTON S. J. 2003. *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Perú. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 1174–1176.
- PAPERNA I. & VILENKEN 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. *Dis. Aquat. Organ.* 27: 95–101.
- PAVLÁSEK I. 1999. Cryptosporidia, biology diagnosis, host spectrum, specificity and the environment. *Remedia. Clin. Microbiol.* 3: 290–302.
- PAVLÁSEK I., LÁVIČKA M. 1995. The first finding of a spontaneous gastric cryptosporidiosis infection in hamsters (*Phodopus roborovskii* Satunin, 1903) *Vet. Med. Praha* 40: 261–263.
- PEDRAZA-DIAZ S., AMAR C., IVERSEN A. M., STANLEY P. J., McLAUHLIN J. 2001. Unusual cryptosporidium species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. *J. Med. Microbiol.* 50: 293–296.
- PEDRAZA-DIAZ S., AMAR C., McLAUHLIN J. 2000. The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 189–194.
- PENG M. M., XIAO L., FREEMAN A. R., ARROWOOD M. J., ESCALANTE A. A., WELTMAN A. C., ONG C. S., MACKENZIE W. R. 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg. Infect. Dis.*, 3: 567–573.

- PETTOELLO-MANTOVANI M., DI MARTINO L., DETTORI G., VAJRO P., SCOTTI S., DITULLIO M. T., GUANDALINI S. 1995. Asymptomatic carriage of intestinal *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunodeficient children: A prospective study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 14: 1042–1047.
- POSPISCHIL A., STIGLMAIR-HERB M. T., HEGEL G., WIENER H. 1987. Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazells. *Vet. Rec.* 112: 379–380.
- RAMIREZ N. E., WARD L. A., SREEVATSAT S. 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes. Infect.* 6: 773–785.
- REHG J. E. 1991a. Anti-cryptosporidial activity of macrolides in immunosuppressed rats. *J. Protozool.* 38: 228–230.
- REHG J. E. 1991b. Activity of azithromycin against cryptosporidia in immunosuppressed rats. *J. Infect. Dis.* 163: 1293–1296.
- REHG J. E. 1991c. Anticryptosporidial activity is associated with specific sulfonamides in immunosuppressed rats. *J. Parasitol.* 77:238–240.
- REN X., ZHAO J., ZHANG L., NING C., JIAN F., WANG R., LY C., WANG Q., ARROWOOD M. J., XIAO L. 2011. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.* 130: 274–281.
- REN X., ZHAO J., ZHANG L., NING CH., JIAN F., WANG R., LV CH., WANG Q., ARROWOOD M. J., XIAO L. 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.* 130: 274–281.
- 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. *Korean J. Parasitol.* 36: 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. *Korean J. Parasitol.* 37: 33–37.

- RHEE J. K., YOON S. Y., PARK B. K. 1995. Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in mice. Korean J. Parasitol. 33: 377–382.
- RIGGS M. W. 2002. Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. Microbes. Infect. 4: 1067–1080.
- ROBINSON G., WRIGHT S., ELWIN K., HADFIELD S. J., KATZER F., BARTLEY P. M., HUNTER P. R. NATH M., INNES E. A. CHALMERS R. M. 2010. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa, Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. Int. J. Parasitol. 40: 1539–1548.
- RYAN U. M., BATH C., ROBERTSON I., READ C., ELLIOT A., MCINNES L., TRAUB R., BESIER B. 2005. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4992–4997.
- RYAN U. M., MONIS P., ENEMARK H. L., SULAIMAN I., SAMARASINGHE B., READ C., BUDDLE R., ROBERTSON I., ZHOU L., THOMPSON R. C., XIAO L., 2004. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). J. Parasitol. 90: 769–773.
- RYAN U. M., POWER M., XIAO L., 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red kangaroo (*Macropus rufus*). J. Eucaryot. Microbiol. 55: 22–26.
- RYAN U. M., XIAO L. 2008. Birds. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.): *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Second Edition. CRC Press, Boca Raton. pp. 395–418.
- RYAN U., XIAO L. 2014. Taxonomy and molecular taxonomy. In: Caccio S. M., Widmer G. (Eds.). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer Wien. 3–42.
- RYAN U., XIAO L., READ C., ZHOU L., LAL A. A., PAVLÁSEK I. 2003. Identification of Novel *Cryptosporidium* Genotypes from the Czech Republic. appl. Environ. Microbiol. 4302–4307.
- SAITOU N., NEI M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406–425.



- SANTÍN M., DIXON B. R., FAYER R. 2005. Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from ringed seals (*Phoca hispida*) in Northern Quebec, Canada. *J. Parasitol.* 91: 712–716.
- SATOH M., HIKOSAKA K., SASAKI T., SUYAMA Y., YANAI T., OHTA M., NAKAI Y. 2003. Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 691–692.
- SLAVIN D. 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.) *J. Comp. Pathol.* 65: 2662–2270.
- SMITH H. V., NICHOLS R. A. B., GRIMASON A. M. 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.* 21: 133–142.
- STERLING C. R., SEEGAR K., SINCLAIR N. A. 1986. *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea. *J. Infect. Dis.* 153: 380–381.
- STOCKDALE H. D., SPENCER J. A., BLAGBURN B. L. 2007. Prophylaxis and chemotherapy. In: FAYER R., XIAO L. (Eds.). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Second edition. CRC Pres. Boca Raton. FL. pp. 255–288.
- SULAIMAN I. M., LAL A. A., XIAO L. 2002. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the action locus. *J. Parasitol.* 88: 388–394.
- SUNNOTEL O., LOWERY C. J., MOORE J. E., DOOLEY J. S. G., XIAO L., MILLAR B. C., ROONEY P. J., SNELLING W. J. 2006. Under the microscope: *Cryptosporidium*. *Lett. Appl. Microbiol.* 43: 7–16.
- ŠLAPETA J. 2013. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow. *Int. J. Parasitol.* 43: 957–970.
- TAYLOR M. A., MARSHALL R. N., GREEN J. A., CATDCHPOLE J. 1999. The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. *Vet. Parasitol.* 86: 41–48.
- THAMSBORG S. M., JÖRGENSEN R. J., HENRIKSEN S. A. 1990a. cryptosporidiosis in kids of dairy goats. *Vet. Rec.* 127: 380–381.

- THAMSBORG S. M., JÖRGENSEN R. J., HENRIKSEN S. A. 1990b. cryptosporidiosis in kids of dairy goats. *Vet. Rec.* 127: 627–628.
- THEODOS C. M. 1998. Innate and cell-mediated immune responses to *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* 40: 87–119.
- THOMPSON R. C. A., OLSON M. E., ZHU G., ENOMOTO S., ABRAHAMSEN M. S., HIJAWI N. S. 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporiosis. *Adv. Parasitol.* 59: 77–158.
- TIANGTIP R., JONGWUTIWES S. 2002. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health* 7: 357–364.
- TRAVERSA D. 2010. Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Parasit. Vectors.* 25: 3–21.
- TROUT J. M., SANTÍN M., FAYER R. 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* species and genotypes in coyotes (*Canis latrans*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 37: 141–144.
- TURKCPAR N., KUTLAY S., NERGIZOGLU G., ATLI T., DUMAN N. 2002. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. *Nephron* 90: 344–346.
- TYZZER E. E. 1907. Asporozoan found in the peptic flanda of the common mouse. *Proc. Doc. Exp. Biol. Med.* 5: 12–13.
- TYZZER E. E. 1910. An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23: 394–414.
- TYZZER E. E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394–412.
- TYZZER E.E. 1910a. An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23: 487–509.
- TZIPORI S. 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol. Rev.* 47: 84–96.
- TZIPORI S., ANGUS K. W., GRAY E. W., CAMPBELL I. 1980. Vomiting and diarrhea associated with cryptosporidial infection. *N. Engl. J. Med.* 303: 818.

- TZIPORI S., WARD H. 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes. Infect.* 4: 1047–1058.
- UPTON S. J., CURRENT W. L. 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) infecting mammals. *J. Parasitol.* 71: 625–629.
- VALIGUROVÁ A., HOFMANNOVÁ L., KOUDELA B., VÁVRA J. 2007. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *J. Eucaryot. Microbiol.* 54: 495–510.
- VETTERLING J. M., TAKEUCHI A., MADDEN P. A. 1971. Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. *Journal of Protozoology* 18: 248–260.
- VÍTOVEC J., HAMADEJOVÁ K., LANDOVÁ L., KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B. 2006. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *J. Ved. Med.* 53: 239–243.
- VÍTOVEC J., KOUDELA B. 1992. Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. *Vet. Parasitol.* 43: 25–36.
- WANG R., ZHANG L., NING C., FENG Y., JIAN F., XIAO L., LU B., AI W., DONG H. 2008. Multilocus phylogenetic analysis of *Cryptosporidium andersoni* (Apicomplexa) isolated from a bactrian camel (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasitol. Res.* 102: 915–920.
- WANG Y., FENG Y., CUI B., JIAN F., NING C., WANG R., ZHANG L., XIAO L. 2010. Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. *Parasitol. Res.* 106: 341–347.
- WARREN K. S., SWAN R. A., MORGAN-RYAN U. M., FRIEND J. A., ELLIOT A. 2003. *Cryptosporidium muris* infection in bilbies (*Macrotis lagotis*). *Aust. Vet. J.* 81: 739–741.
- WEISBURGER W. R., HUTCHEON D. F., YARDLEY J. H., ROCHE J. C., HILLIS W. D., CHARACHE P. 1979. Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal–transplant recipient with IgA deficiency. *Am. J. Clin. Pathol.* 72: 473–478.
- WETZEL R. 1938. Ein neues Coccid (*Cryptosporidium vulpis* ap. Nov.) aus dem Rotfuchs. *Arch. Wissenschaftl. Prakt. Tierheilk.* 74: 39–40.

- WRIGHT M. K., WHITAKER B. R. 2001. Quarantine. in. Wright M. K., Whitaker B. R. (Eds.): Amphivian Medicine and Captive husbandry. Krier Publishing Company, Malabar. pp. 303–307.
- XIAO L., FAYER R., RYAN U., UPTON S. J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev. 17: 72–97.
- XIAO L., RYAN U. M., GRACZYK T. K., LIMOR J., LI L., KOMBERT M., JUNGE R., SULAIMAN I. M., ZHOU L., ARROWOOD M. J., KOUDELA B., MODRÝ D., LAL A. A. 2004a. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. Appl. Environ. Microbiol. 70: 891–899.
- XIAO L., SINGH A., LIMOR J., GRACZYK T. K., GRADUS S., LAL A. 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. oocysts in samples of raw surface water and wastewater. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1097–1101.
- ZAMBRISKI J. A., NYDAM D. V., WILCOX Z. J., BOWMAN D. D., MOHAMMED H. O., LIOTTA J. L. 2013. *Cryptosporidium parvum*: determination of ID<sub>50</sub> and the dose-response relationship in experimentally challenged dairy calves. Vet. Parasitol. 197: 104–112.
- ZHU G., MARCHEWKA M. J., KEITHLY J. S. 2000. *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 146: 315–321.
- ZIEGLER P. E., WADE S. E., SCHAF S. L., STERN D. A., NADARESKI CH. A., MOHAMMED H. O. 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. Vet. Parasitol. 147: 176–184.