

JIHO ČESKÁ UNIVERZITA V PRAZE  
Fakulta veterinární medicíny  
BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Studijní program: B4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Zootechnických věd

Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

**Bakalářská práce**

Biologická a molekulární charakteristika

*Cryptosporidium suis-like*

**Autor bakalářské práce:** Gabriela Vlnatá

**Vedoucí bakalářské práce:** prof. Ing. Martin Kváča, Ph.D.

Budějovice, 2019

Prohlá-uji, že v souladu s § 47b zákona . 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 . 111/1998 Sb. zveřejněny posudky kolitele a oponent 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:

í í í í í í í í í í

Gabriela Vlnatá

Tímto bych ráda podkovala prof. Ing. Martinu Kváovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla podkovat RNDr. Jan Jeřkovi, Ing. Michaelu Horákovu, Ing. Romanu Konečnou, Ph.D., Ing. Lence Hláskové, prof. John McEvoy a RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. za velkou výpomoc a rady při práci v laboratoři, při experimentálních infekcích a při zpracování materiálu pro histologická a elektron-mikroskopická vyšetření. V neposlední řadě bych chtěla také podkovat celému kolektivu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie za vytvoření přátelské atmosféry.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu Ministerstva zemědělství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LTAUSA17165, šéfkomentář: prof. Ing. Martin Kvá, Ph.D.) a grant Grantové agentury Jihozápadní univerzity v Českých Budějovicích (002/2016/Z, šéfkomentář: prof. Ing. Martin Kvá, Ph.D. a 072/2017/Z šéfkomentářka: Ing. Michaela Horáková, Ph.D.).

## ABSTRAKT

*Cryptosporidium parvum* VF383, běžně známý jako *Cryptosporidium suis-like*, byl detekován u lidí, domácích peřvých a divokých kryš po celém světě a popsán několika rznými jmény včetně *Cryptosporidium suis-like*, na základě blízkého fylogenetického vztahu k druhu *C. suis*, který parazituje u prasat. Na rozdíl od *C. suis* však nebyla tato kryptosporidie u prasat nikdy zjiřta. Izolát *Cryptosporidium suis-like* pocházející z divokých potkanů a pouřtý v této práci nebyl infekční pro selata nebo telata, ale byl infekční pro laboratorní potkany, myři kmene BALB/c a pískomily mongolské. Prepatentní perioda byla u všech hlodavců 465 dnů. Patentní perioda u potkanů byla delší (>30 dnů) než u ostatních hlodavců (<20 dnů). U řádného z hlodavců infikovaných *Cryptosporidium suis-like* nebyly zjiřtány řádné klinické příznaky infekce. Vývojová stádia *Cryptosporidium suis-like* byla pomocí histologie a elektronové mikroskopie zjiřta u všech vnímavých hlodavců pouze v tlustém střevě. Oocysty byly morfometricky podobné *C. parvum* a menší než *C. suis*, měřící 5,20 × 4,94 μm. Fylogenetické analýzy řádných sekvencí SSU, aktinu a HSP70 ukázaly, že *Cryptosporidium suis-like* je geneticky odlišný od *C. suis* a dalších popsáných druhů rodu *Cryptosporidium*. Morfologické, genetické a biologické údaje podporují popsání *Cryptosporidium suis-like* jako nového druhu, pro který jsme navřhli název *Cryptosporidium occultus*.

**Klí ová slova:** Histologie; molekulární fylogeneze; morfometrie; nové druhy; experimentální studie

## SUMMARY

*Cryptosporidium parvum* VF383, more commonly known as *Cryptosporidium suis*-like, has been reported in humans, domesticated ruminants, and wild rats worldwide and described under several names including *Cryptosporidium suis*-like, based on its close phylogenetic relationship to *C. suis*. Unlike *C. suis*, however, it has never been detected in pigs. In the present work, *Cryptosporidium suis*-like originating from wild brown rats was not infectious for piglets or calves but was infectious for laboratory brown rats, BALB/c mice, and Mongolian gerbils. The prepatent period was 465 days for all rodents. The patent period was longer for rats (>30 days) than other rodents (<20 days). None of the rodents developed clinical signs of infection. In all rodents, life cycle stages were detected in the colon by histology and electron microscopy. Oocysts were morphometrically similar to those of *C. parvum* and smaller than those of *C. suis*, measuring  $5.20 \times 4.94$   $\mu$ m. Phylogenetic analyses of SSU, actin, and HSP70 gene sequences revealed *Cryptosporidium suis*-like to be genetically distinct from, *C. suis*, and other described species of *Cryptosporidium*. Morphological, genetic, and biological data support the establishment of *Cryptosporidium suis*-like as a new species, and we propose the name *Cryptosporidium occultus* sp. n.

**Key words:** Histology; molecular phylogeny; morphometry; new species; transmission studies

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>10</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>11</b>
3.1 <i>Cryptosporidium suis</i> -like - historie .....	11
3.2 Kryptosporidie .....	11
3.2.1 Taxonomické zařazení.....	11
3.2.2 Minimální požadavky na popis druhu rodu <i>Cryptosporidium</i> .....	13
3.2.3 Diferenciální diagnostika kryptosporidií .....	13
3.2.3.1 Morfometrie oocyst .....	13
3.2.3.2 Hostitelská specifita.....	14
3.2.3.3 Genetická variabilita.....	14
3.3 Probíhající infekce vs pasáží parazita .....	16
<b>4. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>17</b>
4.1 Materiál .....	17
4.1.1 Experimentální zvířata .....	17
4.1.2 Zdroj biologického materiálu.....	17
4.2 Metodika .....	18
4.2.1 Odběr a zpracování vzorků .....	18
4.2.2 Detekce oocyst pomocí specifických barvení.....	18
4.2.3 Detekce oocyst kryptosporidií pomocí specifických protilátek.....	19
4.2.4 Morfometrická analýza oocyst.....	19
4.2.5 Purifikace oocyst.....	20
4.2.6 Hodnocení intenzity infekce .....	21
4.2.7 Izolace DNA .....	22
4.2.8 Genotypizace .....	23
4.2.9 Gelová elektroforéza .....	25
4.2.10 Izolace z gelu.....	26
4.2.11 Sekvence vzorků a fylogenetické analýzy.....	27
4.2.12 Odběr vzorků orgánů a tkání.....	27
4.2.13 Příprava histologických preparátů .....	27
4.2.14 Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM).....	29
4.2.15 Design experimentálních prací.....	29

4.2.16	Etické prohlášení .....	30
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>31</b>
5.1	Morfometrie oocyst.....	31
5.2	Molekulární analýzy .....	32
5.3	Průběh infekce .....	34
5.4	Lokalizace infekce .....	35
5.5	Taxonomické shrnutí .....	37
<b>6.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚRY .....</b>	<b>41</b>
<b>8.</b>	<b>PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJ .....</b>	<b>42</b>
<b>9.</b>	<b>PŘÍLOHA.....</b>	<b>52</b>

# 1. Úvod

Zástupci patřící do rodu *Cryptosporidium* (kmen: Apicomplexa) jsou protozoární jednobuněční paraziti, kteří infikují především gastrointestinální trakt (GIT), ale některé druhy mohou infikovat plíce, vzdušné vaky nebo ledviny. Spektrum hostitelů zahrnuje ryby, obojživelníky, plazy, ptáky a savce včetně člověka (Holubová et al. 2016; O'Donoghue 1995; Ziegler et al. 2007). Jejich infekční stádia, oocysty, jsou velmi odolné a ve vhodných nepříznivých podmínkách vydrží dlouhou dobu. Ve vlhkém prostředí dokážou zachovat infekčnost až po dobu deseti měsíců (Fayer et al. 1998).

V současné době je platně popsáno 41 druhů. Nicméně definice druhu v rámci rodu *Cryptosporidium* je obtížná. Morfologie vývojových stádií představuje jeden ze základních kamenů v taxonomii parazitů patřících do kmene Apicomplexa a proto je morfometrie oocyst obvykle jedním z požadavků při popisu nového druhu. V rámci rodu *Cryptosporidium* však nelze na základě morfometrie a morfologie oocyst od sebe odlišit jednotlivé druhy. Tedy morfometrie a morfologie oocyst by neměla být jediným kritériem pro pojmenování nového druhu. Do taxonomického popisu proto musí být zahrnuty i další charakteristiky, jako je hostitelská specifita. Také popis životního cyklu může být užitečný, ale není striktním požadavkem. Jako jedno z dalších kritérií mohou být biochemické rozdíly, ale v této roli při definování jednotlivých druhů rodu *Cryptosporidium* hrají především genetické charakteristiky. Na druhou stranu bylo do současné doby popsáno mnoho genotypů na základě genetických rozdílů, ale pro uznání druhu chybí výše popsané biologické charakteristiky. Poslední kritérium je dodržování Mezinárodního kódu zoologické nomenklatury (ICZN), který obsahuje obecné pokyny a slouží jako pomůcka při popisu nových druhů (Xiao et al. 2004a).

Při popisu genotypů kryptosporidií na základě jen kusých informací může dojít k adomylu a zkreslení údajů. Takovýto stav nastal i v roce 2007, kdy Langkjær et al. (2007) popsal kryptosporidii ze skotu a díky podobnosti sekvence pro gen kódující malou podjednotku rRNA (SSU) s *C. suis* pojmenoval tuto kryptosporidii jako *Cryptosporidium suis-like*. Přestože identická sekvence byla popsána u člověka o pět let dříve a tato kryptosporidie nikdy nebyla nalezena v prasatech, pojmenování *Cryptosporidium suis-like* bylo běžně používáno. V této práci jsme se podrobně zaměřili na biologické a genetické vlastnosti tzv. *Cryptosporidium suis-like*.



## 2. Cíl práce

Cílem práce je popsat genetickou a biologickou charakteristiku izolátu kryptosporidií známého jako *Cryptosporidium suis-like*, který byl detekován u lovců, skotu a potkanů. Pomocí molekulárních metod provést srovnání izolátu získaného z potkana s izoláty z lovců a skotu. Fylogenetickými metodami určit fylogenetické vztahy mezi studovaným izolátem kryptosporidie a ostatními druhy a genotypy kryptosporidií. Na základě experimentálních infekcí popsat průběh infekce u prasat, skotu, potkanů a dalších hlodavčích hostitelů. Zpracovat datové soubory pomocí statistických a fylogenetických metodami.

## 3. Literární přehled

### 3.1 *Cryptosporidium suis-like* - historie

V roce 2002 byla u člověka detekována kryptosporidie jejíž náleziště náleží sekvenci malé podjednotky rRNA (SSU) se lišila od ostatních druhů a genotyp, ale dle tehdy používaného úzu byl tento genotyp označen jako *C. parvum* VF383 (Ong et al. 2002). Poznámka: druh *Cryptosporidium suis* byl popsán až v roce 2004. V roce 2007 byl v trusu skotu (*Bos taurus*) v Dánsku detekován izolát K4515, který měl identickou sekvenci SSU s *C. parvum* VF383, ale z důvodu blízké fylogenetické příbuznosti k druhu *C. suis* byl tento izolát pojmenován jako *Cryptosporidium suis-04*: *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* 126: 37656.

Fayer R. 2007: General biology. In: Fayer R., Xiao L. (eds) *Cryptosporidium* (Bos grunniens), lidí (*Homo sapiens*) a krys (*Rattus tanezumi*), a pojmenován různými jmény, přičemž *Cryptosporidium suis-like* bylo jedním z nich. *Tabletka* *Cryptosporidium suis-like* v následujícím textu budeme dále používat již stávající platný název druhu, *Cryptosporidium occultus*, který byl popsán a publikován na základě této práce (Příloha).

## 3.2 Kryptosporidie

### 3.2.1 Taxonomické zařazení

Paraziti rodu *Cryptosporidium* patří do třídy Cryptosporiidae a kmene Apicomplexa primárně infikují gastrointestinální trakt obratlovců (Fayer 2010). Kryptosporidie byly považovány za zeny mezi kokciemi, ale molekulární fylogenetické studie prokázaly, že jejich nejbližší příbuzní jsou zejména gregariny. Gregariny jsou však o stovky miliónů let starší než kryptosporidie (Volf et Horák 2007). V současné době existuje asi 41 platných druhů rodu *Cryptosporidium* parazitujících u ryb, obojživelníků, plazů, ptáků a savců. Dále bylo popsáno mnoho genotypů rodu *Cryptosporidium*, které postrádají biologické a morfologické údaje nezbytné pro označení druhů (Fayer 2010).

**Tabulka 1.** Nález *Cryptosporidium occultus* (druh popsáný na základě této práce), který byl popsán pod různými názvy, v savcích po celém světě na základě genotypizace částečných sekvencí genů kódujících malou podjednotku rRNA (SSU), aktin nebo 70 kDa Heat Shock Protein (HSP70).

Stát	Hostitel (odborný název)	Počet pozitivních	Věk (rok)	Sekvence (GenBank přístupové číslo)			Popis (rukopis / GenBank)	Reference
				SSU	actin	HSP70		
Dánsko		3	0.361	DQ182599*	NA	DQ182598 <sup>§</sup>	<i>C. suis</i> -like / <i>Cryptosporidium</i> sp. K4515	(Langkjær et al. 2007)
Indie	skot ( <i>Bos taurus</i> )	1	0.361	GQ345008*	NA	NA	<i>C. suis</i> -like / <i>Cryptosporidium</i> cf. <i>suis</i>	(Khan et al. 2010)
Anglie		NA	NA	HQ822134*	NA	NA	NA / <i>Cryptosporidium</i> sp. P156	nepublikované (2012)
Austrálie		9	<1	KC778530*	NA	NA	<i>Cryptosporidium</i> sp. genotyp RTA368 / <i>Cryptosporidium</i> sp. genotyp RTA368	(Abeywardena et al. 2013)
Čína	jak ( <i>Bos grunniens</i> )	2	1-2	KM110047*	NA	NA	<i>C. suis</i> -like / <i>Cryptosporidium</i> cf. <i>suis</i>	(Ma et al. 2015)
		2	>2	KU052809*	NA	NA	<i>C. suis</i> -like / <i>Cryptosporidium</i> cf. <i>suis</i>	(Li et al. 2016)
Brazílie	vodní buvol ( <i>Bubalus bubalis</i> )	NA	NA	JX559850*	JX559851 <sup>#</sup>	NA	<i>Cryptosporidium</i> sp. AQ7 / <i>Cryptosporidium</i> sp. AQ7	Nepublikované (2012)
Filipíny	krysa ( <i>Rattus tanezumi</i> )	14	NA	JX485388* JX485390	JX485409 <sup>#</sup> JX485412 JX485417 JX485418	NA	<i>C. suis</i> -like / <i>C. suis</i>	(Ng-Hublin et al. 2013)
Anglie	lovík ( <i>Homo sapiens</i> )	NA	NA	HQ822146*	HQ822148 <sup>#</sup>	HQ822147 <sup>§</sup>	NA / <i>Cryptosporidium</i> sp. W20486	nepublikované (2012)
Kanada		NA	NA	AY030084*	NA	NA	<i>C. parvum</i> VF383 / <i>C. parvum</i> VF383	(Ong et al. 2002)

NA nedostupný; \* označuje 100% sekvenční identitu v lokusu; <sup>§</sup> označuje název izolátu popsáného v rukopisu; <sup>§</sup> označuje název izolátu hlášený v GenBank; <sup>#</sup> označuje rok vydání publikace v GenBank.

## 3.2.2 Minimální požadavky na popis druhu rodu

### *Cryptosporidium*

Pro pojmenování nových druhů v rámci rodu *Cryptosporidium* byly navrženy následující minimální požadavky. Prvním požadavkem je morfologický a morfometrický popis oocyst. Druhý požadavek je prokázání genetické odlišnosti od ostatních druhů rodu *Cryptosporidium*. Třetím požadavkem je prokázání hostitelské specifity, a to buď na základě přirozených infekcí nebo pokud je to možné na základě experimentálních infekcí. A poslední čtvrtý požadavek je popis v souladu s Mezinárodním kódem zoologické nomenklatury (ICZN) (Egyed et al. 2003; Jirků et al. 2008; Xiao et al. 2004a).

## 3.2.3 Diferenciální diagnostika kryptosporidií

### 3.2.3.1 Morfometrie oocyst

Tvarem a velikostí oocyst lze rozpoznat příslušnost k jedné ze dvou fylogenetických skupin kryptosporidií. Stejně kryptosporidie mají malé okrouhlé a řídce velké oválné oocysty (Xiao et al. 2004b). Oocysty *C. baileyi* (stejně kryptosporidie) jsou výjimkou z tohoto pravidla, jejich velikost a tvar se podobá oocystám řídce kryptosporidií (Current et al. 1986).

Velikosti oocyst stejné kryptosporidií se od sebe liší jen výjimečně a jednotlivé druhy a genotypy v rámci stejné kryptosporidie nelze od sebe morfometricky odlišit. Nejznámější stejné kryptosporidie má oocysty o velikosti v průměru  $5,0 \times 4,5$   $\mu\text{m}$  (Tyzzer 1912). Od *C. parvum* je morfometricky nerozlišitelný například druh *C. fayeri* s velikostí v průměru  $4,9 \times 4,3$   $\mu\text{m}$  (Ryan et al. 2008), ale také druh *C. hominis*, který má velikost v průměru  $5,2 \times 4,7$   $\mu\text{m}$  (Morgan-Ryan et al. 2002). Naopak morfometricky odlišný je druh *C. canis*, má oocysty v průměru  $5,9 \times 5,0$   $\mu\text{m}$  (Fayer et al. 2001). Kryptosporidie hostitelsky specifické pro prasata lze od sebe morfologicky odlišit. Zatímco *C. suis* má oocysty o velikosti  $6,2 \times 5,5$   $\mu\text{m}$  (Vítovec et al. 2006), *C. scrofarum* má oocysty menší o průměrné velikosti  $5,2 \times 4,8$   $\mu\text{m}$  (Kváček et al. 2013a). Na druhou stranu *C. scrofarum* nelze odlišit od *C. parvum*, které se u prasat vzácně objevuje (Kváček et al. 2013a; Nemejc et al. 2012; Vítovec et al. 1992).

řídce kryptosporidie jsou zpravidla v rámci stejné kryptosporidie stejné kryptosporidií stejné kryptosporidie (Kváček et al. 2013b). Přestože byla v rámci řídce kryptosporidií popsána

mezidruhová variabilita oocyst, nelze morfometrii použít jako diferenciální znak (Katsumata et al. 2000; Kváč et al. 2016; Lindsay et al. 2000; Ryan et al. 2003a).

### 3.2.3.2 Hostitelská specifita

Hostitelská specifita parazita představuje soubor hostitelů, které daný parazit infikuje a ukončuje v nich vývojový cyklus. Druhy jako *C. parvum*, *C. baileyi*, *C. meleagridis* a *C. ubiquitum* patří do skupiny vykazující relativně širokou hostitelskou specifitu (Fayer 2007; Li et al. 2014; Nakamura et al. 2015; Stenger et al. 2015; Vetterling et al. 1971). Například pro *C. parvum* je předpokládána všímavost všech savců včetně člověka (Fayer 2004) a *C. meleagridis* je infekční pro savce i ptáky (Slavin 1955).

Další skupina zahrnuje druhy, které jsou specifické pro určitou skupinu hostitelů. Do této skupiny patří například *C. muris*, který parazituje u hlodavců (Anderson 1991; Ryan et al. 2003b) a *C. andersoni*, typický parazit pro skot a další polygastry (Anderson 1991; Kváč et al. 2003; Lindsay et al. 2000).

Většina kryptosporidií má však úzkou hostitelskou specifitu. Například *C. wrairi* parazituje pouze u morčat (Feng et al. 2010), *C. hominis* parazituje téměř výhradně u člověka (Morgan-Ryan et al. 2002) nebo *C. canis* parazitující u psů a psovitých členů (Fayer et al. 2001).

### 3.2.3.3 Genetická variabilita

Kryptosporidie mají na eukaryotický organismus malý genom, jehož velikost byla odhadnuta na 10,4 Mb. Dále bylo prokázáno, že kryptosporidie mají osm chromozomů (Blunt et al. 1997; Caccio et al. 1998; Putignani et al. 1999). Celogenomové sekvenování prokázalo, že genomy druhů *C. hominis* a *C. parvum* si jsou velmi podobné, sdílejí průměrnou 96,7% nukleotidovou identitu a překrývají se překrývající v předikovaných genech. Také mají téměř identické množství předikovaných tRNA a rRNA genů (Xu et al. 2004).

Genotypizací nástroje, které se používají k rozlišení jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií jsou však dosud omezeny. Ke genotypizaci kryptosporidií jsou nejčastěji používány určité sekvence genu kódujícího malou podjednotku

rRNA, aktin, *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein (COWP), a 70 kDa Heat Shock Protein (HSP70). Epidemiologické výzkumy jsou však často omezeny nízkou rozlišovací schopností tohoto lokusu. V důsledku toho se začal používat gen pro 60-kDa glykoprotein (GP60) (Alves et al. 2003b; Leav et al. 2002; Peng et al. 2001; Strong et al. 2000; Sulaiman et al. 2001) nebo vnitřně transkribovaný spacer-2 (ITS-2) genu rRNA (Gasser et al. 2003, 2004; Chalmers et al. 2005; Schindler et al. 2005). Dále se používá genotypizace mikrosatelitů a minisatelitů (Aiello et al. 1999; Alves et al. 2003a; Caccio et al. 2000, 2001; Feng et al. 2000; Gatei et al. 2007; Mallon et al. 2003; Sulaiman et al. 2001; Tanriverdi et al. 2006a, 2006b; Widmer et al. 2004).

Termín genotyp je v rámci kryptosporidií používám pro označení izolátu s nízkým taxonomickým statutem, není to druh, u něhož byla zjištěna odlišnost na genetických markerech, ale nejsou k dispozici další data potřebná pro popis druhu. Minimální odlišnost v rámci daného lokusu však není striktně stanovena. Pro SSU lokus je to, kterými autory uváděna hranice 99,5 % (Mallon et al. 2003). Nicméně stupeň genetické variability se u různých druhů a genotypů může výrazně lišit. Například sekvenční identita v nukleotidové sekvenci na genu kódujícím SSU u druhů *C. parvum* a *C. tyzzeri* je 99,4 %, u *C. muris* a *C. andersoni* 99,3 % a u *C. cuniculus* a *C. hominis* je 99,6 % (Kováč et al. 2018). Na druhou stranu sekvenční identita dvou různých variant SSU v rámci *C. parvum* nebo *Cryptosporidium* chipmunk genotyp II je 99,3 %, respektive 93,0 % (Mynářová et al. 2016; Stenger et al. 2015). V rámci genu kódujícího COWP jsou detekovány různé velké sekvenční rozdíly v nukleotidové sekvenci, zatímco proteinová sekvence je pro všechny druhy identická. Například *C. muris* se liší od *C. andersoni* v 8 nukleotidových pozicích (shoda 97,9%), ale proteinová sekvence je identická. Naopak druhy *C. parvum* a *C. hominis* mají identickou jak proteinovou, tak i nukleotidovou sekvenci. Obdobná variabilita je v rámci ostatních markerů používaných ke genotypizaci (Holubová et al. 2016; Horáková et al. 2019; Lindsay et al. 2000; Stenger et al. 2015).

### 3.3 Probíhající infekce vs pasáží parazita

Rozlišit aktivní infekci od pasivní pasáže je dosud jedním z nevyřešených problémů. Používání molekulárních metod jako například PCR nebo qPCR je sice velmi citlivé, ale prokazuje pouze přítomnost specifické DNA kryptosporidií, což neznamena, že jde o aktivní infekci (Arcay et al. 1995; Kváč et al. 2012). Z minulosti známe například přítomnost oocyst druhů *C. muris* nebo *C. tyzzeri* v trusu rohatky ozdobné (*Ceratophrys ornata*), uřovky červené (*Elaphe guttata*), uřovky černé (*Elaphe obsoleta*) a hroznýše (*Boa constrictor*), která byla zapříčiněna požitím infikovaných myší, které jsou typickými hostiteli těchto kryptosporidií. Po odstranění infikovaných myší jako potravy došlo k vymizení přítomnosti oocyst v trusu těchto plazů (Crawshaw et al. 1987; Xiao et al. 2004b). Stejně tak výskyt *C. muris* a *C. tyzzeri* ve výkalech prasat je výsledkem pasivní pasáže přes zažívací trakt těchto hostitelů, protože Kváč et al. (2012) prokázal, že prasata nejsou k infekci těmito druhy kryptosporidií vnímavá.

Z výše uvedeného je tedy zřejmé, že přítomnost specifické DNA nebo oocyst kryptosporidií nemusí nutně znamenat, že v hostiteli probíhá aktivní infekce.

## 4. Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Experimentální zvířata

K experimentu bylo použito šest osmitýdenních potkanů (*Rattus norvegicus*), pět osmitýdenních BALB/c myší (*Mus musculus*), pět osmitýdenních pískomilů mongolských (*Meriones unguiculatus*), pět týdenních selat (*Sus scrofa*) a pět dvanáctitýdenních telat (*Bos taurus*).

#### 4.1.2 Zdroj biologického materiálu

Izoláty *Cryptosporidium occultus* byly získané ze čtyř pirozeně infikovaných divokých potkanů (*Rattus norvegicus*) chycených na čtyřech různých místech v České republice (Obrázek 1). Oocysty *C. occultus* z těchto potkanů byly vyčištěny z trusu pomocí sacharóзовého gradientu (4.2.5) a použity k infekci jednoho osmitýdenního laboratorního potkana (potkan 0). Oocysty *C. occultus* z infikovaného potkana 0 byly vyčištěny na sacharóзовém a césiu chloridovém gradientu (4.2.5), dále byly použity k infekci ostatních zvířat a trus z těchto zvířat byl dále použit pro molekulární (4.2.7-4.2.11) a pro morfometrické analýzy (4.2.4).



**Obrázek 1.** Mapa lokalit (červeně vyznačeno) odchytu volně žijících potkanů pirozeně infikovaných *Cryptosporidium occultus* v České republice.



## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Odběr a zpracování vzorků

Volně flující potkani byly odchytávány do mrtvochytných pastí. Jako nástraha bylo použito maso makrely. Pasti byly kontrolovány v pravidelných intervalech. Odchycené zvíře bylo převezeno do laboratoře, kde byl získán obsah zařívacího traktu, který byl uloženo do 2,5 % roztoku dichromanu draselného a skladován při 4 °C až do doby dalšího použití. Vzorky trusu experimentálně infikovaných zvířat byly odebírány denně po dobu od 3. do 30. dne po infekci (DPI). Denně byla sledována konzistence a barva trusu a celkový zdravotní stav zvířat. Vzorky byly individuálně uchovány při teplotě maximálně 466 °C ve sterilních uzavíratelných zkumavkách. Všechny odebrané vzorky byly vyšetřovány na přítomnost oocyst pomocí standardních parazitologických metod (4.2.2 a 4.2.3) a přítomnost specifické DNA kryptosporidií pomocí izolace DNA (4.2.7), polymerázové řetězové reakce (PCR; 4.2.8) s následnou sekvenací (4.2.11).

### 4.2.2 Detekce oocyst pomocí specifických barvení

**Barvení oocyst anilin-karbol-methylvioletí (ACMV) dle Miláka a Vítovce (1985)**

**Chemikálie:** roztok methylvioleť (0,6 g methylvioleť, 1 ml anilin, 1 g fenol, 30 ml alkohol, 70 ml deionizovaná voda), roztok tartrazínu (1% roztok tartrazínu v 1% kyselině octové) a 2% kyselina sírová

**Postup barvení:**

1. Nátěr trusu na podlovní sklo fixovat methanolem v plameni.
2. Barvit roztokem methylvioleť po dobu 30 minut.
3. Omýt pod tekoucí vodou.
4. Diferencovat ve 2% kyselině sírové po dobu 1 minuty.
5. Omýt pod tekoucí vodou.
6. Dobarvit tartrazínem po dobu 162 minut.
7. Omýt pod tekoucí vodou.
8. Vysušit a prohlédnout mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

### 4.2.3 Detekce oocyst kryptosporidií pomocí specifických protilátek

Pro detekci byl použit komerční kit Crypto Cel (Cellabs Pty Ltd, Brookvale, NSW 2100 Australia).

**Součástí kitu:** Crypto Cel Reagent, Positive Control Slide, Mounting Fluid

#### Postup:

1. Na podložní sklo nanést 20  $\mu$ l vzorku pevně na cesium chloridovém gradientu.
2. Vzorek nechat oschnout při laboratorní teplotě.
3. Fixovat po dobu 5 minut v methanolu a nechat schnout při laboratorní teplotě.
4. Přidat 25  $\mu$ l Crypto Cel Reagent k vzorku a pozitivní kontrole, zanechat ve vlhké komoře.
5. Inkubovat při 37 °C ve vlhké komoře ve tmě po dobu 30 minut.
6. Opláchnout v roztoku PBS po dobu 1 minuty a nechat oschnout.
7. Přidat kapku Mounting Fluid na vzorek. Vzorek překrýt krycím sklem a odstranit bubliny.
8. Vzorky prohlédnout mikroskopem s UV lampou při zvětšení 1000 $\times$  za použití imerzního oleje.
9. Vzorek lze uchovat při 268 °C ve tmě po dobu 24 hodin.

### 4.2.4 Morfometrická analýza oocyst

Morfometrie byla měna pomocí digitální analýzy obrázků (M.I.C. Quick Photo Pro v.3.1 software; Promicra, s.r.o., Praha, Česká republika) získaných pomocí Olympus Digital Colour Camera DP73. Délka a šířka oocyst ( $n = 30$ ) byla měna při zvětšení 1000 $\times$  a byl vypočítán tvarový index každé oocysty. Jako kontrola byla použita morfometrie *C. parvum* HA ( $n = 30$ ) z pirozeně infikovaného dvacetipetidenního telete, udržovaného ve SCID myších na Parazitologickém ústavu BC AV R, v.v.i., Česká republika. Mění prováděla stejná osoba za použití stejného mikroskopu.

## 4.2.5 Purifikace oocyst

Trus s oocystami *C. occultus* byl rozmělněn v teflonové misce, poté pečetěn pomocí sacharózového gradientu (Arrowood a Stearling 1996) a dále dočetěn pomocí cesium chloridového gradientu. Získaný izolát byl pefiltrován přes sítko o velikosti okolo 10 µm.

### Sacharózový gradient (Arrowood a Stearling 1996)

**Chemikálie:** Sheater v roztok, 1% roztok PBS Tween, Sheater v roztok (259 ml deionizované vody, 405 g cukru)

Pracovní Sheaterovy roztoky: 1+2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween)

1+4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

### Postup:

1. Zbavit trus přímým pefecením přes sítko.
2. Do skleněných zkumavek navrstvit pomocí pasteuovy pipety gradient:
  1. vrstva: 30 ml Sheater 1+2
  2. vrstva: 30 ml Sheater 1+4
  3. vrstva: 15 ml vzorku trusu
3. Centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
4. Horní zbarvenou vrstvu (cca 1/3) odsát a zbylý supernatant přenést do čistých zkumavek.
5. Zkumavky doplnit deionizovanou vodou a centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
6. Polovinu objemu odsát a vzorky doplnit deionizovanou vodou. Centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
7. Zopakovat krok 6.
8. Sediment přenést do čisté zkumavky a uchovat při 4 °C s přidávkou ATB, případně zalít 5% dichromanem draselným.

### **Cesium chloridový gradient**

**Chemikálie:** Cesium chlorid (roztok o hustotě  $1,15 \text{ g.ml}^{-1}$ ), PBS (0,025 M roztok; pH 7,2).

#### **Postup:**

1. Centrifugovat vzorky pevně na cukrovém gradientu.
2. Odsát supernatant, přidat PBS a rozsuspendovat.
3. Do čistě 1,7 ml zkumavky napipetovat 1 ml CsCl.
4. Na CsCl opatrně navrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
5. Vzorek centrifugovat při laboratorní teplotě po dobu 3 minuty při  $16\,000 \text{ g}$ .
6. Odebrat 1 ml supernatantu s oocystami a poté naedit deionizovanou vodou.
7. Vzorek centrifugovat při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 20 minut při  $1370 \text{ g}$ .
8. Supernatant odsát a pelet skladovat v dichromanu draselném.

### **4.2.6 Hodnocení intenzity infekce**

U mikroskopicky pozitivních vzorků byla odhadnuta intenzita infekce a vyjádřena počet oocyst v gramu trusu (OPG = oocyst per gram) dle metodiky dříve popsané Kváčem et al. (2007).

#### **Postup:**

1. Zvážit podlovní sklo před nátrem trusu s přesností na 0,001 g.
2. Na zvážené podlovní sklo natít vzorek trusu.
3. Zvážit hmotnost natřeného vzorku.
4. Nátrobarvit metodou dle Miláka a Vítovce (4.2.2)
5. Prohlédnout celý preparát pod mikroskopem a spočítat oocysty v náturu

Dle hmotnosti vzorku a počtu oocyst v náturu odhadnout intenzitu infekce a počet oocyst v gramu trusu (OPG).

#### 4.2.7 Izolace DNA

Celková DNA byla extrahována přímo z trusu pomocí komerčního kitu QIAMP DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

##### Postup:

1. K 200 mg trusu v mikrozkušavce přidat 0,861,2 ml Lysis Buffer P, 100 mg skleněných kuliček (Ø 0,5 mm) a rozbít po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s v homogenizátoru (FASTPREP - 24 Instrument, MP Biomedicals, USA).
2. Homogenizovaný vzorek inkubovat v termobloku 10 minut při 95 °C, poté centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
3. Veškerý supernatant přenést do InviAdsorb zkumavek, zvortexovat, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě a centrifugovat 3 minuty při 14 000 g.
4. Supernatant přepipetovat do čistých 1,5 ml mikrozkušavek, centrifugovat 3 minuty při 14 000 g.
5. Do čistých 1,5 ml mikrozkušavek napipetovat 25 µl Proteinase K, přidat 400 µl supernatantu a zvortexovat.
6. Inkubovat v termobloku 10 minut při 70 °C připipetovat 400 µl Binding Buffer P a zvortexovat.
7. Přenést veškerý objem na kolony se sbírnými mikrozkušavkami, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a následně centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
8. Vylít včasně odpad ze sbírných mikrozkušavek, napipetovat 500 µl Wash I a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
9. Vylít odpad ze sbírných mikrozkušavek, napipetovat 800 µl Wash II a centrifugovat 1 minutu 14 000 g.
10. Znovu vylít odpad a opět centrifugovat 3 minuty při 14 000 g.
11. Kolonu dát na čistou 1,5 ml mikrozkušavku a napipetovat 200 µl Elution Buffer D (předehřátého) na kolonu, inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.
12. Získanou DNA skladovat při teplotě -20 °C.

## 4.2.8 Genotypizace

Specifická DNA kryptosporidií v testovaných vzorcích byla detekována pomocí nested PCR amplifikující gen kódující malou podjednotku rRNA (~ 830 bp; SSU; Jiang et al. 2005; Xiao et al. 1999), aktin (~ 1066 bp, Sulaiman et al. 2002) a 70 kDa Heat Shock Protein (HSP70; ~ 1950 bp; Sulaiman et al. 2000). Celkový objem reakcí smí pro primární i sekundární PCR reakci byl 20  $\mu$ l. Primární PCR obsahovala 2  $\mu$ l templátové DNA, 10  $\mu$ l 2 $\times$  AmpONETM HS-Tag premix (GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Soul, Jižní Korea), 200 nM každého primeru (GeneriBiotech, Hradec Králové, Česká republika) a molekulární vodu do objemu 20  $\mu$ l. Sekundární reakce byla shodná s primární, vyjma použití 2  $\mu$ l primární PCR místo templátové DNA. Každá amplifikovaná sada obsahovala pozitivní (DNA *C. parvum* a *C. muris*) a negativní kontrolu (molekulární voda). Reakční podmínky v termocycleru byly nastaveny dle tabulky 2. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 365.

**Tabulka 2.** Reakční podmínky v termocycleru pro amplifikaci genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU), aktin a gen tepelného šoku 70 kDa (HSP70).

	<b>Primární reakce</b>	<b>Sekundární reakce</b>	<b>čas</b>
<b>Počáteční denaturace</b>	94 °C	94 °C	3 min
<b>Počet opakování</b>	35	35	
<b>Denaturace</b>	94 °C	94 °C	45 s
<b>Nasedací teplota</b>	<b>SSU</b>	55 °C	45 s
	<b>aktin</b>	50 °C	45 s
	<b>HSP70</b>	55 °C	45 s
<b>Elongace</b>	72 °C	72 °C	60 s
<b>Finální elongace</b>	72 °C	72 °C	7 min
<b>Zchlazení</b>	4 °C	4 °C	---

**Tabulka 3.** Sekvence použitých primerů pro amplifikaci části genu kódujícího SSU *Cryptosporidium* spp.

---

<b>Primární reakce</b>	<b>F1</b>	5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'
	<b>R1</b>	5'-CCCATTTCTTCGAAACAGGA-3'
<b>Sekundární reakce</b>	<b>F2</b>	5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'
	<b>R2</b>	5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'

---

**Tabulka 4.** Sekvence použitých primerů pro amplifikaci části genu kódujícího aktin *Cryptosporidium* spp.

---

<b>Primární reakce</b>	<b>F1</b>	5'-ATGRGWGAAGAAGWARYWCAAGC-3'
	<b>R1</b>	5'-AGAARCAAYTTTCTGTGKACAAT-3'
<b>Sekundární reakce</b>	<b>F2</b>	5'-CAAGCWTTTRGTTGTTGAYAA-3'
	<b>R2</b>	5'-TTTCTGTGKACAATWSWTGG-3'

---

**Tabulka 5.** Sekvence použitých primerů pro amplifikaci části genu kódujícího HSP70 *Cryptosporidium* spp.

---

<b>Primární reakce</b>	<b>F1</b>	5'-ATGTCTGAAGGTCCAGCTATTGGTATTGA-3'
	<b>R1</b>	5'-TTAGTCGACCTCTTCAACAGTTGG-3'
<b>Sekundární reakce</b>	<b>F2</b>	
	<b>R2</b>	5'-CAACAGTTGGACCATTAGATCC-3'

---

## 4.2.9 Gelová elektroforéza

Výsledný produkt sekundární PCR byl vizualizován na 1% agarózovém gelu s přidáním ethidium-bromidu pomocí UV záření o vlnové délce 302 nm a zdokumentován pomocí kamery.

**Chemikálie:** agaróza (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany), TAE pufr (50× TAE pufr (242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA o pH 8,00), Ethidium-bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 100 bp DNA Ladder (Sigma-Aldrich).

### Postup:

1. Smíchat odpovídající množství agarózy s TAE pufr (např. 0,4 g agarózy se 40 ml TAE pufru).
2. Směs rozpustit v mikrovlnné troubě a poté zchladit pod tekoucí studenou vodou na teplotu přibližně 60 °C.
3. Do směsi přidat 1 ml ethidium-bromidu (koncentrace 10 mg/ml) a zhomogenizovat.
4. Gel nalít do připravené formy s hřebeny a nechat ztuhnout zhruba po dobu 30 minut.
5. Vyjmout hřebeny a vložit gel do elektroforézní vany naplněné TAE pufr, gel musí být celý ponořený.
6. Do prvních jamek v gelu nanést 10 µl Ladderu a do dalších nanést produkty sekundární PCR.
7. Nastavit napětí 80-120 V po dobu 30 minut (do separace fragmentů DNA)
8. Pro vizualizaci DNA fragmentů použít UV transiluminátor.



#### 4.2.10 Izolace z gelu

**Součásti kitu:** Column Preparation solution, Gel Solubilization Solution, Wash Solution Concentrate G, Elution Solution

**Postup:**

1. Fragment DNA vyříznout z gelu čistým skalpelem a dát do připravené 1,5 ml mikrokumavky.
2. Do mikrokumavky s fragmentem gelu přidat 500 µl Gel Solubilization Solution.
3. Mikrokumavku ponechat v inkubátoru po dobu 10 minut při 50 °C a každé 2-3 minuty promíchat.
4. Vložit PCR vodu na eluci do inkubátoru na teplotu 65 °C.
5. Na sestavenou Binding Column G napipetovat 500 µl Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
6. K rozpuštění gelu pipetovat 150 µl isopropanolu a promíchat.
7. Na kolonu (Binding Column G) nanést veškerý objem vzorku a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
8. Ze sbírné mikrokumavky vylít odpad a opět použít s kolonou.
9. Na kolonu pipetovat 700 µl Wash Solution G a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
10. Ze sbírné mikrokumavky vylít odpad a opět použít s kolonou.
11. Kolonu centrifugovat 1 minutu při 14 000 g bez jakýchkoli přísad roztoku.
12. V centrifuze otočit kolonu o 180 ° a centrifugovat 3 minuty při 14 000 g.
13. Do 1,5 ml mikrokumavky vložit kolonu a napipetovat 30 µl PCR vody předešlé na 65 °C přímo na střed kolony.
14. Inkubována 1 minutu při laboratorní teplotě a poté centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.

#### **4.2.11 Sekvence vzorků a fylogenetické analýzy**

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány pomocí sekundárních primerů v komerčních laboratořích za použití sekvenčního kitu BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Získané nukleotidové sekvence byly analyzovány v programu Chromas Pro 2.1.4. (Technelysium, Pty, Ltd., SouthBrisbane, Austrálie) a porovnány s dříve publikovanými sekvencemi různých druhů a genotypů kryptosporidií pomocí programu MAFFT verze 7 (Mafft, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Dataset zarovnaných sekvencí byl ručně zkontrolován v programu BioEdit. Fylogenetické analýzy byly vykonány v programu MEGA 7 na základě nejlepšího fylogenetického modelu (DNA/Protein model, je částí programu MEGA 7) a byl zkonstruován fylogenetický strom metodou Maximum likelihood (ML) se substitučním modelem, který nejlépe vyhovoval testovanému souboru sekvencí na základě Bayesiánského informačního kritéria. Pro alignmenty SSU a HSP70 byl vybrán Tamuraův parametrizovaný model a pro alignmenty aktinu GTR model. Podpora větví pro všechny modely byly získány na základě 1000 opakování. Fylogenetické stromy byly upraveny do finální podoby pomocí programu CorelDraw X7. Sekvence SSU, aktinu a HSP70 získané v této práci byly uloženy v GenBank pod evidenčními čísly MG699168 a MG699179.

#### **4.2.12 Odběr vzorků orgánů a tkání**

Zvíata byla humánně usmrcena dle příslušné legislativy. Pitva bylo provedeno úplné vyšetření všech gastrointestinálních orgánů dvou zvířat z každé skupiny (6 a 15 dní po infekci). Byly odebrány vzorky tkání ze žaludku, tenkého střeva a tlustého střeva. Tenké i tlusté střevo bylo rozděleno na úseky o velikosti 1 cm a z každého úseku byly odebrány vzorky pro PCR analýzy (4.2.8), histologii (4.2.12) a skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) (4.2.13). Na každou část odebíraného orgánu byla použita sada sterilních nástrojů (nůžky, pinzeta a skalpel).

#### **4.2.13 Příprava histologických preparátů**

Vzorky pro histologii byly fixovány ve 4% pufovaném formalinu a zpracovány obvyklou parafinovou metodou. Histologické řezy o tloušťce 5 µm byly barveny hematoxylinem a eosinem (HE) a metodou PAS (periodic acid Schiff).

### **Barvení hematoxylin-eosinem (HE)**

**Chemikálie:** hematoxylin (0,5 g hematoxylinu, 500 ml dH<sub>2</sub>O; 25 g síranu hlinito-amonného; 0,1 g jodi nanu sodného; 20 ml kyseliny octové), eosin (0,5 g eosin; 250 ml dH<sub>2</sub>O; 10 ml kyseliny octové).

#### **Postup:**

1. Připravit si odparifinované ezy.
2. Vzorke obarvit 10 minut v hematoxylinu.
3. Oplachovat 10 minut pod tekoucí vodou.
4. Barvit 5 minut v eosinu.
5. Opláchnout v destilované vodě.
6. Opláchnout v 96% alkoholu, butylalkoholu a xylenu.

### **Barvení periodic acid shiff (PAS)**

**Chemikálie:** Schiffovo reagens (100 ml H<sub>2</sub>O, 1 g basický fuchsin, 10 ml 1N kyselina chlorovodíková, 1 g pyrosi i tan draselný, 0,5 g aktivního uhlí), si i itá voda (5 ml 1N kyseliny chlorovodíkové, 0,5 g pyrosi i tan draselný, 100 ml destilované H<sub>2</sub>O), roztok kyseliny jodisté (0,8 g ve 100 ml destilované H<sub>2</sub>O), hematoxylin, 96% alkohol, butylalkohol, xylen.

#### **Postup:**

1. Připravit si odparifinované ezy.
2. Vložit je do roztoku kyseliny jodisté na 10 minut.
3. Oplachovat 10 minut pod tekoucí vodou.
4. Vložit do Schiffova reagens na 30 minut.
5. Oplachovat 5 minut v lázni si i ité vody.
6. Oplachovat 15 minut pod tekoucí vodou.
7. Ponořit do hematoxylinu na 102 minuty.
8. Opláchnout v 96% alkoholu, butylalkoholu a xylenu.

### **Montování nabarvených ez po barvení HE a PAS**

#### **Postup:**

1. Kápnout kapku kanadského balzámu na preparát na podložitím skle.
2. Opatrně vložit krycí sklíčko, aby se nevytvořily vzduchové bublinky.
3. Připadné bublinky vytlačit mírným tlakem na krycí sklíčko.
4. Hotový preparát vložit do termostatu (37 °C), kde zaschne montovací medium.

#### 4.2.14 Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM)

**Chemikálie:** 3% glutaraldehyd; 0,1 M kakodylátový pufr; 2% oxid osmielý; acetonová voda (25%, 75% a 100% roztok), kapalný CO<sub>2</sub>

##### Postup:

1. Vzorky fixovat přes noc při 4 °C v glutaraldehydu v kakodylátovém pufru.
2. Promýt v kakodylátovém pufru 3× 15 minut.
3. Fixovat v oxidu osmielém v kakodylátovém pufru po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě a následně promýt 3× 15 minut v kakodylátovém pufru.
4. Po dehydrataci vzestupnou acetonovou vodou vzorky vysušit metodou kritického bodu (CPD). Vzorky vysušit v tlakové komoře pomocí kapalného CO<sub>2</sub>.
5. Vysušené vzorky nalepit pomocí oboustranné lepicí pásky na hliníkový terčík.
6. Nalepené vzorky pozlatit a prohlédnout pomocí elektronového mikroskopu JOEL JSM-7401F-FE SEM.

#### 4.2.15 Design experimentálních prací

Ústřední osmitýdenních potkan (*Rattus norvegicus*), plemeno BALB/c myš (*Mus musculus*), plemeno pískomil mongolských (*Meriones unguiculatus*), plemeno čtyřtýdenních selat (*Sus scrofa*) a plemeno dvanáctitýdenních telat (*Bos taurus*) bylo použito pro experimentální infekční studii s *C. occultus*. Dva týdny před pokusnými infekcemi byla zvířata denně vyšetřována na přítomnost specifické DNA a oocysty kryptosporidií. Pro prevenci kontaminace prostředí oocystami byli laboratorní hlodavci umístěni v plastových klecích, krměni sterilizovanou stravou a sterilizovanou vodou *ad libitum*. Selata a telata byla chována v experimentální stáji na sterilizované podestýlce a bylo jim podáváno sterilní krmivo a voda *ad libitum*. Každé zvíře bylo orálně infikováno množstvím 5000 vyčištěných oocyst suspendovaných ve 200 µl (hlodavci), nebo ve 20 ml (selata a telata) deionizované vody. Každé zvíře bylo individuálně vyšetřováno na přítomnost oocyst a specifické DNA denně od 3. do 30. dne po infekci. Denně byla také zaznamenávána konzistence a barva trusu, a celkový zdravotní stav zvířat.

#### **4.2.16 Etické prohlášení**

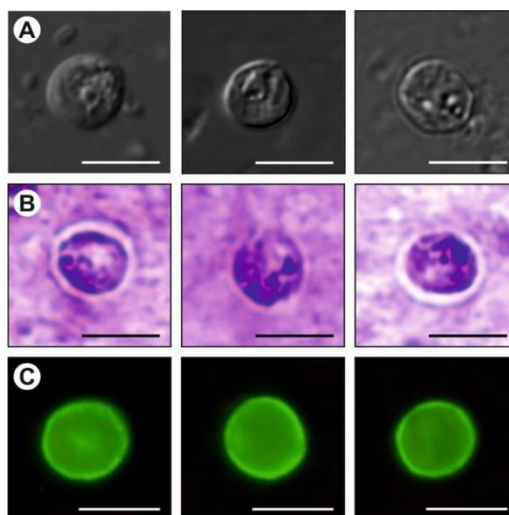
Ošetřovatelé zvířat měli při každém vstupu do pracovního prostoru s experimentálními zvířaty na sobě jednorázové kombinézy, návleky na boty a rukavice. Veškerá podestýlka, trus a jednorázový ochranný oděv byly umístěny v plastových sáčkích, odstraněny z budovy a zlikvidovány asanací službou. Veškeré chovné prostory a nádoby, krmění a experimentální postupy vyhovovaly požadavkům podle protokolů schválených etickou komisí Biologického centra Akademie věd České republiky a Resortní komisí na ochranu zvířat proti týrání (protokoly č. 114/2013 a 52/144).

## 5. Výsledky

Na základ získaných údaj v této práci jsme navrhli popsání kryptosporidie známé jako *C. parvum* VF383 nebo *Cryptosporidium suis*-like jako nový druh rodu *Cryptosporidium* a pojmenovali jsme ho *Cryptosporidium occultus*. Popis druhu je uveden dále.

### 5.1 Morfometrie oocyst

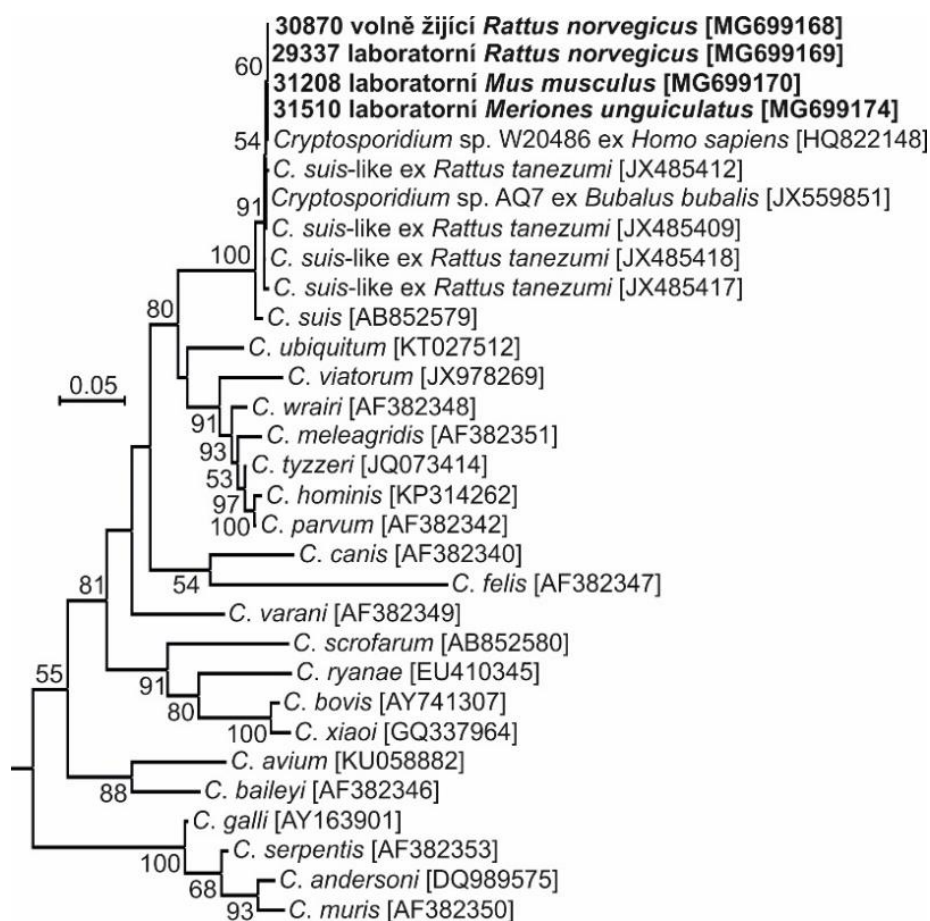
Oocysty *C. occultus* ze ty p irozen infikovaných hn dých potkan byly morfometricky identické s t mi z experimentáln infikovaných potkan (kapitola 5.5) a morfometricky podobné druhu *C. parvum* získaného z p irozen infikovaného 25- denního telete. Mikroskopické vy- et ení nát r trusu p irozen i experimentáln infikovaných potkan ukázalo, že oocysty *C. occultus* se pomocí barvení anilin-karbol-methylvioleti barví shodn jako ostatní druhy a genotypy kryptosporidií (Obrázek 2B). Oocysty *C. occultus* zna ené FITC konjugovanými polyklonálními protilátkami proti st n oocyst kryptosporidií m ly typickou zelenou fluorescenci (Obrázek 2C).



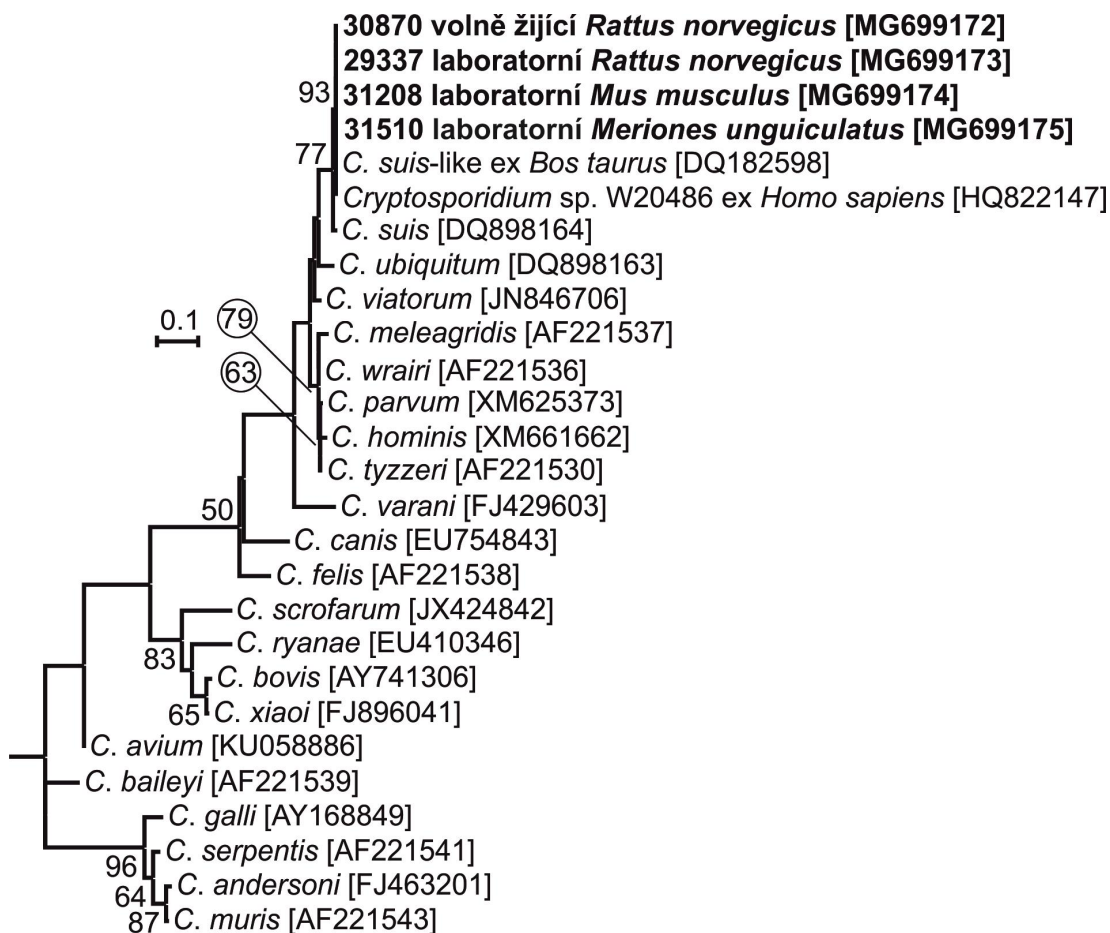
**Obrázek 2.** Oocysty *Cryptosporidium occultus* (A) diferenciální interferen ní kontrast, (B) barvení anilin-karbol-methylvioletí a (C) zna ení FITC konjugovanými polyklonálními protilátkami proti st n oocyst *Cryptosporidium* spp. M ítko = 5  $\mu$ m.

## 5.2 Molekulární analýzy

Fylogenetické analýzy částí sekvencí SSU, aktinu a HSP70 prokázaly, že všechny tyto izoláty *C. occultus* pocházející z divokých potkanů byly identické mezi sebou a se všemi ostatními izoláty získanými z experimentálně infikovaných zvířat. Dále byly tyto sekvence 100% shodné se sekvencemi *C. parvum* VF383 [DQ182599, HQ822148, a DQ182598] uvedenými v databázi GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) získaných z pflvůkavců, potkanů a lidí. Fylogenetické analýzy založené na částech sekvencí SSU, aktinu a HSP70 ukázaly, že *C. occultus* je nejvíce příbuzný s *C. suis* s 99,7%, 98,0%, respektive 97,9% podobností na zmíněných lokusech (Obrázky 365).

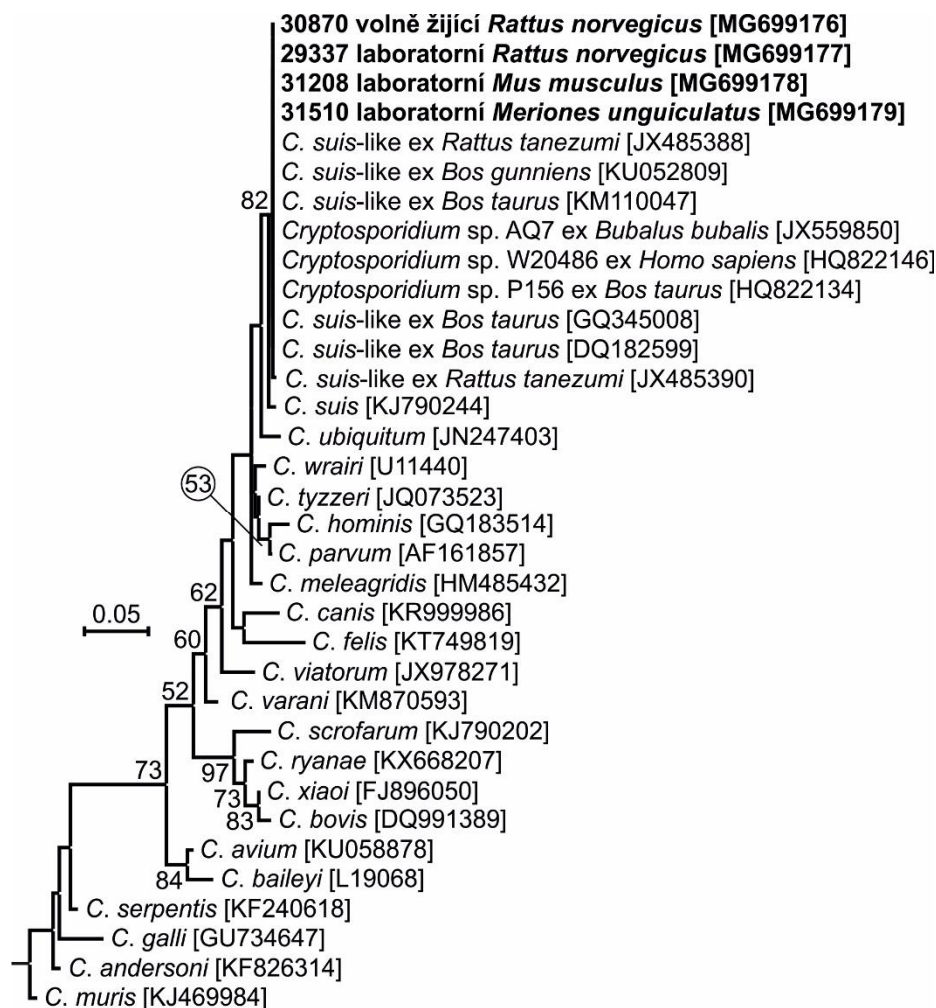


**Obrázek 3.** Fylogenetický strom ukazující vztahy mezi izoláty *Cryptosporidium occultus* použitých v této studii (zvýrazněno) a dalšími druhy rodu *Cryptosporidium* zkonstruovaný na základě částí sekvencí genu kódujícího malou podjednotku rRNA (519 nukleotidových bází v konečném datovém souboru) metodou maximální pravděpodobnosti (ML) a modelem T92 + G v programu MEGA 6. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrap ML vyšší než 50%. Mířky délky v tví je uvedeno u stromu. Jako outgroup byla použita sekvence *Plasmodium falciparum* (JQ627151).



**Obrázek 4.** Fylogenetický strom ukazující vztahy mezi izoláty *Cryptosporidium occultus* použitých v této studii (zvýrazněno) a dalšími druhy rodu *Cryptosporidium* zkonstruovaný na základě sekvencí genu kódujícího aktin (733 nukleotidových bází v koněném datovém souboru) metodou maximální pravděpodobnosti (ML) a modelem GTR + G + I v programu MEGA 6. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrap ML vyjádřenou v procentech. Mířko délky v tví je uvedeno u stromu. Jako outgroup byla použita sekvence *Plasmodium falciparum* (M22719).





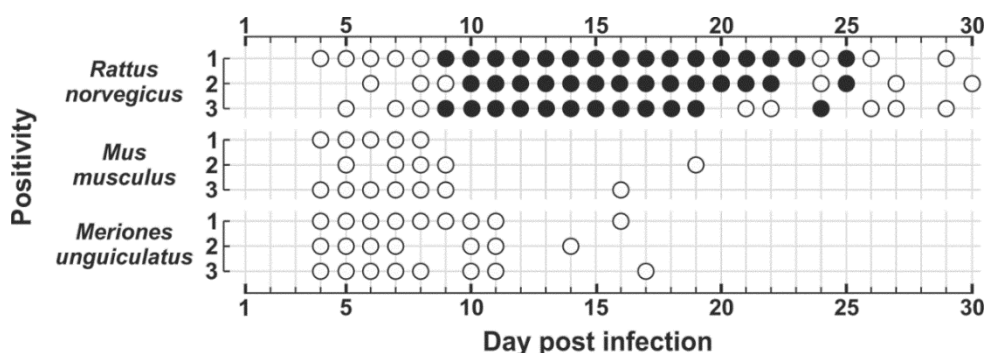
**Obrázek 5.** Fylogenetický strom ukazující vztahy mezi izoláty *Cryptosporidium occultus* poufitych v této studii (zvýrazn no) a dalšími druhy rodu *Cryptosporidium* zkonstruovaný na základ áste ných sekvencí genu kódujícího 70 kDa Heat Shock Protein (287 nukleotidových bází v kone ném datovém souboru) metodou maximální pravd podobnosti (ML) a modelem GTR + G + I v programu MEGA 6. ísla u jednotlivých uzl udávají hodnotu bootstrap ML vy–í nehl 50 %. M ítko délky v tví je uvedeno u stromu. Jako outgroup byla poufita sekvence *Plasmodium falciparum* (NC 004328.2).

### 5.3 Pr b h infekce

Experimentáln infikovaná selata a telata nevyly ovala v pr b hu celého experimentu ani oocysty *C. occultus*, ani specifickou DNA tohoto druhu kryptosporidie. Také vy–et ení ástí zafívacího traktu pomocí elektronové mikroskopie a histologických metod neprokázalo p ítomnost fládných vývojových stadií *C. occultus* u t chto zví at.

Pískomilové, laboratorní my–i a potkani za ali vyly ovat oocysty *C. occultus* od 4. afl 5. dne po infekci (DPI), kdy byla u v–ech zví at v pokusu detekována specifická

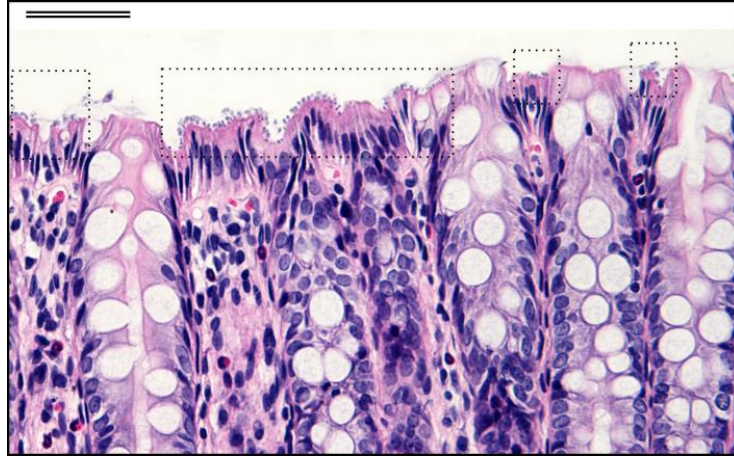
DNA této kryptosporidie (Obrázek 6). Mikroskopické vyšetření trusu prokázalo přítomnost oocyst *C. occultus* pouze u laboratorních potkanů (Obrázek 6). Potkanů vylučovali oocysty/specifickou DNA až do konce experimentu (30 DPI). Průměrný počet infikovaných pískomilů a myší nevylučoval mikroskopicky detekovatelné oocysty *C. occultus* v průběhu celého experimentu a nepostavili vylučovat specifickou DNA *C. occultus* mezi 6. a 19. DPI (Obrázek 6). Intenzita infekce u potkanů se pohybovala od 2 000 do 370 000 OPG a nejvyšší byla mezi 11. a 17. DPI s denním průměrem 120 000 OPG.



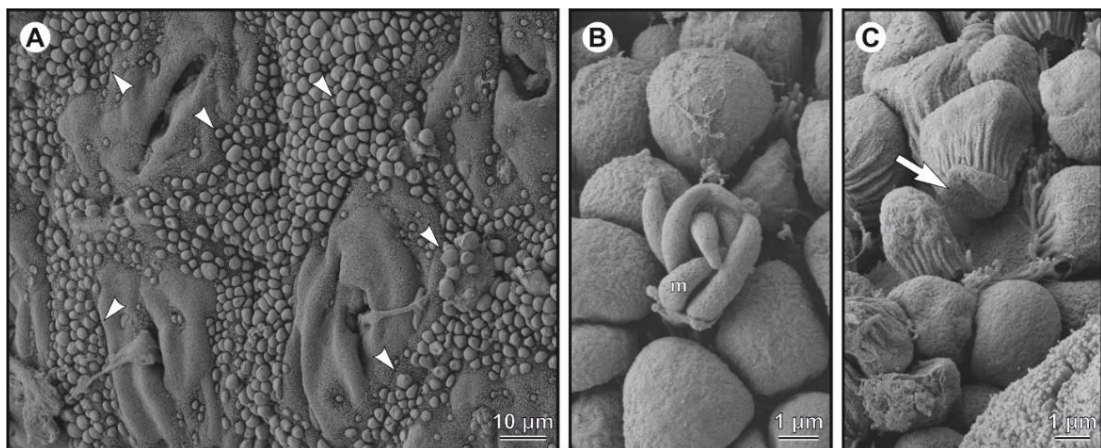
**Obrázek 6.** Průběh infekce *Cryptosporidium occultus* u potkanů (*Rattus norvegicus*), BALB/c myší (*Mus musculus*) a pískomilů mongolských (*Meriones unguiculatus*) na základě molekulárního a mikroskopického vyšetření trusu. Prázdný kruh označuje prokázání specifických DNA fragmentů, plný kruh označuje mikroskopickou přítomnost oocyst.

## 5.4 Lokalizace infekce

Vyšetření tkání gastrointestinálního traktu hlodavců pomocí histologie, elektronové mikroskopie a PCR analýz odhalilo přítomnost vývojových stádií *C. occultus* a jejich specifické DNA pouze v tlustém stěvě (Obrázek 7 a 8). Na vnitřních orgánech nebyly pozorovány žádné makroskopické změny. Ve srovnání s potkany, kde byla infekce epitelálních buněk masivní (Obrázek 8), byla u myší a pískomilů pozorována pouze sporadická infekce. U potkanů byl epitel v celé délce tlustého stěva hustě pokryt vývojovými stadii *C. occultus* (Obrázek 7). Infikované epitelální buňky byly mírně dilatovány. U žádného z infikovaných hlodavců nebyly detekovány žádné závažné změny v lamina propria tlustého stěva. V průběhu celého experimentu nebyl u zvířat pozorován výskyt průjmu nebo zhoršení zdravotního stavu.



**Obrázek 7.** Vývojová stádia *Cryptosporidium occultus* (pole označené p eru-ovanou arou) na mukózním fláznatém epitelu z tlustého st eva laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) experimentálně infikovaného 5 000 oocystami *Cryptosporidium occultus* a usmrceného 15 dní po infekci. Vzorek st eva barven hematoxylinem a eosinem. M ěřítko = 50  $\mu$ m.



**Obrázek 8.** Mikrofotografie epitelu tlustého st eva laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) ze skenovacího elektronového mikroskopu. Potkan experimentálně infikovaný 5 000 oocystami *Cryptosporidium occultus* a usmrcen 15 dní po infekci. (A) Epitel trávníku pokryt vývojovými stádii *Cryptosporidium occultus* (hroty -ípek), (B) Roztrhlý parazitoforní vak s uvolněnými merozoity typu I (m), (C) Detail při chycení parazitoforního vaku na hostitelskou bu ňku (-ipka). M ěřítka jsou uvedena na každém obrázku.

## 5.5 Taxonomické shrnutí

**Popis:** Oocysty jsou vylučovány trusem vysporulované, obsahující 4 sporozoity a zbytkové trusové tělíčko oocysty. Sporulované oocysty ( $n = 30$ ) mají  $4,6665,53 \mu\text{m}$  (průměr  $= 5,20 \mu\text{m}$ )  $\times 4,4765,44 \mu\text{m}$  (průměr  $= 4,94 \mu\text{m}$ ) s poměrem délky k šířce 1,05 (1,006–1,17) (obrázek 2A). Morfologie a morfometrie jiných vývojových stádií není známa.

**Typový hostitele:** potkan (*Rattus norvegicus*)

**Typové lokality:** české Budějovice, Cizkrajov, Lidčovice a Telč (Česká republika)

**Místo infekce:** tlusté střevo

**Další hostitelé:** krysa (*Rattus tanezumii*), myš domácí kmen BALB/c (*Mus musculus*), pískomil mongolský (*Meriones unguiculatus*), skot (*Bos taurus*), jak domácí (*Bos grunniens*), buvol (*Bubalus bubalis*) a člověk (*Homo sapiens*)

**Rozšíření:** Austrálie, Brazílie, Kanada, Čína, Dánsko, Anglie, Indie a Filipíny

**Uložený materiál:** Sklípka s oocystami a vyzolovaná DNA jsou uloženy v depozitu Parazitologického ústavu, Biologické centrum AV ČR, v.v.i. Česká republika. Částečné sekvence genů SSU, aktinu a HSP70 byly uloženy v GenBank (referenční čísla MG699168–MG699179).

**Etymologie:** Pro nejasnou hostitelskou specifitu byl název druhu odvozen od předavného jména *occultus* znamenající skrytý.

**Diferenciální diagnostika:** Vítovec et al. (2006) ukázali, že rozdíly ve velikosti mezi oocystami *C. suis* a *C. parvum* jsou statisticky významné ( $P < 0,01$ ). Vzhledem k tomu, že *C. occultus* má velmi podobnou velikost jako oocysty *C. parvum*, jsou oocysty *C. occultus* morfologicky nerozlišitelné od *C. parvum*, ale odlišitelné od oocyst *C. suis*. Oocysty *C. occultus* se barví pomocí barvení anilin-karbol-methylvioletí jako oocysty jiných druhů a genotyp rodu *Cryptosporidium* a křížově reagují se specifickými protilátkami vyvinutými primárně proti *C. parvum*. Tento druh lze rozlišit od jiných druhů kryptosporidií pomocí sekvencí genů kódujících SSU, aktin a HSP70.

## 6. Diskuze

*Cryptosporidium suis-like* (dále jen *C. occultus*) bylo pojmenováno na základě blízké fylogenetické příbuznosti této kryptosporidie s druhem *C. suis*, který je hostitelsky specifický pro prasata. Experimentální infekce provedené v rámci této studie prokázaly, že *C. occultus* není infekční pro prasata. Tyto výsledky spolu s absencí dříve zprovozněného výskytu *C. occultus* jak u volně žijících, tak i hospodářsky chovaných prasat, nás vede k závěru, že prasata nejsou přirozenými hostiteli *C. occultus* a tato kryptosporidie není navzdory úzkému fylogenetickému vztahu k *C. suis* jeho genetickou variantou (Kváček et al. 2018; Ryan et al. 2004). Na rozdíl od předchozích studií, které popisují přirozený výskyt u turovitých (16 kusů skotu, 2 jehňata a 1 buvola) na čtyřech kontinentech (Evropa, Asie, Austrálie a Jižní Amerika; Khan et al. 2010; Langkjær et al. 2007; Li et al. 2016; Ma et al. 2015), jsme experimentálně prokázali, že *C. occultus* není infekční pro telata. Přirozené infekce *C. occultus* u volně žijících potkanů (Ng-Hublin et al. 2013) nás vedly k domněnce, že právě potkani by mohli být přirozenými hostiteli. Experimentálně jsme prokázali, že *C. occultus* je infekční pro laboratorní potkany a způsobuje dlouhotrvající infekci (>30 dnů) v tlustém střevě. Zjistili jsme, že myši a pískomilové jsou za experimentálních podmínek také vnímaví, naznačuje, že *C. occultus* může infikovat širokou škálu hlodavců, i když u hlodavců, jiných než potkanů, neexistuje žádný důkaz o přirozených infekcích (Kváček et al. 2014b).

V souladu se zjištěními z předchozí studie na prasatech infikovanými *C. suis*, druhem, který také infikuje tlusté střevo (Vítovec et al. 2006), potkani infikovaní *C. occultus* vylučovali méně oocyst, než by se dalo předvídat z masivní infekce epitelu tlustého střeva. To je v rozporu se studiemi provedenými na kryptosporidiích infikujících tenké střevo, kde intenzita vylučování oocyst odpovídala intenzitě výskytu vývojových stádií pozorovaných v epitelu (Kváček et al. 2016, 2014a; Ren et al. 2012; Vítovec et al. 1992).

Již zmíněný přirozený výskyt *C. occultus* u skotu, jehňat a buvolů (Khan et al. 2010; Langkjær et al. 2007; Li et al. 2016; Ma et al. 2015) mohl být způsoben zejména vodou nebo krmivem kontaminovaným potkaními výkaly. Obdobně byla v trusu a kejdlu prasat detekována specifická DNA *C. muris* a *C. tyzzeri*, tedy druhů, které jsou hostitelsky specifické pro myši domácí (Chen et al. 2007; Jenkins et al. 2010; Kváček et al. 2009; Xiao et al. 2006), nicméně experimentálně bylo prokázáno,

fle prasata nejsou k infekci t mito druhy kryptosporidií vnímavá (Kvá et al. 2012). Mechanický pr chod *Cryptosporidium* sp., u nichfl nebyl specifikován hostitel, byl hlá-en u savc , pták a plaz (Crawshaw et al. 1987; Graczyk et al. 1996; Xiao et al. 2004b). Také u ady plaz krmených flivými hlodavci, kte í byli infikovaní *C. muris* a *C. tyzzeri*, byly tyto kryptosporidie detekovány v trusu. Po vy azení infikovaných my-í z potravy do-lo k vymizení p ítomnosti kryptosporidií u sledovaných plaz (Graczyk et al. 1996; Xiao et al. 2004b). Nicmén nem fleme vylou it moflnost, fle izoláty *C. occultus*, které byly d íve detekovány u domácích p eflvákavc , byly subtypem p izp sobeným t mto hostitel m. Izoláty z p eflvákavc byly identické s izoláty z této studie na lokusech SSU a HSP70; nicmén lokus gp60, který je pouflíván pro diferenciaci subtyp s r znou hostitelskou specifitou, nebyl úsp -n amplifikován. Variabilita hostitelského spektra r zných subtyp *Cryptosporidium* uvnit druhu byla popsána d íve u *C. parvum* (v t-ina kmen infikuje telata a lidi, ale subtyp IIc infikuje pouze lidi), *C. andersoni* (pouze kmen Kawatabi je infek ní pro my-í) a *C. ubiquitum* (podtyp XIIa se zdá být specifický pro p eflvákavce, zatímco subtypy XIIb-d se jeví jako specifické pro hlodavce; Li et al. 2014; Matsubayashi et al. 2005; Nichols et al. 2014).

*Cryptosporidium occultus* byl hlá-en i jako p vodce klinické kryptosporidiózy u lidí (Ong et al. 2002) a s ohledem na pr b h infekce nelze pochybovat, fle pacient byl opravdu infikovaný tímto druhem. P estofle se tímto po et lidských patogenních druh a genotyp kryptosporidií roz-í uje, jsou infekce u lidí pravd podobn vzácné.

Morfometrie oocyst *C. occultus* je typická pro intestinální kryptosporidie (Fayer 2010) a oocysty nelze odli-it mikroskopicky od jiných druh a genotyp infikujících potkany (Lv et al. 2009). Nicmén *C. occultus* má men-í oocysty (5,2 m × 4,9 m) nefl fylogeneticky p íbuzné *C. suis* (6,2 m × 5,5 m; Vítovec et al. 2006).

Fylogenetické analýzy ukazují, fle *C. occultus* je geneticky odli-né od známých druh *Cryptosporidium*, v etn druhu *C. suis*. V lokusech SSU, aktin a HSP70 vykazuje *C. occultus* 0,3%, 2,0%, respektive 2,1% odli-nost od *C. suis*. Tyto rozdíly jsou podobné rozdíl m mezi úzce p íbuznými druhy kryptosporidií, jako jsou *C. tyzzeri* a *C. parvum* (0,6 %, 1,3 %, respektive 0,6 %) a *C. cuniculus* a *C. hominis* (0,40 %, 0, respektive 0,6 %). Zatímco sekvence SSU a HSP70 n kterých izolát *C. occultus* pocházejících z Filipín jsou identické, v sekvencích genu pro aktin byla detekována 163 synonymní nukleotidová mutace (Ng-Hublin et al. 2013). Podobn

byly pozorovány polymorfismy aktinu u jiných druhů kryptosporidií, jako jsou *C. hominis* [KU892570 a KT948749] a *C. tyzzeri* [JQ073395, JQ073408 a JQ073413].

Fylogenetické analýzy částí sekvencí genů kódujících SSU, aktin a HSP70 ukázaly, že *Cryptosporidium suis-like* je geneticky odlišný od *C. suis* a dalších popsaných druhů rodu *Cryptosporidium*. Morfologické, genetické a biologické údaje podporují popsaní *Cryptosporidium suis-like* jako nový druh, který jsme pojmenovali *Cryptosporidium occultus*.

## 7. Záv ry

- Oocysty *Cryptosporidium suis*-like (5,20  $\mu$ m  $\times$  4,94  $\mu$ m) jsou morfologicky odli-né od oocyst druhu *C. suis*.
- *Cryptosporidium suis*-like není infek ní pro skot a prasat.
- Oocysty *Cryptosporidium suis*-like jsou infek ní pro potkany.
- Vývojový cyklus *Cryptosporidium suis*-like je lokalizován v tlustém st ev .
- *Cryptosporidium suis*-like lze odli-ít od ostatních druh rodu *Cryptosporidium* na genech kódujících SSU, aktin a HSP70.
- Na základ biologických a molekulárních odli-ností *Cryptosporidium suis*-like od ostatních druh rodu *Cryptosporidium* jsme tuto kryptosporidii navrhli uznat jako samostatný druh a pojmenovat ho *Cryptosporidium occultus*.



## 8.P ehled pouffité literatury a zdroj

- Abeywardena H., Jex A. R., von Samson-Himmelstjerna G., Haydon S. R., Stevens M. A., Gasser R. B. 2013:** First molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from *Bubalus bubalis* (water buffalo) in Victoria, Australia. *Infection Genetics and Evolution* 20: 966102.
- Aiello A. E., Xiao L., Limor J. R., Liu C., Abrahamsen M. S., Lal A. A. 1999:** Microsatellite analysis of the human and bovine genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 46S647S.
- Alves M., Matos O., Antunes F. 2003a:** Microsatellite analysis of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in Portugal: A preliminary study *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50 Suppl.: 5296530.
- Alves M., Xiao L., Sulaiman I., Lal A. A., Matos O., Antunes F. 2003b:** Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 274462747.
- Anderson B. C. 1991:** Experimental infection in mice of *Cryptosporidium muris* isolated from a camel. *Journal of Protozoology* 38: 16617.
- Arcay L., DeBorges E. B., Bruzual E. 1995:** Cryptosporidiosis experimental en la escala de vertebrados. *Parasitology Diagnostics* 19: 20629.
- Arrowood M. J., Donaldson K. 1996:** Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43: 89S.
- Blunt D. S., Khrantsov N. V., Upton S. J., Montelone B. A. 1997:** Molecular karyotype analysis of *Cryptosporidium parvum*: evidence for eight chromosomes and a low-molecular-size molecule. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 4: 11613.
- Caccio S., Camilli R., La Rosa G., Pozio E. 1998:** Establishing the *Cryptosporidium parvum* karyotype by NotI and SfiI restriction analysis and Southern hybridization. *Gene* 219: 73679.
- Caccio S., Homan W., Camilli R., Traldi G., Kortbeek T., Pozio E. 2000:** A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* 120: 2376244.

- Caccio S., Spano F., Pozio E. 2001:** Large sequence variation at two microsatellite loci among zoonotic (genotype C) isolates of *Cryptosporidium parvum*. International Journal for Parasitology 31: 1082-1086.
- Chalmers R. M., Ferguson C., Caccio S., Gasser R. B., Abs El-Osta Y. G., Heijnen L., Xiao L., Elwin K., Hadfield S., Sinclair M., Stevens M. 2005:** Direct comparison of selected methods for genetic categorization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. International Journal of Parasitology 35: 397-410.
- Chen F., Huang K. 2007:** Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* in pigs in eastern China. Zoonoses and Public Health 54: 393-400.
- Crawshaw G. J., Mehren K. G. 1987:** Cryptosporidiosis in zoo and wild animals. In *Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsbericht des 29. Internationalen Symposiums Über die Erkrankungen der Zootiere* (Cardiff, Akademie-Verlag, Berlin), pp. 353-362.
- Current W. L., Upton S. J., Haynes T. B. 1986:** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting chickens. Journal of Protozoology 33: 289-296.
- Egyed Z., Sreter T., Széll Z., Varga I. 2003:** Characterization of *Cryptosporidium* spp.- recent developments and future needs. Veterinary Parasitology 111: 103-114.
- Fayer R. 2004:** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Veterinary Parasitology 126: 37-56.
- Fayer R. 2007:** General biology. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, 2. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-42.
- Fayer R. 2010:** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Experimental Parasitology 124: 90-97.
- Fayer R., Trout J. M., Xiao L., Morgan U. M., Lai A. A., Dubey J. P. 2001:** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dog. Journal of Parasitology 87: 1415-1422.

- Fayer R., Trout J. M., Jenkins M. C. 1998:** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology* 84: 116561169.
- Feng Y., Lal A. A., Li N., Xiao L. 2010:** Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Experimental Parasitology* 127: 2386242.
- Gasser R. B., Abs El-Osta Y. G., Prepens S., Chalmers R. M. 2004:** An improved cold SSCP method for the genotypic and subgenotypic characterization of *Cryptosporidium*. *Molecular and Cellular Probes* 18: 3296332.
- Gasser, R. B., El-Osta, Y. G., Chalmers, R. M. 2003.** Electrophoretic analysis of genetic variability within *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 271962730.
- Gatei W., Das P., Dutta P., Sen A., Cama V., Lal A. A., Xiao L. 2007:** Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infection, Genetics and Evolution* 7: 1976205.
- Graczyk T. K., Cranfield M. R., Fayer R., Anderson M. S. 1996:** Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 323463237.
- Holubová N., Sak B., Horáková M., Hlásková L., Kvatošová D., Menchaca S., McEvoy J., Kváč M. 2016:** *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitology Research* 115: 224362251.
- Horáková M., Ondlová M., Holubová N., Sak B., Kvatošová D., Hlásková L., Konečný R., Sedláček F., Clark M., Giddings C., McEvoy J., Kváč M. 2019:** Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology* 146: 2206233.
- Jenkins M. B., Liotta J. L., Lucio-Forster A., Bowman D. D. 2010:** Concentrations, viability, and distribution of *Cryptosporidium* genotypes in lagoons of swine facilities in the Southern Piedmont and in coastal plain watersheds of Georgia. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 575765763.

- Jiang J., Alderisio K. A., Xiao L. 2005:** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. Applied and Environmental Microbiology 71: 444664454.
- Jirk M., Valigurová A., Koudela B., Kříček J., Modrý D., Tlapeta J. 2008:** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. Folia Parasitologica (Praha) 55: 81694.
- Katsumata T., Hosea D., Ranuh I. G., Uga S., Yanagi T., Kohno S. 2000:** Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 62: 70672.
- Khan S. M., Debnath C., Pramanik A. K., Xiao L., Nozaki T., Ganguly S. 2010:** Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. Veterinary Parasitology 171: 41647.
- Kvá M., Havrdová N., Hlásková L., Daňková T., Kandráč J., Jeřková J., Vítovec J., Sak B., Ortega Y., Xiao L., Modrý D., Chelladurai J. R., Prantlová V., McEvoy J. 2016:** *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. Plos One 11: e0147090.
- Kvá M., Hofmannová L., Hlásková L., Květoňová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B. 2014a:** *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. Veterinary Parasitology 201: 9617.
- Kvá M., Kestřánová M., Květoňová D., Kotková M., Ortega Y., McEvoy J., Sak B. 2012:** *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. Experimental Parasitology 131: 1076110.
- Kvá 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 (*Suis scrofa*). Veterinary Parasitology 31: 2186227.

- Kvá M., McEvoy J., Stenger B., Clark M. 2014b:** Cryptosporidiosis in other vertebrates. In: Cacciò S. M. and Widmer G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, Wien pp. 2376326.
- Kvá M., Ondráková Z., Kvatoňová D., McEvoy J., Vítovec J., Rost M. 2013b:** The Lesser Egyptian Gerbil (*Gerbillus gerbillus*) is a suitable host for the long-term propagation of *Cryptosporidium andersoni*. *Experimental Parasitology* 134: 4386442.
- Kvá M., Ondráková Z., Kvatoňová D., Sak B., Vítovec J. 2007:** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology* 143: 2296233.
- Kvá M., Sak B., Hanzlíková D., Kotilová J., Kvatoňová D. 2009:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. *Parasitology Research* 104: 4256428.
- Kvá M., Vítovec J. 2003:** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Medicine B* 50: 4516457.
- Kvá M., Vlnatá G., Jeřková J., Horáková M., Konečný R., Hlásková L., McEvoy J., Sak B. 2018:** *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *European Journal for Parasitology* 63: 966104.
- Langkjær R. B., Vigre H., Enemark H. L., Maddox-Hyttel C. 2007:** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology* 134: 3396350.
- Leav B. A., Mackay M. R., Anyanwu A., RMO C., Cevallos A. M., Kindra G., Rollins N. C., Bennish M. L., Nelson R. G., Ward H. D. 2002:** Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infection and Immunity* 70: 388163890.
- Li N., Xiao L., Alderisio K., Elwin K., Cebelinski E., Chalmers R., Santin M., Fayer R., Kvá M., Ryan U., Sak B., Stanko M., Guo Y., Wang L., Zhang L., Cai J., Roellig D., Feng Y., 2014:** Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a

- zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases* 20: 2176-224.
- Li P., Cai J., Cai M., Wu W., Li C., Lei M., Xu H., Feng L., Ma J., Feng Y., Xiao L. 2016:** Distribution of *Cryptosporidium* species in Tibetan sheep and yaks in Qinghai, China. *Veterinary Parasitology* 215: 58662.
- Lindsay D. S., Upton S. J., Owens D. S., Morgan U. M., Mead J. R., Blagburn B. L. 2000:** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47: 91695.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 769267699.
- Ma J., Li P., Zhao X., Xu H., Wu W., Wang Y., Guo Y., Wang L., Feng Y., Xiao L. 2015:** Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in dairy cattle, beef cattle and water buffaloes in China. *Veterinary Parasitology* 207: 2206227.
- Mallon M., MacLeod A., Wastling J., Smith H., Reilly B., Tait A. 2003:** Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Molecular Evolution* 56: 4076417.
- 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. *Veterinary Parasitology* 129: 1656168.
- Milá ek P., Vítovec J. 1985:** Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica* 32: 50.
- Morgan-Ryan U. M., Fall A., Ward L. A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R. C., Olson M., Lal A., Xiao L. 2002:** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 4336440.
- Myná ová A., Foitová I., Kvá M., Kv to ová D., Rost M., Morrogh-Bernard H., Nurcahyo W., Nguyen C., Supriyadi S., Sak B. 2016:** Prevalence of

- Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon* spp. and *Giardia intestinalis* in Wild, Semi-Wild and Captive Orangutans (*Pongo abelii* and *Pongo pygmaeus*) on Sumatra and Borneo, Indonesia. Plos One 11: e0152771.
- Nakamura A. A., Meireles M. V. 2015:** *Cryptosporidium* infections in birds – a review. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 24: 2536267.
- Nemejc K., Sak B., Kvetová D., Kernerová N., Rost M., Cama V. A., Kvačala 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. Parasitology Research 112: 114361154.
- Ng-Hublin J. S., Singleton G. R., Ryan U. 2013:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rats and mice from rural communities in the Philippines. Infection Genetics and Evolution 16: 5612.
- Nichols G. L., Chalmers R. M., Hadfield S. J. 2014:** Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. In: Cacciò S. M. and Widmer G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, Wien pp. 2376326.
- O'Donoghue P. J. 1995:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis on man and animals. International Journal for Parasitology 25: 1396195.
- Ong C. S., Eisler D. L., Alikhani A., Fung V. W., Tomblin J., Bowie W. R., Isaac-Renton J. L. 2002:** Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. Emerging Infectious Diseases 8: 2636268.
- Peng M. M., Matos O., Gatei W., Das P., Stantic-Pavlinic M., Bern C., Sulaiman I. M., Glaberman S., Lal A. A., Xiao L. 2001:** A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. Journal of Eukaryotic Microbiology 48 Suppl.: 28S631S.
- Putignani L., Sallicandro P., Alano P., Abrahamsen M. S., Crisanti A., Spano F. 1999:** Chromosome mapping in *Cryptosporidium parvum* and establishment of a long-range restriction map for chromosome VI. FEMS Microbiology Letters 175: 2316238.

- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning C., Jian F., Wang R., Lv C., Wang Q., Arrowood M. J., Xiao L. 2012:** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology* 130: 2746281.
- 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*). *Journal of Parasitology* 90: 7696773.
- Ryan U. M., Xiao L. 2008:** Birds. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.): *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*, Second Edition. CRC Press Boca Raton. pp. 3956418.
- Ryan U. M., Xiao L., Read C., Sulaiman I. M., Monis P., Lal A. A., Fayer R., Pavlasek I. 2003a:** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology* 89: 8096813.
- Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A. A., Pavlásek I. 2003b:** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 430264307.
- Schindler A. R., Abs El-Osta, Y. G., Stevens M., Sinclair M. I., Gasser R. B. 2005:** Capillary electrophoretic analysis of fragment length polymorphism in ribosomal markers of *Cryptosporidium* from humans. *Molecular and Cellular Probes* 19: 3946399.
- Slavin D. 1955:** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.) *Journal of Comparative Pathology* 65: 266262270.
- Stenger B. L., Clark M. E., Kvá M., Khan E., Giddings C. W., Prediger J., McEvoy J. M. 2015:** North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes. *Infection, Genetics and Evolution* 36: 2876293.
- Strong W. B., Nelson R. G. 2000:** Preliminary profile of the *Cryptosporidium parvum* genome: An expressed sequence tag and genome survey sequence analysis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 107: 1632.



- Sulaiman I. M., Lal A. A., Xiao L. 2001:** A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. Journal of eukaryotic microbiology 48 Suppl.: 24S627S.
- Sulaiman I. M., Lal A. A., Xiao L. H. 2002:** Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. Journal of Parasitology 88: 3886394.
- Sulaiman I. M., Morgan U. M., Thompson R. C., Lal A. A., Xiao L. 2000:** Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. Applied and Environmental Microbiology 66: 238562391.
- Tanriverdi S., Markovics A., Arslan M. O., Itik A., Shkap V., Widmer G. 2006a:** Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. Applied and Environmental Microbiology 72: 250762513.
- Tanriverdi S., Widmer G. 2006b:** Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. Infection, Genetics and Evolution 6: 1136122.
- Tyzzar E. E. 1912:** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Archiv für Protistenkunde 26: 3946414.
- Vetterling J. M., Jervis H. R., Merrill T. G., Sprinz H. 1971:** *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. Journal of Protozoology 18: 2436247.
- Vítovec J., Hamadejová K., Landová L., Kvá M., Kv to ová D., Sak B. 2006:** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. Journal of Veterinary Medicine B 53: 2396243.
- Vítovec J., Koudela B. 1992:** Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. Veterinary Parasitology 43: 25636.
- Volf P., Horák P. 2007:** Paraziti a jejich biologie. Praha: Triton. 94696.
- Widmer G., Feng X., Tanriverdi S. 2004:** Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. Methods in Molecular Biology 268: 1776188.

- Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S. J. 2004a:** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 72697.
- Xiao L., Moore J. E., Ukoh U., Gatei W., Lowery C. J., Murphy T. M., Dooley J. S., Millar B. C., Rooney P. J., Rao J. R. 2006:** Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 446164463.
- Xiao L., Morgan U. M., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Thompson R. C., Fayer R., Lal A. A. 1999:** Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 338663391.
- 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. 2004b:** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 8916899.
- Xu P., Widmer G., Wang Y., Ozaki L. S., Alves J. M., Serrano M. G., Puiu D., Manque P., Akiyoshi D., Mackey A. J., Pearson W. R., Dear P. H., Bankier A. T., Peterson D. L., Abrahamsen M. S., Kapur V., Tzipori S., Buck G. A. 2004:** The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 431: 110761112.
- Ziegler P. E., Wade S. E., Schaf S. L., Stern D. A., Nadareski Ch. A., Mohammed H. O. 2007:** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology* 147: 1766184.

## 9.P íloha

Publikace ŠKv M., Vlnatá G., Jelfkov J., Hor i kov M., Kone n R., Hlskov L., McEvoy J., Sak B. 2018: *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. European Journal of Protistology 63: 96 104. doi: 10.1016/j.ejop.2018.02.001. vznikl na základ vsledk tto bakalsk práce.