

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Zootechnických věd

Vedoucí katedry: prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h.c.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Čerstvé a měkké sýry jako potenciální zdroj  
*Encephalitozoon cuniculi*

Autor diplomové práce: Bc. Tereza Vecková

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

Konzultant diplomové práce: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.

České Budějovice, 2020

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 15. dubna 2020

.....  
Bc. Tereza Vecková

Ráda bych poděkovala svým školitelům prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. a doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady. Dále pak všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za pomoc při práci v laboratoři.

Tato práce byla finančně podpořena z projektu Grantové agentury České republiky (17-12871S, řešitel RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.) a Grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (GAJU 028/2019/Z, řešitel prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

## **Abstrakt**

Cílem této práce bylo zjistit výskyt a prevalenci *Encephalitozoon cuniculi* v kozím mléce a trusu, a vyhodnotit účinek pasterizace a sýření při výrobě kozích sýrů na infekčnost spór *E. cuniculi* pro imunodeficitní (SCID, CD4<sup>-/-</sup> a CD8<sup>-/-</sup>) a imunokompetentní (BALB/c a C57BL/6) myši. Za experimentálních podmínek, spóry *E. cuniculi* genotyp II (557 000 spór v 1 g sýra) zůstávají životaschopné v čerstvých sýrech ošetřených pasterizací při teplotě 72 °C po dobu 20 sekund a jsou schopné vyvolat infekci u laboratorních zvířat.

Pomocí nested PCR byla detekována specifická DNA *E. cuniculi* genotyp I a genotyp II v osmi z devíti zakoupených kozích sýrů od různých producentů/chovatelů v České republice v množství od 1 do 202 spór na 1 g sýra. Tyto sýry byly v dávce 60 g/myš zkrmovány po dobu 24 dnů imunodeficitním i imunokompetentním myším. Výsledky experimentu prokázaly, že spóry *E. cuniculi* genotyp I a II zůstávají životaschopné jak v čerstvých, tak měkkých sýrech a jsou schopné vyvolat infekci u laboratorních zvířat.

Na základě zjištěných výsledků, by měly být čerstvé a měkké sýry považovány za potenciální zdroj infekce *E. cuniculi* pro člověka.

**Klíčová slova:** Mikrosporidie; *Encephalitozoon cuniculi*; infekce; prevalence; kozí sýr; tepelné ošetření mléka; sýření

## Summary

The aim of this work was to determine the occurrence and prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in goat's milk and faeces, and to evaluate the effect of pasteurization and curdling in goat cheese production on the infectivity of *E. cuniculi* spores for immunodeficient (SCID, CD4<sup>-/-</sup> and CD8<sup>-/-</sup>) and immunocompetent (BALB / ca C57BL/6) mice. Under experimental conditions, spores of *E. cuniculi* genotype II (557,000 spores in 1 g of cheese) remain viable in fresh cheeses treated by pasteurization at 72 ° C for 20 seconds and are able to cause infection in laboratory animals.

Using nested PCR, specific DNA of *E. cuniculi* genotype I and genotype II was detected in eight of the nine goat cheeses purchased from various producers/breeders in the Czech Republic in the amount of 1 to 202 spores per 1 g of cheese. These cheeses were fed to immunodeficient and immunocompetent mice at a dose of 60 g/mouse within 24 days. The results of the experiment showed that spores of *E. cuniculi* genotype I and II remain viable in both fresh and soft cheeses and are able to cause infection in laboratory animals.

Based on the results obtained, fresh and soft cheeses should be considered as a potential source of *E. cuniculi* infection for humans.

**Key words:** Microsporidia; *Encephalitozoon cuniculi*; infection; prevalence; goat cheese; heat treatment of milk; coagulation

## Obsah

Cíl práce.....	7
1. Úvod .....	8
2. Literární přehled.....	9
2.1 Taxonomie mikrosporidií.....	9
2.2 Životní cyklus .....	9
2.3 <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....	9
2.4 Přenos a zdroj infekce.....	10
2.5 Průběh infekce.....	10
2.6 Terapie .....	11
2.7 Výroba čerstvých sýrů.....	11
3. Materiál a metodika.....	14
3.1 Materiál.....	14
3.1.1 Vzorky mléka a trusu .....	14
3.1.2 Spóry mikrosporidií pro experiment.....	14
3.1.3 Experimentální zvířata .....	14
3.2 Metody .....	15
3.2.1 Izolace DNA z trusu .....	15
3.2.2 Izolace DNA z tkáně, mléka a sýra .....	16
3.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	17
3.2.4 Gelová elektroforéza .....	17
3.2.5 Extrakce z gelu .....	18
3.2.6 Sekvenování a genotypizace .....	19
3.2.7 Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) .....	19
3.3 Ověření účinnosti pasterizace kozího mléka a následné výroby čerstvého sýra na infektivitu <i>Encephalitozoon cuniculi</i> genotyp II.....	21
3.3.1 Příprava čerstvého sýra.....	21
3.3.2 Design experimentu.....	21
3.4 Přítomnost <i>Encephalitozoon cuniculi</i> v komerčně prodávaných čerstvých a měkkých sýrech a ověření infekтивности spór .....	22
3.4.1 Design experimentu.....	22
4. Výsledky.....	23
4.1 Prevalence <i>Encephalitozoon cuniculi</i> u koz.....	23
4.2 Ověření účinnosti pasterizace kozího mléka a následné výroby čerstvého sýra na infektivitu <i>Encephalitozoon cuniculi</i> genotyp II.....	23
4.3 Přítomnost <i>Encephalitozoon cuniculi</i> v komerčně prodávaných čerstvých a měkkých sýrech a ověření infekтивности spór .....	25

<b>5. Diskuse</b> .....	28
<b>6. Závěr</b> .....	32
<b>7. Přehled použité literatury a zdrojů</b> .....	33

## Cíl práce

- Nashromáždit vzorky mléka a trusu od koz z různých chovů v České republice a pomocí molekulárních analýz vyhodnotit prevalenci mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* a určit jejich druh a genotyp.
- Experimentálně ověřit, zda jsou spóry *E. cuniculi* genotyp II infekce schopné po vystavení procesu pasterace a sýření.
- Otestovat sýry z různých chovů v České republice na přítomnost mikrosporidií a s použitím molekulární analýzy vyhodnotit prevalenci mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* a určit jejich druh a genotyp.
- Pomocí experimentální infekce ověřit viabilitu a infektivitu spór u zakoupených sýrů.
- Vyhodnotit získaná data a posoudit potenciální rizika infekcí pro spotřebitele při konzumaci čerstvých a měkkých sýrů.



## 1. Úvod

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární paraziti, kteří se vyvíjí pouze uvnitř živých hostitelských buněk s aktivní látkovou přeměnou. Jejich hostitelé zahrnují různorodá zvířata a jednu skupinu protistů (Ardila-Garcia et Fast 2012). Tyto patogeny jsou však častěji hlášeny jako latentní infekce u imunokompetentních jedinců a vyvolávají otázky o možném riziku reaktivace po indukované imunosupresi (Kotková et al. 2013).

Zhruba před 150 lety byla poprvé popsána první mikrosporidie, *Nosema bombycis*, která byla zodpovědná za zhoubné onemocnění housenek bource morušového (Nägeli 1857). První popis mikrosporidiové infekce byl u laboratorních králíků s encefalitidou v roce 1922 (Wright et Craighead 1922), následně byla tato mikrosporidie studována, popsána a pojmenována jako *Encephalitozoon cuniculi* (Levaditi et al. 1923). Tento název vědci používali až do roku 1964, kdy bylo navrženo, aby se rod *Encephalitozoon* přejmenoval na *Nosema* kvůli podobnosti s organizmy nalezenými v členovcích (Lianson et al. 1964). Název *Nosema cuniculi* se zachovalo až do roku 1971, kdy Shadduck a Pakes (1971) navrhli navrácení k původnímu názvu. Nejnovější studie ukazují, že mikrosporidie jsou všudypřítomné a jsou nalézány v obratlovcích i bezobratlých a u některých protist (Ardila-Garcia et Fast 2012).

Vzhledem k výskytu *E. cuniculi* v kravském mléce (Kváč et al. 2016, Tomanová 2015) a šíření mikrosporidií do celého hostitele (Kotková et al. 2013), může kozí mléko a výrobky z něj představovat potenciální zdroj infekce pro konzumenta. Tato diplomová práce by měla zodpovědět základní otázky, zda mikrosporidie druhu *E. cuniculi* mohou být přítomny v kozím mléce a jestli sýry vyrobené z mléka mohou být zdrojem infekce pro člověka.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Taxonomie mikrosporidií

Mikrosporidie náleží do kmene Microsporidia, třídy Microsporea a řádu Microsporida (Vivarés et al. 2002). První mikrosporidie byly popsány v roce 1857 (Nägeli 1857) a během více než 150 let formální existence prošly řadou změn (Keeling 2014). Původně byly řazeny mezi prvoky (Protozoa) a dokonce byly po určitý čas pokládány za jedny z nejstarších organismů. Molekulárně-fylogenetické studie však ukázaly, že mikrosporidie patří do říše hub (Fungi), nebo jsou s nimi v úzkém příbuzenském vztahu (Volf et Horák 2007). V současné době známe kolem 2 000 druhů mikrosporidií, řazených asi do 200 rodů (Vávra 2017) a z toho 14 druhů může infikovat člověka (Sak et al. 2011).

### 2.2 Životní cyklus

Většina druhů mikrosporidií nemá stejný životní cyklus, ale pro všechny je společná intracelulární a extracelulární fáze. Infekčním stádiem je spóra vyznačující se přítomností injekční struktury známé jako polární trubice, pomocí které infikuje hostitelskou buňku (Ardila-Garcia et Fast 2012). Za příznivých podmínek je trubice vystřelena přímo do cytoplasmy buňky hostitele a infekční obsah spóry proniká do hostitelské buňky. Následně mikrosporidie absolvuje dvě vývojové fáze, merogonii a sporogonii. Merogoniální buňky nedisponují klasickými mitochondriemi, ale mají mitosomy, drobné, dvěma membránami obalené váčky, které jsou pozůstatky mitochondrií (Volf et Horák 2007). Sporogonií vzniklé spóry se uvolňují do prostředí z infikovaného hostitele (Kotler et Orenstein 1998). Zralou spóru obklopuje vnější glykoproteinová a vnitřní chitinová vrstva, která je značně odolná vůči nepříznivým podmínkám životního prostředí (Didier et al. 2004).

### 2.3 *Encephalitozoon cuniculi*

Charakteristická vlastnost pro mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* je množení se v parazitoforní vakuole (Franzen et Müller 2001). Vegetativní formy parazita se množí ve vakuole hostitelské buňky a mění se ve spóry. Mikrosporidie postupně vyplňuje celý obsah buňky, jádro je zatlačováno a vzniká útvar připomínající tkáňovou cystu *Toxoplasma gondii*, ale bez povrchové membrány. Spóra je oválná, světlolomná o velikosti  $2,5 \times 1,5 \mu\text{m}$  (Jírovec 1977).

Druh *E. cuniculi* byl pojmenován již v roce 1923 (Levaditi et al. 1923) a poprvé detekován u lidí až v roce 1959. Spóry byly nalezeny v likvoru a v moči devítiletého

chlapce s příznaky postižení CNS. Byla to první popsaná lidská mikrosporidiová infekce (Matsubayashi et al. 1959). *Encephalitozoon cuniculi* se hojně vyskytuje u králíků, u nichž způsobuje enzootickou encefalitidu, a u další celé řady obratlovců, včetně člověka (Jírovec 1977). U *E. cuniculi* rozeznáváme 4 genotypy (I, II, III a IV), které nejsou hostitelsky specifické. V rámci rodu *Encephalitozoon* je druh *E. cuniculi* nejvíce zkoumanou savčí mikrosporidií (Didier et al. 1995).

Rod *Encephalitozoon* zahrnuje další čtyři morfologicky neodlišitelné druhy: *E. hellem*, *E. intestinalis*, *E. lacertae* a *E. romaleae* (Koudela et al. 1998, Lange et al. 2009).

#### **2.4 Přenos a zdroj infekce**

Existují dva způsoby přenosu. Vertikální neboli transplacentární způsob je přenos z matky na plod. Tento druh přenosu byl popsán hlavně u hmyzu, ale i hlodavců, králíků, koní, masožravců a primátů. Doposud nebyl zaznamenán u lidí. Druhý způsob se nazývá horizontální, kdy nejčastějším přenosem je požití infekční spóry. Infekce se přenáší zejména fekálně-orální nebo urino-orální cestou. Méně často jsou popisovány jiné způsoby přenosu: např. vektorem, vdechnutím nebo sexuálním přenosem (Baneux et Pognam 2003, Didier et al. 1998, Snowden et al. 1998, Snowden et Shaddock 1999, van Rensburg et al. 1991). Ojedinele může být infekce přenesena přímým kontaktem skrze oko nebo ránu (Sharma et al. 2014).

Mikrosporidiové spóry jsou uvolňovány do prostředí stolicí/trusem, močí nebo dýchacími sekrety. Zdrojem infekce jsou infikované osoby nebo zvířata vylučující spóry. Spóry mikrosporidií byly zjištěny i ve vodě, půdě a potravinách, kde setrvávají po dlouhou dobu infekční (Kotková et al. 2013). V nedávné době bylo popsáno jako potenciální zdroj mikrosporidií pro člověka také pasterované mléko (Kvác et al. 2016, Tomanová 2015) a fermentované masné výrobky (Sak et al. 2019).

#### **2.5 Průběh infekce**

Mikrosporidióza má velmi variabilní průběh projevující se v závislosti na hostiteli, druhu a genotypu mikrosporidie celou řadou různých klinických příznaků, které se objevují především u jedinců s poruchou imunity, například u pacientů s AIDS, kteří mají hladinu CD4<sup>+</sup> T – lymfocytů pod 100 buněk v  $\mu$ l krve (Sak et al. 2011). Mikrosporidióza se nejčastěji projevuje chronickým průjmem, který může být spojený s horečkou, úbytkem hmotnosti zapříčiněným ztrátou chuti k jídlu a celkovým chřadnutím (Kotler et Orenstein 1998). Rizikovou skupinou jsou také

mláďata s nezralým imunitním systémem či jedinci po transplantaci orgánů (Didier et Weiss 2006). Průběh infekce u osob nakažených mikrosporidiiemi závisí na imunitním stavu jedince (Didier et al. 1998, Fasshauer et al. 2005).

## 2.6 Terapie

S ohledem na lokalizaci a zejména velikosti parazita je rutinní diagnostika značně obtížná (Markell et al. 1999). K léčbě mikrosporidieózy se nejčastěji využívají účinné látky albendazol a fumagillin. Fumagillin je antibiotikum, které se aplikuje při léčbě keratokonjunktivitidy způsobené mikrosporidiiemi rodu *Encephalitozoon* (Diesenhouse et al. 1993). Fumagillin je používán také jako léčivo při chronických infekcích vyvolaných druhem *Enterocytozoon bieneusi* u imunokompromitovaných jedinců, avšak u některých pacientů byly pozorovány nežádoucí účinky léčby jako je neutropenie a trombocytopenie (Molina et al. 2002). Fumagillin je také účinný proti nosematóze u včel medonosných (Katznelson et Jamiesin 1952).

Mikrosporidieózu lze také léčit perorálním podáním albendazolu. Správné dávkování albendazolu by mělo zaručit léčbu střevní a diseminované infekce způsobené *E. intestinalis* a *E. cuniculi*. Albendazol rovněž zmírňuje klinické příznaky střevní infekce *E. bieneusi*, ale infekci zcela neeliminuje (Markell et al. 1999).

## 2.7 Výroba čerstvých sýrů

Sýry jsou trvanlivé mléčné výrobky bohaté na bílkoviny a tuk. Získávají se zpracováním sýřeniny (sraženiny) mléka. Při zpracování se odděluje ze sýřeniny syrovátka a získaná hmota se formuje, případně lisuje, solí a zraje, až je získán produkt s charakteristickou chutí, konzistencí a vůní (Pešek 1997). Dle vyhlášky č. 397/2016 Sb. je sýrem mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním.

K nejčastějšímu využití kozího mléka patří jeho zpracování na sýry. Výroba čerstvého kozího sýra začíná šetrnou pasterizací mléka. Teploty nad 74 °C mohou měnit vlastnosti mléka, obzvláště vůni a chuť, a proto se zpravidla provádí šetrná pasterizace při 72 °C po dobu 20 sekund, která usmrtí převážnou část vegetativních forem mikroorganismů. Při šetrné pasterizaci dochází k částečné denaturaci syrovátkových bílkovin, proto je tato metoda vhodná pro výrobu sýrů (Görner et Valík 2004).

Po dosažení potřebné teploty se mléko okamžitě zchladí na sýřicí teplotu (30–33 °C). Poté se přidá smetanová kultura (Pešek 1997). Touto kulturou se má zajistit nejlepší chuťová jakost výrobku a jeho trvanlivost. Dosahuje se jí tím, že kyselost, vytvořená ve výrobku užitečnými mikroorganismy smetanové kultury, zabraňuje růstu škodlivé alkaligenní mikroflóry, zejména hnilobné. Tvorbou antibiotických látek potlačují mikroorganismy této kultury rozvoj nežádoucí mikroflóry a zabraňují tím zhoršení jakosti výrobku (Teplý 1962). Dále se přidá 36 % chlorid vápenatý, který má příznivý vliv na srážení mléka, zlepšuje konzistenci a pevnost sýřeniny a zvyšuje výtěžnost. Mléko se nechá 30–45 minut odpočinout (Pešek 1997). Po předezrání se přidá syřidlo, látka způsobující srážení mléka. Syřidla živočišného původu (chymosin a pepsin) mohou být jehněčí, telecí, prasečí či jiná. Chymosin se získává ze žaludků sajících mláďat přežvýkavců a pepsin ze žaludků dospělých zvířat (Šustová et Sýkora 2013). Existují také mikrobiální syřidla. Z mikrobiálních syřidel se využívají preparáty izolované z plísní *Cryphonectria parasitica* a *Rhizomucor miehei*. Pomocí mikrobiálních syřidel se vyrábějí sýry přijatelné pro vegetariány. Také rostliny obsahují enzymy schopné koagulovat mléko, např. ananas, artyčok nebo ostropestřec mariánský, ale tato syřidla nejsou komerčně využívána (Kadlec 2002). Doba srážení je 30–40 minut, přičemž vložkování má nastat do 15 minut, nejpozději však do 20 minut (Pešek 1997).

Následuje zpracování sýřeniny zahrnující řadu operací, které mají za úkol podpořit synerezi, tj. smršťování a uvolňování syrovátky ze sýřeniny po koagulaci. Zahajuje se krájením sýřeniny harfami v okamžiku, kdy je dosažena požadovaná tuhost. Při této operaci trvající přibližně 20 minut vzniká sýrové zrno (částice o velikosti 3–15 mm). Zrno se dále míchá v uvolněné syrovátce. Míchání musí být šetrné, aby nedošlo k rozpadnutí zrn na jemné částice, tzv. sýrový prach, který není zadržen v sýru a zvyšují se tak ztráty do syrovátky (Kadlec 2002).

Formování začíná oddělením syrovátky od sýrového zrna, které se vkládá do forem (tvořítek) z nerezů nebo plastů. Následně se lisuje, přičemž dochází k dalšímu prokysávání sýrů po dobu 16–20 hodin při pokojové teplotě (20–24 °C). Lisování napomáhá oddělení syrovátky, zajišťuje texturu sýra a dává sýrům finální tvar. U čerstvých a měkkých sýrů, které se lisují vlastní vahou, je nutné obracení (Kadlec 2002).

Finální výrobek se solí. Solení má vliv na výslednou chuť, ovlivňuje aktivitu kultur a enzymů při zrání sýrů, reguluje obsah vody v těstě sýra, zpevňuje povrch

sýra a potlačuje rozvoj nežádoucí mikroflóry. Sýry se mohou solit následujícími postupy: solení do zrna, solení na sucho a solení v solné lázni. Solení do zrna lze charakterizovat jako přímé přidání a míchání suché soli do rozkrájené nebo pomleté sýřeniny na konci zpracování před formováním. Výsledkem je rovnoměrné prosolení celého sýra v krátké době (10–20 minut). Při lisování však vzniká velmi slaná syrovátka. Při solení na sucho se roztírá suchá sůl nebo kaše na povrch vyformovaných sýrů. Solením v solné lázni se u nás solí většina sýrů. Koncentrace solné lázně se pohybuje v rozmezí 18–22 %. Doba solení je závislá na velikosti a druhu sýra. Uvedené postupy solení lze také kombinovat. Po solení se sýry ukládají ve zracím sklepě k uzrání, s výjimkou nezrajících sýrů, které se konzumují čerstvé (Kadlec 2002).

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 Vzorky mléka a trusu

V roce 2018 byly odebírány vzorky mléka a trusu na 6 farmách koz v České republice. Odběr trusu byl prováděn při defekaci zvířete nebo odběrem z rekta. Vzorky mléka byly získány při dojení jednotlivých koz. Bylo odebráno 30 ml mléka a 3 g trusu do sterilních plastových zkumavek a skladováno při 4 °C až do molekulární detekce mikrosporidií.

##### 3.1.2 Spóry mikrosporidií pro experiment

Pro experimenty byly použity spóry mikrosporidie druhu *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II získané původně z přirozeně infikované odchycené myši domácí (*Mus musculus*) (Koudela et al. 1994) a udržované dlouhodobě *in vitro* v Laboratoři veterinární a lékařské protistologie, Parazitologický ústav, Biologické centrum AV ČR, v.v.i. v buněčné kultuře VERO E6 v RPMI – 1640 médiu (Biotech, Praha, Česká republika) obohaceném 2,5 % bovinním fetálním sérem (Biotech), antimykotiky a antibiotiky (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Poté byly spóry vyčištěny od buněk pomocí centrifugace na Percollovém gradientu (1 díl PBS obsahující suspenzi buněk se spory : 1 díl Percoll) při 1100 g po dobu 30 minut. Nakonec byly třikrát promyty ve sterilizované destilované vodě (1100 g po dobu 30 minut).

##### 3.1.3 Experimentální zvířata

Pro zjištění viability a infekivity spór po pasteraci mléka a následné výrobě sýra byly použity 8-týdenní myši s vážnou kombinovanou deficiencí (SCID, kmen C.B-17/IcrHsd-Prkdc<sup>scid</sup>), myši s absencí CD4 T lymfocytů (CD4<sup>-/-</sup>, kmen B6.129S2-Cd4<sup>tm1Mak/J</sup>), myši s absencí CD8 T lymfocytů (CD8<sup>-/-</sup>, kmen B6.129S2-Cd8a<sup>tm1Mak/J</sup>) a imunokompetentní C57BL/6 a BALB/c myši. Všechna experimentální zvířata pocházela z The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA. Myši byly chovány v plastických chovných nádobách v IVC jednotce Touch SlimPlus – Blue Line (Tecniplast, Buguggiate, Itálie) na podestýlce Lignocel select Fine (JRS GmbH & Co. KG, Ellwangen, Německo). Myši měly k dispozici sterilizovanou vodu a peletované krmivo Altromin 1314 IRR *ad libitum* (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Německo).

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Izolace DNA z trusu

DNA z trusu byla izolována pomocí komerčního kitu Exgene™ Stool DNA mini, 50 preps (GeneAll, Seoul, Jižní Korea).

#### Postup izolování:

- K 200 mg trusu v označené mikrozkušavce připipetovat 1 ml FL Buffer, přidat skleněné kuličky (0,2 a 0,5 mm) a vortexovat.
- Rozbít vzorek v beadbeateru (FastPrep-24 Instrument; MP Biomedicals, Santa Ana, CA) při rychlosti 5 m/s po dobu 1 minuty.
- Vzorek inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě.
- Centrifugovat 5 minut při 16000 g.
- Přepipetovat veškerý supernatant na EzPass kolonku (bílá kolonka).
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g a poté vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Na kolonku napipetovat 100 µl EB Buffer.
- Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě.
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Vyhodit bílou kolonku a připipetovat 500 µl PB Buffer do sběrné zkumavky, promíchat pipetováním.
- Celý obsah sběrné zkumavky přenést na Mini spin kolonku (zelená kolonka).
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g a poté vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Napipetovat 500 µl NW Buffer na střed kolony.
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g a vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Opět centrifugovat 1 minutu při 16 000 g a přenést kolonku na čistou označenou 1,5 ml mikrozkušavku.
- Napipetovat 200 µl EB Buffer na kolonku a inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě.
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Vyizolovanou DNA skladovat při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



### 3.2.2 Izolace DNA z tkáně, mléka a sýra

DNA z tkáně, mléka nebo sýra byla izolována pomocí komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Německo).

#### Postup izolování:

- Do označené mikrozkušavky nastříhat cca 10 mg tkáně nebo 10 mg sedimentu po odstředění 30 ml mléka (3 minuty při 16 000 g) nebo 10 mg sýra a přidat skleněné kuličky (0,2 a 0,5 mm).
- Přidat 200 µl ATL Buffer a vortexovat.
- Rozbít vzorek v beadbeateru (FastPrep-24 Instrument; MP Biomedicals, Santa Ana, CA) při rychlosti 5 m/s po dobu 1 minuty.
- Centrifugovat 10 sekund při 16 000 g.
- Připipetovat 20 µl proteinasy K.
- Při 56 °C inkubovat v termobloku 1 hodinu, vzorek pravidelně homogenizovat.
- Centrifugovat 10 sekund při 16 000 g.
- Připipetovat 200 µl AL Buffer a vortexovat
- Připipetovat 200 µl 96 % EtOH a vortexovat
- Centrifugovat 45 sekund při 16 000 g.
- Veškerý supernatant přepipetovat na Mini spin kolonku a následně centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
- Odstranit odpad ze sběrné zkumavky.
- Přidat 500 µl AW1 Buffer na Mini spin kolonku a centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
- Znovu odstranit odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetovat 500 µl AW2 Buffer na Mini spin kolonku a centrifugovat 1 minutu při 10 000 g.
- Odstranit odpad ze sběrné zkumavky a znovu centrifugovat 1 minutu při 10 000 g.
- Nahradit sběrnou zkumavku za novou označenou 1,5 ml mikrozkušavku a přímo na membránu kolonky napipetovat 200 µl AE Buffer.
- Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a poté centrifugovat 1 minutu při 10 000 g.
- Vyizolovanou DNA skladovat při -20 °C.

### 3.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost specifické DNA *Encephalitozoon* spp. v testovaných vzorcích byla zjišťována pomocí nested PCR amplifikující ITS podjednotku rRNA dle dříve popsaných metodik (De Bosscuere et al. 2007, Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996). Pro primární i sekundární PCR reakci byl celkový objem reakčních směsí 20 µl. Primární PCR směs obsahovala 2 µl templátové DNA, 10 µl 2× AmpONETM HS-Tag premix (GeneAll), 200 nM každého primeru a molekulární vodu do celkového objemu 20 µl. Sekundární reakce byla shodná s primární, kromě použití 2 µl primární PCR jako templátové DNA. V termocycleru byly nastaveny reakční podmínky následovně:

- Počáteční denaturace 95 °C po dobu 3 minuty,
- 35 cyklů zahrnující
  - Denaturace 95 °C po dobu 45 sekund.
  - Hybridizace 55 °C po dobu 45 sekund.
  - Syntéza 72 °C po dobu 60 sekund.
- Závěrečná syntéza 72 °C po dobu 10 minut.

Každá PCR zahrnovala pozitivní (DNA *E. cuniculi* genotyp III) a negativní (molekulární voda) kontrolu.

#### Sekvence použitých primerů:

Primární PCR

- INT580F: 5' - TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT - 3'
- INT580R: 5' - TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG - 3'

Sekundární PCR

- MSP3: 5'- GGA ATT CAC ACC GCC CGT C (A,G) (C,T)TAT - 3'
- MSP4A: 5'- CCA AGC TTA TGC TTA AGT (C,T)(A,C)A A(A,G)G GGT - 3'

### 3.2.4 Gelová elektroforéza

Sekundární PCR produkty byly vizualizovány na 1 % agarózovém gelu s přídavkem ethidium-bromidu pomocí UV záření (vlnová délka 302 nm) transiluminátorem a poté zdokumentovány.

## **Chemikálie**

- Agaróza (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- TAE pufr: 50× TAE pufr (242 g tris báze; 457,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,00).
- Ethidium bromid 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, Clevelend, Ohio, USA)
- Velikostní marker - 100 bp DNA Ladder (Sigma-Aldrich)

## **Postup:**

- Smíchat příslušné množství agarózy s 1× TAE pufrem (např. 0,4 g agarózy a 40 ml TAE pufru)
- Vzniklou směs rozpustit v mikrovlnné troubě a ihned zchladit pod tekoucí vodou na teplotu přibližně 50–60 °C.
- Do zchlazené směsi připipetovat 1 µl ethidium-bromidu a zhomogenizovat.
- Gel nalít do formy s vloženým hřebenem a nechat tuhnout zhruba 30 minut.
- Vyjmout hřeben a gel vložit do elektroforetické vany.
- Zalít gel TAE pufrem tak, aby byl celý ponořený.
- Do první jamky v gelu napipetovat 20 µl velikostního markeru a do dalších jamek napipetovat sekundární PCR produkty.
- Vyvíjet gel při napětí 90–110 V po dobu cca 30 minut (až do rozseparování produktů).
- K vizualizaci DNA fragmentů použít UV transiluminátor.

### **3.2.5 Extrakce z gelu**

DNA z gelu byla izolována pomocí komerčního kitu GenElute™ Gel Extraction (Sigma-Aldrich).

#### **Postup izolování:**

- Vyříznout fragment DNA z gelu sterilním skalpelem a dát do označené mikrozkuhavky.
- Do mikrozkuhavky s fragmentem gelu připipetovat 500 µl Gel Solubilization Solution.
- Inkubovat 10 minut v termobloku při 50 °C a promíchávat každé 2 minuty.
- Dát si inkubovat eluční pufr nebo PCR vodu na eluci na 65 °C.

- Sestavit Binding Column G, na kolonku napipetovat 500 µl Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetovat ke vzorku 150 µl isopropanolu a promíchat.
- Přepipetovat veškerý objem vzorku na kolonu (Binding Column G) a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetovat 700 µl Wash Solution G a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Opět centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Otočit zkumavku v centrifuze o 180° a centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
- Kolonu dát do nové označené 1,5 ml mikrozkušavky a provést eluci napipetováním 30 µl per vody přehřáté na 65 °C na střed kolony.
- Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.

### 3.2.6 Sekvenování a genotypizace

Sekvenování PCR produktů bylo realizováno pomocí sekundárních primerů v komerčních laboratořích za použití sekvenačního kitu BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Získané nukleotidové sekvence byly analyzovány v Chromas Pro 2.1.8. a srovnány s referenčními sekvencemi uloženými v GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

### 3.2.7 Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)

Množství spór *E. cuniculi* v jednotlivých vzorcích sýrů a orgánech myši experimentálně krměných sýry bylo kvantifikováno pomocí kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) za použití specifických primerů amplifikujících část genu kódujícího malou podjednotku rRNA *Encephalitozoon* spp. a specifické TaqMan próby (268 bp; Wolk et al. 2002) za použití přístroje Light cycler 480 (Roche, Basel, Švýcarsko). K zhotovení kalibrační křivky byla využita vyizolovaná DNA ze vzorků, které obsahovaly známý počet spór ( $10^3$  až  $10^8$ ). Jednotlivé složky v reakční směsi jsou uvedeny v tabulce 1. Pomocí programu Light cycler 480 Software Release 1.5.0 SP4 byla monitorována a následně vyhodnocena pozitivita vzorků. Jako gen s

konstantní expresí (housekeeping gene, HKG) byl použit gen pro  $\beta$ -aktin myši (137 bp; Dai et al. 2009).

Amplifikační program v termocycleru byl nastaven následovně:

- Počáteční denaturace 95 °C/3 minuty, 45 cyklů zahrnující denaturaci 95 °C/45 sekund.
- Hybridizace 60 °C/10 sekund.
- Syntéza 72 °C/16 sekund.
- Závěrečná extenze 55–85 °C/16 sekund rychlostí 0,2 °C/1 sekundu.

Chlazení trvalo 30 sekund při 40 °C (Wolk et al. 2002).

Ke každé qRT PCR reakci byla přiřazena negativní kontrola a vzorky o známých koncentracích *Encephalitozoon* spp. ( $10^6$ ) a  $\beta$ -aktinu ( $2,94 \cdot 10^5$ ) použité jako standardy. Všechny vzorky byly testovány v duplikátech. Pro další výpočty byla použita CT hodnota (threshold cycle), která byla automaticky odečítána výše uvedeným programem. Ze získaných CT hodnot byl vypočítán počet spór v analyzovaném vzorku. Počet spór byl poté přepočítán na 1 g daného vzorku na základě známého počtu kopií genu pro  $\beta$ -aktin v 1 g orgánu (Sak et al. 2017b). Výsledky byly zaokrouhleny na celá čísla.

**Tabulka 1.** Reakční směs pro qRT PCR

<b>Reagencie</b>	<b>Objem (<math>\mu</math>l)</b>
FastStart Universal Probe Master (Roche)	12,5
deionizovaná H <sub>2</sub> O	5,0
forward primer (10 $\mu$ M)	1,0
reverse primer (10 $\mu$ M)	1,0
próba (10 $\mu$ M)	0,5
DNA	5,0
<b>Celkem</b>	<b>25,0</b>

#### **Nukleotidové sekvence primerů a prób:**

Malá podjednotka rRNA *Encephalitozoon* spp. (Wolk et al. 2002)

- forward primer: 5' - GTC CGT TAT GCC CTG AGA - 3'
- reverse primer: 5' - ACA GCA GCC ATG TTA CGA CT - 3'
- próba: 5'- red 640 - TGG ACG AAG ATT GGA AGG TCT GAG TC-phosphate-3'

$\beta$ -aktin (Dai et al. 2009)

- forward primer: 5'- AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC - 3'
- reverse primer: 5'- CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT - 3'
- próba: 5'- FAM - CAC TGC CGC ATC CTC TTC CTC CC BHQ1-3'

### **3.3 Ověření účinnosti pasterizace kozího mléka a následné výroby čerstvého sýra na infektivitu *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II**

#### **3.3.1 Příprava čerstvého sýra**

Přítomnost mikrosporidií v syrovém kozím mléce byla vyloučena pomocí metody PCR. Do 100 ml ověřeného mléka bylo přidáno  $10^7$  infekčních spór *E. cuniculi* genotyp II. Následně proběhla šetrná pasterizace, kdy mléko bylo zahřáto na 72 °C po dobu 20 s a bylo bezprostředně zchlazeno na 32 °C (sýřicí teplota). Do pasterizovaného mléka bylo přimícháno 5 ml smetanové kultury (kysané podmásli) a 0,1 ml  $\text{CaCl}_2$  (Chlorid vápenatý 36% roztok; MILCOM), za 30 minut bylo přidáno 0,1 ml chymosinového syřidla (Laktochym 1 : 5 000; MILCOM, Czech Republic). Dále probíhalo sýření 40 minut při teplotě 32 °C. Vzniklá sýřenina byla pokrájena, čímž bylo vytvořeno sýrové zrno. Uvolněné zrno v syrovátce bylo zamícháno. Pomocí síta a bavlněné látky byla oddělena syrovátka od sýrového zrna. Vzniklý sýr byl vložen do formy (tvořítka), kde se při pokojové teplotě nechal odkapat do druhého dne. Mezitím byl sýr pravidelně obrácen. Nakonec byl sýr vložen do solné lázně o koncentraci 18 % na 2 hodiny. Vyrobený sýr byl uchováván v chladničce při 4 °C.

#### **3.3.2 Design experimentu**

Dvě myši z každého kmene (SCID, C57BL/6 a BALB/c) byly jednotlivě nakrmeny přes noc 1 g sýra za současného odejmutí granulovaného krmiva. Jako pozitivní kontroly byly použity skupiny myši (dvě myši od každého kmene) perorálně infikovaných dávkou  $10^7$  spór *E. cuniculi* genotyp II v destilované vodě. Skupiny myši (dvě myši od každého kmene) nakrmené čerstvým sýrem, u něhož nebyla zjištěna přítomnost specifické DNA *E. cuniculi*, byly použity jako negativní kontroly.

Myši byly utráceny v předpokládané akutní fázi infekce z důvodu maximalizace úspěšnosti zachytu případné probíhající infekce dle výsledků Kotkové et al. (2013) a Saka et al. (2017a); SCID myši 21 dní po infekci (DPI), C57BL/6 myši 28 DPI a

BALB/c myši 35 DPI. Během pitvy byly sterilně odebrány vzorky jater, sleziny, ledviny a mozku a následně použity pro molekulární detekci na přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* v testovaných tkáních.

### **3.4 Přítomnost *Encephalitozoon cuniculi* v komerčně prodávaných čerstvých a měkkých sýrech a ověření infekivity spór**

#### **3.4.1 Design experimentu**

Za účelem ověření přítomnosti a infekivity spór mikrosporidií bylo postupně nakoupeno 9 různých druhů čerstvých a měkkých sýrů z maloobchodů nebo přímo od chovatelů. Přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* byla v každém ze sýrů testována pomocí PCR. Pozitivní sýry byly dále použity pro experimentální infekce myši.

Tři myši z každého kmene (SCID, C57BL/6, BALB/c, CD4<sup>-/-</sup> a CD8<sup>-/-</sup>) byly jednotlivě krmeny přes noc 5 g směsí sýrů od jednotlivých výrobců za současného odejmutí granulovaného krmiva. Krmení probíhalo každý druhý den po dobu 24 dní. Každá myš během celého experimentu zkonsumovala celkem 60 g sýrů. Jako pozitivní kontrola byla použita skupina myši (tři od každého kmene) perorálně infikovaných dávkou 10<sup>7</sup> spór *E. cuniculi* genotyp II v destilované vodě. Jako negativní kontrola byla použita skupina myši (tři od každého kmene) krmená sýrem, u něhož nebyla zjištěna přítomnost specifické DNA *E. cuniculi*.

Myši byly utraceny v předpokládané akutní fázi infekce jako u předchozího experimentu (kapitola 3.3.2); SCID myši 21 DPI, C57BL/6, CD4<sup>-/-</sup> a CD8<sup>-/-</sup> myši 28 DPI a BALB/c myši 35 DPI. Během pitvy byly odebrány sterilní vzorky jater, sleziny, ledviny a mozku a následně použity pro molekulární detekci na přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* v testovaných tkáních.

## 4. Výsledky

### 4.1 Prevalence *Encephalitozoon cuniculi* u koz

Bylo vyšetřeno celkem 117 vzorků mléka a 107 vzorků trusu od 99 koz ze 6 různých chovů v České republice (tabulka 2). Ze všech testovaných vzorků byly mikrosporidie detekovány u dvou koz v mléce na farmě č. 1, a to v koncentraci 17 a 59 spór na 1 ml mléka, a v trusu jedné kozy na farmě č. 3 v koncentraci 22 spór na g trusu (tabulka 2). Následná genotypizace prokázala přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* genotyp II u všech pozitivních vzorků. Všechny tři kozy byly bez zjevných zdravotních problémů.

**Tabulka 2.** Výskyt *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II ve vyšetřovaných vzorcích mléka a trusu na sledovaných farmách koz.

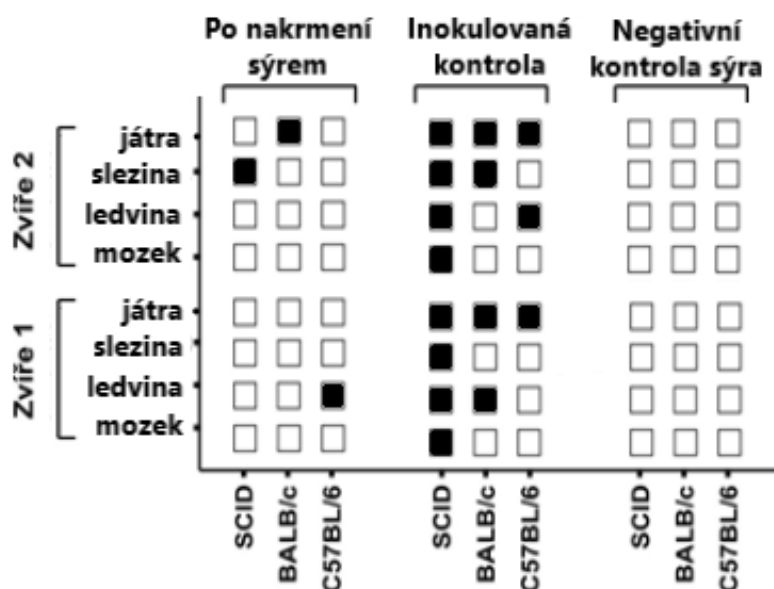
Číslo farmy	Počet vyšetřených koz/pozitivní	Počet vyšetřených vzorků/pozitivní	
		Mléko	Trus
Farma č. 1	15/2	32/2	32/0
Farma č. 2	15/0	15/0	15/0
Farma č. 3	17/1	32/0	17/1
Farma č. 4	11/0	11/0	11/0
Farma č. 5	22/0	22/0	13/0
Farma č. 6	19/0	5/0	19/0
<b>Celkem</b>	<b>99/3</b>	<b>117/2</b>	<b>107/1</b>

### 4.2 Ověření účinnosti pasterizace kozího mléka a následné výroby čerstvého sýra na infektivitu *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II

Výsledky našeho experimentu prokázaly, že v případě, přidavku  $10^7$  spór *E. cuniculi* do 100 ml mléka byla výsledná průměrná koncentrace spór na 1 g sýra 557 000 spór. Krmení experimentálních zvířat sýrem připraveným ze spórami obohaceného mléka prokázalo, že spóry *E. cuniculi* genotyp II zůstaly infekční po pasteraci mléka a následného zpracování na sýr (obrázek 1). Zatímco jednorázové krmení myši sýrem obsahující spóry *E. cuniculi* genotyp II mělo za následek vývoj mikrosporidové infekce jen u tří ze šesti myší (obrázek 1), všechna kontrolní zvířata inokulovaná per orálně dávkou  $10^7$  spór *E. cuniculi* v destilované vodě byla úspěšně infikována. Dále byl zjištěn rozdíl v intenzitě infekce mezi kontrolní a pokusnou skupinou. Zatímco u myší krmených sýrem byly mikrosporidie detekovány pouze v jednom z vyšetřovaných orgánů, u myší inokulovaných per orálně došlo k rozvoji infekce v téměř ve všech orgánech (obrázek 1). Sekvence *E. cuniculi* získané z myší krmených sýrem a inokulovaných per orálně byly identické s infekční dávkou.



Množství spór *E. cuniculi* genotyp II ve tkáních pozitivních zvířat krmených sýrem se pohybovalo v rozmezí od 128 do 630 spór na 1 g tkáně (tabulka 3). U žádné z myši ze skupiny negativních kontrol nebyla zjištěna přítomnost *E. cuniculi*.



**Obrázek 1.** Výskyt specifické DNA *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II v orgánech imunodeficitních (SCID, 21 dní po infekci) a imunokompetentních (C57BL/6, 28 dní po infekci a BALB/c, 35 dní po infekci) laboratorních myši nakrmených čerstvým sýrem obsahujícím *E. cuniculi* genotyp II v množství cca 557 000 spór na 1 g sýra. Inokulovaná kontrola - myši perorálně infikované dávkou  $10^7$  spór v  $dH_2O$ ; negativní kontrola - myši nakrmené negativním čerstvým sýrem; prázdný čtverec označuje qRT-PCR negativní vzorek; černý čtverec označuje qRT-PCR pozitivní vzorek.

**Tabulka 3.** Množství spór *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II na 1 g tkáně u zvířat krmených sýrem experimentálně připraveným ze spórami obohaceného mléka.

Kmen myši	Číslo zvířete	Orgán	Počet spór na 1 g tkáně
SCID	2	slezina	128
BALB/c	2	játra	630
C57BL/6	1	ledvina	307

### 4.3 Přítomnost *Encephalitozoon cuniculi* v komerčně prodáváných čerstvých a měkkých sýrech a ověření infekivity spór

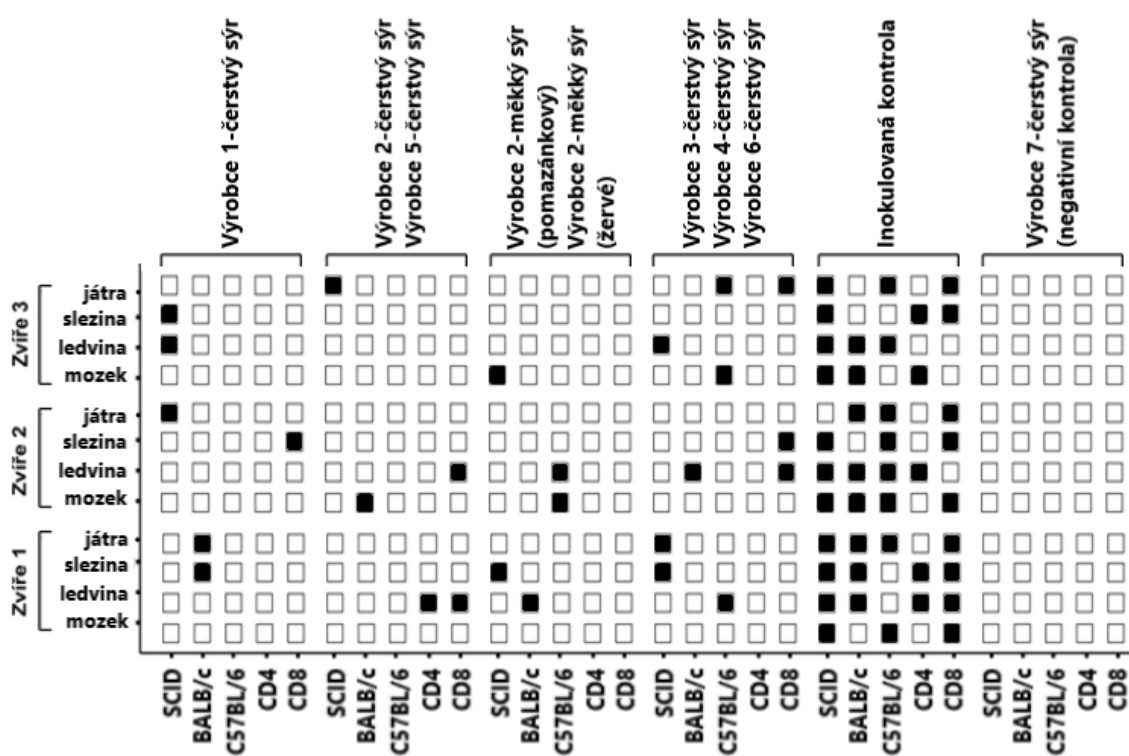
Na základě testovaných vzorků sýrů používaných pro krmení myši byla pomocí PCR zjištěna přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* genotyp I nebo genotyp II v osmi zakoupených sýrech z devíti (tabulka 4). Specifická DNA *E. cuniculi* genotyp I byla detekována ve výrobcích dvou ze sedmi výrobců sýrů a *E. cuniculi* genotyp II u čtyř výrobců. Za pomoci qRT-PCR bylo zjištěno, že 1 g sýra obsahoval 38–202 spór/gram *E. cuniculi* genotypu I a 1–55 spór/gram *E. cuniculi* genotyp II. U výrobce 7 nebyla zjištěna přítomnost specifické DNA *E. cuniculi*, a proto byl sýr použit jako negativní kontrola (tabulka 4). Výrobce 1 je totožný s farmou č. 1 a výrobce 6 s farmou č. 3 v tabulce 2.

**Tabulka 4.** Přítomnost specifické DNA a množství spór *Encephalitozoon* spp. na 1 g sýra. <sup>1</sup> výrobcem sýra byla farma č. 1, <sup>2</sup> výrobcem sýra byla farma č. 3

Výrobce sýra	Typ sýra	<i>Encephalitozoon</i> spp.	Průměrný počet spór na g sýra
Výrobce 1 <sup>1</sup>	čerstvý	<i>E. cuniculi</i> genotyp II	1
Výrobce 2	čerstvý	<i>E. cuniculi</i> genotyp I	38
	měkký (pomazánkový)	<i>E. cuniculi</i> genotyp I	81
Výrobce 3	měkký (žervé)	<i>E. cuniculi</i> genotyp I	56
	čerstvý	<i>E. cuniculi</i> genotyp II	14
Výrobce 4	čerstvý	<i>E. cuniculi</i> genotyp II	50
Výrobce 5	čerstvý	<i>E. cuniculi</i> genotyp I	202
Výrobce 6 <sup>2</sup>	čerstvý	<i>E. cuniculi</i> genotyp II	55
Výrobce 7	čerstvý	-	-

Experimentální infekce ukázaly, že spóry *E. cuniculi* obsažené v sýrech zůstaly infekční pro všechny kmeny myši. V průběhu předpokládané akutní fáze infekce byla specifická DNA *E. cuniculi* detekována ve všech sledovaných tkáních (obrázek 2). U všech kontrolních zvířat per orálně inokulovaných dávkou  $10^7$  spór *E. cuniculi* genotyp II v destilované vodě byla potvrzena infekce. Mezi infekcí zapříčiněnou pozřením kupovaného sýra obsahujícího spóry *E. cuniculi* genotyp I nebo genotyp II a infekcí vyvolanou per orální inokulací čistými spórami *E. cuniculi* genotyp II nebyl prokázán rozdíl, pouze se lišila intenzita infekce. Množství spór ve tkáních myši krmených sýry obsahujícími *E. cuniculi* genotyp I se pohybovalo v rozmezí od 2 do 219 spór na 1 g tkáně a od 1 do 2 080 spór/gram tkáně v případě myši krmených sýry obsahujícími *E. cuniculi* genotyp II. Pouze u jedné CD8<sup>-/-</sup> myši

krmené sýrem od výrobce 1 obsahujícího spóry *E. cuniculi* genotyp II byla zjištěna velmi vysoká intenzita infekce 102 000 spór na 1 g tkáně (tabulka 5). Z celkového počtu 60 myší zařazených do experimentu byla po zkrmení sýrů obsahujících spóry *E. cuniculi* genotyp I a II zjištěna infekce u 7 imunokompetentních a 13 imunodeficientních myší (obrázek 2, tabulka 5). Nebyl zjištěn rozdíl ve výskytu infekce mezi imunodeficientními a imunokompetentními kmeny myší. Infekce byla nejčastěji detekována v ledvinách. U žádné z myší ze skupiny negativních kontrol nebyla zjištěna přítomnost *E. cuniculi*.



**Obrázek 2** Výskyt specifické DNA *Encephalitozoon cuniculi* v orgánech imunodeficientních (SCID - 21 dní po infekci a CD4<sup>-/-</sup>, CD8<sup>-/-</sup> - 28 dní po infekci) a imunokompetentních (C57BL/6 - 28 dní po infekci a BALB/c - 35 dní po infekci) laboratorních myší krmených kupovaným sýrem obsahujícím *E. cuniculi* v množství 1–202 spór na 1 g sýra. Pozitivní kontrola - myši perorálně infikované dávkou 10<sup>7</sup> spór v dH<sub>2</sub>O; negativní kontrola - myši nakrmené čerstvým sýrem od výrobce 7; prázdný čtverec označuje qRT-PCR negativní vzorek; černý čtverec označuje qRT-PCR pozitivní vzorek.

**Tabulka 5.** Množství spór *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I (EC I) a genotypu II (EC II) na 1 g tkáně u pozitivních zvířat krměných různými druhy sýrů od různých výrobců obsahující spóry EC I a EC II.

Typ sýra (výrobce)	Genotyp <i>E. cuniculi</i> v sýru	Kmen myši	Zvíře číslo	Orgán	Počet spór na g tkáně	Genotyp <i>E. cuniculi</i> získaný ze zvířete
Čerstvý sýr (výrobce 1)	EC II	SCID	2	játra	655	EC II
		SCID	3	slezina	212	EC II
		SCID	3	ledvina	32	EC II
		BALB/c	1	játra	555	EC II
		BALB/c	1	slezina	9	EC II
		CD8 <sup>-/-</sup>	2	slezina	102 000	EC II
Čerstvý sýr (výrobci 2 a 5)	EC I	SCID	3	játra	46	EC I
		BALB/c	2	mozek	219	EC I
		CD4 <sup>-/-</sup>	1	ledvina	5	EC I
		CD8 <sup>-/-</sup>	1	ledvina	8	EC I
		CD8 <sup>-/-</sup>	2	ledvina	4	EC I
Měkký sýr (výrobce 2)	EC I	SCID	1	slezina	9	EC I
		SCID	3	mozek	115	EC I
		BALB/c	1	ledvina	2	EC I
		C57BL/6	2	ledvina	6	EC I
		C57BL/6	2	mozek	12	EC I
Čerstvý sýr (výrobci 3, 4 a 6)	EC II	SCID	1	játra	33	EC II
		SCID	1	slezina	78	EC II
		SCID	3	ledvina	8	EC II
		BALB/c	2	ledvina	22	EC II
		C57BL/6	1	ledvina	2	EC II
		C57BL/6	3	játra	1	EC II
		C57BL/6	3	mozek	31	EC II
		CD8 <sup>-/-</sup>	2	slezina	99	EC II
		CD8 <sup>-/-</sup>	2	ledvina	2080	EC II
CD8 <sup>-/-</sup>	3	játra	5	EC II		

Mezi infekcí u experimentu 1 (kapitola 4.2) obsahujícím spóry *E. cuniculi* genotyp II a infekcí u experimentu 2 (kapitola 4.3) obsahujícím spóry *E. cuniculi* genotyp I a genotyp II nebyl prokázán rozdíl, pouze se lišila intenzita infekce. Výsledky této práce mimo jiné prokázaly, že spóry *E. cuniculi* genotyp I a II přežívají v komerčně nebo experimentálně vyrobených čerstvých i měkkých sýrech.

## 5. Diskuse

Jedním ze současných, ale i budoucích problémů je přístup ke zdravotně nezávadným potravinám. Přes jídlo mohou být přenášeny bakteriální, virové, parazitární a plísňové patogeny, které mohou být příčinou různých zdravotních obtíží s následnou zvýšenou morbiditou a mortalitou v populaci člověka (Scott 2003). Například zoonózy jako kampylobakteriíza, listeriíza a salmonelíza mohou být přenášeny na člověka kontaminovanou potravou nebo přímým kontaktem s živým či poraženým zvířetem (Bell et al. 1988).

Těmto a dalším zoonózám a zvláštním opatřením proti nim se věnují právní předpisy EU týkající se veřejného veterinárního zdraví (např. nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 2160/2003 ze dne 17. listopadu 2003 o tlumení salmonel a některých jiných původců zoonóz vyskytujících se v potravním řetězci a směrnice Evropského parlamentu a Rady 2003/99/ES ze dne 17. listopadu 2003 o sledování zoonóz a jejich původců), ale mikrosporidie nejsou do těchto předpisů zahrnuty. Podle National Institutes of Health (NIH, USA) jsou mikrosporidie zařazeny jako infekční agens do kategorie B a jejich spóry jsou na seznamu potenciálních kontaminantů Agentury pro ochranu životního prostředí (EPA), přesto jejich přenos potravinami je doposud velmi málo prozkoumán a je málo známo o přirozených cestách přenosu (Sak et al. 2019).

Mikrosporidie jsou intracelulární sporotvorné jednobuněčné patogeny, které infikují širokou škálu obratlovců a bezobratlých po celém světě. Lidé a zvířata jsou infikováni zejména mikrosporidii rodu *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon*, které způsobují oportunní infekce u jedinců s nedostatečnou imunitou (Canning et Hollister 1992). Velkou pozornost si mikrosporidii získala při pandemii AIDS, kdy nakažení jedinci trpěli chronickými průjmy, které byly připisovány mikrosporidii (Didier et al. 1998). *Encephalitozoon cuniculi* je také považován za jeden z infekčních původců odpovědných za neplodnost a potraty koz (Cisláková et al. 2001). Khanna a Iyer (1971) jako první popsali *E. cuniculi* (dříve *Nosema cuniculi*) v kozách.

Z výsledků této práce vyplývá, že prevalence *E. cuniculi* u dojných koz ve sledovaných chovech je nízká. Z celkového množství 99 vyšetřovaných koz byla infekce *E. cuniculi* genotyp II detekován pouze u 3 zvířat (3 %). Abu-Akkada et al. (2015) uvedli, že 21 z 31 (67,7 %) vyšetřovaných koz mělo specifické protilátky

proti *E. cuniculi*, avšak pomocí molekulárních technik nebyla pozitivní žádná koza. Obdobné výsledky uvádí ve své studii i Cisláková et al. (2001), kteří detekovali specifické protilátky proti *E. cuniculi* u 6 angorských koz z 48 (12,5 %). Tyto a naše výsledky naznačují, že mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* se v chovech koz mohou vyskytovat relativně často, ale jejich vylučování do prostředí je ojedinělé. Rozdíl mezi relativně vysokou prevalencí detekovanou na základě přítomnosti specifických protilátek a nízkou zjištěnou pomocí molekulárních technik je dán přetrváváním protilátek v krvi jedince po jeho vyléčení nebo v průběhu chronické fáze, kdy je detekce specifické DNA v trusu, moči i mléku s ohledem na intermitentní vylučování spór problematická (Malčeková et al. 2010, Shaddock et Geroulo 1979). Na počátku mikrosporidiové infekce vyvolané *E. cuniculi* je častější vylučování spór infikovaným jedincem. Naopak v chronické fázi, kdy mikrosporidie infikují vnitřní orgány hostitele je vylučování spór méně časté a nepravidelné (Kotková et al. 2013). V této fázi se pravděpodobně nacházela všechna sledovaná zvířata v této práci.

Prevalence *E. cuniculi* u dojných koz v této práci byla podobná jako u dojného skotu ve sledovaných chovech v práci Tomanové (2015), kde ze 147 vyšetřovaných dojnic byla jedna pozitivní. Přítomnosti infekce *E. cuniculi* u vyšetřovaných zvířat lze nepřímo potvrdit i výsledky, které byly získány z komerčně vyráběných sýrů. Zatímco většina vzorků vyšetřovaného mléka (30 ml) byla negativní na přítomnost spór mikrosporidií, téměř všechny sýry vyrobené z tohoto mléka byly pozitivní. Z tohoto by se dalo odvozovat, že počet zvířat ve stádě, která produkují spory mikrosporidií do mléka je velmi nízký, ale dochází ke kontaminaci celé dávky mléka použité k výrobě sýra.

V souladu s předchozími studiemi jsme u žádného zvířete, které bylo pozitivní na *E. cuniculi*, nepozorovali žádné klinické příznaky mikrosporidíózy (Cisláková et al. 2001). Taktéž mléko bylo bez makroskopických změn a bylo uvolněno pro lidskou konzumaci. Žádný z chovatelů neuváděl zvýšený výskyt zánětů mléčné žlázy u pozitivních zvířat, což je v souladu s výsledky Tomanové (2015), která nezjistila přímou souvislost mezi celkovým počtem somatických buněk a výskytem mikrosporidiové infekce u dojnic.

Infektivitu spór ovlivňují tři hlavní faktory: pH, čas a teplota. Tepelné ošetření mléka neboli pasterizace je technologický proces, který se řídí právním předpisem. Tepelné ošetření je z jedním způsobů pro prodloužení doby skladování potravin. Sýry vyrobené z nepasterizovaného mléka jsou potenciálním zdrojem nákazy

patogenními mikroorganismy. V sýrech se mohou objevit patogeny jako *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* (Fernandes 2009). Paraziti jako je *Taenia* spp. nebo *Toxoplasma gondii* mohou kontaminovat mléko a být přenášeny na člověka. Kontaminace půdy může také vést k přítomnosti půdních parazitů v mléce (např. *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*). Proto by se měly dodržovat hygienické podmínky a správná pasterizace mléka, aby se zabránilo kontaminaci (Dhanashekar et al. 2012). Konzumace nepasterizovaného kozího sýra a mléka byla vyhodnocena jako rizikový faktor toxoplazmózy u lidí. Výsledky práce Dubey et al. (2014) ukazují, že *T. gondii* může být vylučována do kozího mléka a je schopna přežít výrobu čerstvého sýra z nepasterizovaného mléka. Naopak v sýrech vyrobených z pasterizovaného mléka se mohou vyskytovat termotolerantní mikroorganismy, například *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp. a endospory zástupců rodů *Bacillus* (Fernandes 2009).

Spóry mikrosporidií jsou díky proteinové a silné chitinové vrstvě v buněčné stěně velmi odolné proti nepříznivým podmínkám (Mo et Drancourt 2004), například jako je vysoká vlhkost, dehydratace, nízké teploty a vysoké nebo nízké pH (Lee 2007). Spóry *Encephalitozoon cuniculi* přežívají 24 hodinovou inkubaci při pH 4 a pH 9 (Shadduck et Polley 1978), proto solná lázeň používající se při výrobě sýrů nedeaktivizuje spóry *E. cuniculi*. Díky proteinové a chitinové vrstvě jsou schopny odolávat i některým metodám tepelného ošetření mléka. Dle výsledků práce Kváče (2016) a Tomanové (2015) je šetrná a vysoká pasterizace mléka neúčinná pro usmrcení spór *E. cuniculi*. Stejný výsledek se potvrdil v této práci, kdy pasterizace kozího mléka při teplotě 72 °C po dobu 20 sekund a následná výroba čerstvého sýra zcela nedeaktivizuje spóry *E. cuniculi*.

V tomto experimentu byla použita smetanová kultura, která má zajistit lepší chuť výrobku a jeho trvanlivost, ale také zabraňuje růstu škodlivé hnilobné mikroflóry. Tvorbou antibiotických látek potlačují mikroorganismy smetanové kultury rozvoj nežádoucí mikroflóry (Teplý 1962). Tato práce prokázala, že smetanová kultura nedeaktivizuje spóry *E. cuniculi*.

Dle studie Fuka et al. (2013) zrání sýra snižuje výskyt lidských patogenů jako je *Staphylococcus saprophyticus* nebo *Salmonella* spp., avšak zrání u čerstvých sýrů se neprovádí.

Na základě našich výsledků, kdy se spórami *E. cuniculi* nakazilo 20 myši ze 60 (33,3 %), lze předpokládat, že požitím 60 g čerstvého kozího sýra vyrobeného

z mléka pozitivního zvířete má člověk relativně vysokou šanci se setkat s infekční dávkou. S ohledem na množství konzumovaného kozího sýra za rok, kdy celková spotřeba kozího mléka za rok 2018 byla 0,1 kg na osobu ([www.eagri.cz](http://www.eagri.cz)), lze konstatovat, že pozřením čerstvého kozího sýra vyrobeného ze 100 ml mléka pozitivního zvířete může být člověk inokulován až 20 000 spór *E. cuniculi*, což je v porovnání s množstvím, které přijmula laboratorní zvířata v 1 g sýra dostačující k vyvolání infekce.

Tato práce je vůbec první, která se touto problematikou zabývá jak v teoretické, tak experimentální úrovni, a proto je obtížné porovnávat výsledky s ostatními experimenty. Dle výsledků v této práci lze říci, že čerstvé a měkké sýry mohou představovat další potenciální zdroj mikrosporidií pro člověka.



## 6. Závěr

- Byla prokázána přítomnost *E. cuniculi* genotyp II v mléce a trusu koz.
- Pasterizace kozího mléka při teplotě 72 °C po dobu 20 sekund a následná výroba čerstvého sýra nedeaktivizuje spóry *E. cuniculi* genotyp I a II.
- Byla prokázána přítomnost *E. cuniculi* genotyp I a genotyp II v čerstvých a měkkých kozích sýrech.
- Pozřením čerstvých a měkkých kozích sýrů pozitivních na *E. cuniculi* genotyp I a genotyp II byla navozena experimentální infekce u laboratorních zvířat.
- Čerstvé a měkké kozí sýry představují potenciální zdroj *E. cuniculi* pro člověka.

## 7. Přehled použité literatury a zdrojů

- Abu-Akkada S. S., Ashmawy K. I., Dweir A. W. 2015:** First detection of an ignored parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in different animal hosts in Egypt. Parasitology Research. 114: 843–850.
- Ardila-Garcia A. M., Fast N. M. 2012:** Microsporidian infection in a free-living marine Nematode. American Society for Mikrobiology. 11: 1544–1551.
- Baneux P. J., Pognan F. 2003:** In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. Laboratory Animals. 37: 132–138.
- Bell J. C., Palmer S. R., Payne J. M. 1988:** The zoonoses. Infections transmitted from animals to man. London: Edward Arnold. 256 s. ISBN 13: 978-0713145618.
- Canning E. U., Hollister W. S. 1992:** Human infections with microsporidia. Reviews in Medical Microbiology. 3: 35–42.
- Cisláková L., Literák I., Bálent P., Hipíková V., Levkutová M., Trávníček M., Novotná A. 2001:** Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidia) in angora goats--a potential risk of infection for breeders. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 8: 289–291.
- Dai J., Wang P., Adusumilli S., Booth C. J., Narasimhan S., Anguita J., Fikrig E. 2009:** Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. Cell Host & Microbe. 6: 482–492.
- De Bosscuere H., Wang Z., Orlandi P. A. 2007:** First diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. hellem* in a European brown hare (*Lepus europaeus*) with kidney lesions. Zoonoses Public Health. 54: 131–134.
- Dhanashekar R., Akkinapalli S., Nellutla A. 2012:** Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. Germs. 2: 101–109.
- Didier E. S., Snowden K. F., Shadduck J. A. 1998:** Biology of microsporidian species infecting mammals. Advance Parasitology. 40: 283–320.
- Didier E. S., Vossbrinck C. R., Baker M. D., Rogers L. B., Bertucci D. C., Shadduck J. A. 1995:** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology. 111: 411–421.

- Didier E. S., Vossbrinck C. R., Stovall M. E., Green L. C., Bowers L., Fredenburg A., Didier P. J. 2004:** Diagnosis and epidemiology of microsporidia infections in humans. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 35: 65–81.
- Didier E. S., Weiss L. M. 2006:** Microsporidiosis: current status. *Current Opinion Infectious Diseases*. 19: 485–492.
- Diesenhause M. C., Wilson L. A., Corrent G. F., Visvesvara G. S., Grossniklaus H. E., Bryan R. T. 1993:** Treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with tropical fumagillin. *American Journal of Ophthalmology*. 115: 293–298.
- Dubey J. P., Verma S. K., Ferreira L. R., Oliveira S., Cassinelli A. B., Ying Y., Kwok O. C., Tuo W., Chiesa O. A., Jones J. L. 2014:** Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. *Journal of Food Protection*. 77: 1747–1753.
- Fasshauer V., Gross U., Bohne W. 2005:** The Parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* lack host cell membrane proteins immediately after invasion. *American Society for Microbiology*. 4: 221–224.
- Fernandes R. 2009:** Microbiology handbook: Dairy products. Third Edition. Leatherhead Publishing a Royal Society of Chemistry. Cambridge. 173 s. ISBN 978-1-90522-462-3.
- Franzen C., Müller A. 2001:** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection*. 3: 389–400.
- Fuka M. M., Wallisch S., Engel M., Welzl G., Havranek J., Schloter M. 2013:** Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses. *PLoS ONE*. 8: e80734.
- Görner F., Valík L. 2004:** Aplikovaná mikrobiológia požívateľin. Bratislava: Malé centrum. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [http://eagri.cz/public/web/file/647507/Komoditni\\_karta\\_Mleko\\_unor\\_2020.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/647507/Komoditni_karta_Mleko_unor_2020.pdf)  
- staženo dne 10.4.2020
- Jírovec O. 1977:** Parasitologie pro lékaře. 3., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Avicenum. 798 s.

- Kadlec P. 2002:** Technologie potravin II. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- Katznelson H., Jamiesin C. A. 1952:** Control of nosema disease of honeybees with fumagilin. *Science*. 115: 70–71.
- Katzwinkel-Wladarsch S., Lieb M., Heise W., Löscher T., Rinder H. 1996:** Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine and International Health*. 1: 373–378.
- Keeling P. J. 2014:** Phylogenetic Place of Microsporidia in the Tree of Eukaryotes in Microsporidia. In: *Pathogens of Opportunity*. First Edition. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds.) John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK. 736 s. ISBN: 978-1-118-39526-4.
- Khanna R. S., Iyer P. K. R. 1971:** A case of *Nosema cuniculi* infection in a goat. *Indian Journal of Medical Research*. 59: 993–995.
- Kotková M., Sak B., Květoňová D., Kváč M. 2013:** Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. *PLoS ONE*. 8: e60941.
- Kotler D. P., Orenstein J. M. 1998:** Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Advence Parasitology*. 40: 321–349.
- Koudela B., Didier E. S., Rogers L. B., Modrý D., Kučerová S. 1998:** Intestinal microsporidiosis in African skink *Mabuya perrotetii*. *Folia Parasitol (Praha)* 45: 149–155.
- Koudela B., Lom J., Vítovec J., Kučerová Z., Ditrich O., Trávníček J. 1994:** *In vivo* efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 41: 49–50.
- Kváč M., Tomanová V., Samková E., Koubová J., Kotková M., Hlásková L., McEvoy J., Sak B. 2016:** *Encephalitozoon cuniculi* in raw cow's milk remains infectious after pasteurization. *Foodborne Pathogens and Disease*. 13: 77–79.
- Lange C. E., Johnny S., Baker M. D., Whitman D. W., Solter L. F. 2009:** A new *Encephalitozoon* species (Microsporidia) isolated from the lubber grasshopper,

- Romalea microptera* (Beauvois) (Orthoptera: *Romaleidae*). Journal of Parasitology. 95: 976–986.
- Lee J. H. 2007:** Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. Applied and Environmental Microbiology. 74: 1664–1666.
- Levaditi C., Nicolau S., Shoen R., 1923:** L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales. 89: 984–986.
- Lianson R., Garnham P. C. C., Killick-Kendrick R., Bird R.G. 1964:** Nosematosis, a microsporidial infection of rodents and other animals, including man. British Medical Journal. 2: 470–472.
- Malčeková B., Halánová M., Sulínová Z., Molnár L., Ravaszová P., Adam J., Halán M., Valocký I., Baranovič M. 2010:** Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon intestinalis* in humans and animals. Research in Veterinary Science. 89: 358–361.
- Markell E. K., John D. T., Krotoski W. A. 1999:** Markell and Vogé's Medical Parasitology. United States of America: W.B. Saunders Company. 501 s. ISBN 0-7216-7634-0.
- Matsubayashi M., Koike T., Mikata I., Takei H., Hagiwara S., 1959:** A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 67: 181–187.
- Mo L., Drancourt M. 2004:** Monoclonal antibodies for specific detection of *Encephalitozoon cuniculi*. Clinical and Vaccine Immunology. 11: 1060–1063.
- Molina J. M., Tourneur M., Sarfati C., Chevret S., de Gouvello A., Gobert J. G., Balkan S., Derouin F. 2002:** Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. The New England Journal of Medicine. 346: 1963–1969.
- Nägeli K. W. 1857:** Ueber die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. Botanische Zeitung. 15: 760–761.
- Pešek M. 1997:** Hodnocení jakosti, zpracování a zbožíznařství živočišných produktů. České Budějovice: Jihočeská univerzita. 182 s. ISBN 80-7040-237-7.

- Sak B., Jandová A., Doležal K., Kváč M., Květoňová D., Hlásková L., Rost M., Olšanský M., Nurcahyo W., Foitová I. 2017b:** Effects of selected Indonesian plant extracts on *E. cuniculi* infection *in vivo*. *Experimental Parasitology*. 181: 94–101.
- Sak B., Kotková M., Hlásková L., Kváč M. 2017a:** Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis. *Parasite Immunology*. 39: e12496
- Sak B., Kváč M., Kučerová Z., Květoňová D., Saková K. 2011:** Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals – A longitudinal study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 5: e1162.
- Sak B., Vecková T., Brdíčková K., Smetana P., Hlásková L., Kicia M., Holubová N., McEvoy J., Kváč M. 2019:** Experimental *Encephalitozoon cuniculi* infection acquired from fermented meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*. 16: 394–398.
- Scott E. 2003:** Food safety and foodborne disease in 21st century homes. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 14: 277–280.
- Shadduck J. A., Geroulo M. J. 1979:** A simple method for the detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animal Science*. 29: 330–334.
- Shadduck J. A., Pakes S. P., 1971:** Spontaneous diseases of laboratory animals which interfere with biomedical research: encephalitozoonosis and toxoplasmosis. *The American Journal of Pathology*. 64: 657–674.
- Shadduck J. A., Polley M. B. 1978:** Some factors influencing the *in vitro* infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Protozoology*. 25: 491–496.
- Sharma S., Balne P. K., Das S. 2014:** Ocular microsporidiosis. In: *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. First Edition. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds). John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK. 736 s. ISBN: 978-1-118-39526-4.
- Snowden K. F., Didier E. S., Oresteijn J. M. Shadduck J. A. 1998:** Animal models of human microsporidial infections. *Laboratory Animal Science*. 48: 589–592.

- Snowden K. F., Shadduck J. 1999:** Microsporidia in higher vertebrates. *In:* Wittner M., Weiss L. (Eds), The microsporidia and microsporidiosis. ASM Press, Washington, DC. 553 s. ISBN: 9781555818227.
- Šustová K., Sýkora V. 2013:** Mlékárenské technologie. V Brně: Mendelova univerzita. 223 s. ISBN 978-80-7375-704-5.
- Teplý M. 1962:** Mléčné speciality, jejich výroba a příprava v domácnosti. 3. rozšířené vydání. Praha: SZdN.
- Tomanová V. 2015:** Mléko jako potenciální zdroj *Encephalitozoon cuniculi*. České Budějovice. 34 s.
- van Rensburg I. B., Volkmann D. H., Soley J. T., Stewart C. G. 1991:** *Encephalitozoon* infection in a still-born foal. Journal of the South African Veterinary Association. 62: 130–132.
- Vávra J. 2017:** Mikrosporidie: houby, co nevypadají jako houby, aneb Sestry říše Fungi? Živa. 257–261.
- Vivarés C. P., Gouy M., Thomarat F. 2002:** Functional and evolutionary analysis of eukaryotic genome. Current Opinion Microbiology. 5: 499–505.
- Volf P., Horák P. 2007:** Paraziti a jejich biologie. Praha: Triton. 318 s. ISBN 978-80-7387-008-9.
- Vyhláška č. 397/2016 Sb.,** ze dne 2. 12. 2016 o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.
- Wolk D. M., Schneider S. K., Wengenack N. L., Sloan L. M., Rosenblatt J. E. 2002:** Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. Journal of Clinical Microbiology. 40: 3922–3928.
- Wright J. H., Craighead E. M. 1922:** Infectious motor paralysis in young rabbits. Journal of Experimental Medicine. 36: 135–140.