

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie

Biologie a genetická variabilita
Cryptosporidium mouse genotype I

Bakalářská práce

Vypracovala: Martina Loudová

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

Místo: České Budějovice

2011

Loudová, M., 2011: Biologie a genetická variabilita *Cryptosporidium* mouse genotype I. [Biology and genetic variability of *Cryptosporidium* mouse genotype I. Bc. Thesis in Czech]– 56 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANNOTATION

This bachelor thesis studies the fundamental characteristics of biological and genetic diversity of two different isolates of *Cryptosporidium* mouse genotype I obtained during the field trapping of *Mus musculus musculus* and *domesticus* in the Czech Republic and Germany. The study deals with the morphometry of exogenous stages, the course of infection and pathological effects in the digestive tract of selected rodent host organisms.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – 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 29.04.2011

.....

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji především mému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za vedení mé práce, trpělivost a ochotu mi kdykoli pomoci. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře veterinární a lékařské protistologie Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za vstřícné a přátelské prostředí a cenné rady. Velký dík patří také mým rodičům, kteří mě vždy a ve všem podporovali.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. CÍLE PRÁCE.....	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1. Historie.....	3
3.2. Taxonomie.....	4
3.3. Zdroj a přenos infekce.....	4
3.4. Klinické projevy infekce	4
3.5. Prepatentní a patentní perioda.....	5
3.6. Lokalizace kryptosporidií.....	6
3.7. Vývojový cyklus	6
3.7.1. Excystace	6
3.7.2. Invaze.....	6
3.7.3. Merogonie	7
3.7.4. Gamogonie.....	7
3.7.5. Sporogonie	8
3.8. Kryptosporidie u hlodavců.....	8
3.8.1. <i>Cryptosporidium</i> mouse genotype I.....	10
4. MATERIÁL a METODY	12
4.1. Původ izolátů.....	12
4.2. Pokusná zvířata	12
4.3. Uchování a skladování izolátu	13
4.4. Detekce kryptosporidií v trusu (koprologické vyšetření).....	13
4.4.1. Barvení oocyst Miláček–Vítovec.....	13
4.5. Určení intenzity infekce	14
4.6. Oddělení izolátů	14
4.7. Příprava infekční dávky	15
4.7.1. Test na viabilitu	15
4.7.2. Infikování zvířat.....	16
4.8. Čištění oocyst	16
4.8.1. Příprava materiálu pro čištění na sacharózovém gradientu	16
4.8.2. Čištění na sacharózovém gradientu	17
4.8.3. Cesium chloridový gradient.....	18

4.9. Sledování průběhu infekce	18
4.10. Morfometrická analýza oocyst	19
4.11. Histopatologické vyšetření	19
4.11.1. Příprava vzorků pro histologické zpracování	20
4.11.2. Barvení hematoxylinem-eosinem	20
4.11.3. Barvení Wolbachovou metodou	21
4.11.4. <i>Cryptosporidium</i> IF test	22
4.12. Molekulární analýza	22
4.12.1. Izolace DNA	22
4.12.2. Polymerázová řetězcová reakce	23
4.13. Gelová elektroforéza	27
4.14. Sekvence izolátů	28
4.15. Fylogenetická analýza	28
4.16. Statistická analýza	28
5. VÝSLEDKY	29
5.1. Morfometrická analýza oocyst	29
5.2. Genetická variabilita <i>Cryptosporidium</i> mouse genotype I	30
5.3. Vnímavost jednotlivých hostitelů k infekci	
<i>Cryptosporidium</i> mouse genotype I	34
5.4. Průběh a intenzita infekce u sledovaných hostitelů	35
5.4.1. Prepatentní perioda	35
5.4.2. Průběh a intenzita infekce u vnímavých hostitelů	36
5.5. Lokalizace vývojového cyklu <i>Cryptosporidium</i> mouse genotype I v zažívacím	
traktu hostitelů	40
5.4.1. Patogenita klinické příznaky kryptosporidiózy vyvolané	
<i>Cryptosporidium</i> mouse genotype I	42
6. DISKUZE	43
7. ZÁVĚR	46
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47

1. ÚVOD

Kryptosporidie jsou jednobuněční paraziti infikující epitelální buňky gastrointestinálního a respiračního traktu nejrůznějších obratlovců včetně člověka (Neumayerová a Koudela 2008). Vyskytují se celosvětově. Jejich patogenita se liší v závislosti na jednotlivých druzích kryptosporidií a na hostiteli. Některé druhy kryptosporidií infikují široké spektrum hostitelů, jiné jsou specifické pro konkrétní skupiny hostitelských organismů, jako jsou např. plazi (Levine 1980), hlodavci (Lv a kol. 2009), přežvýkavci (Lindsay a kol. 2000), ptáci (Ryan a kol. 2003) a další. Zástupci rodu *Cryptosporidium* infikují především žaludek, střeva a respirační trakt. Zároveň existují jak velmi patogenní druhy kryptosporidií, tak druhy bez významných negativních vlivů na hostitelský organismus. Infekci těmito parazity nazýváme kryptosporidióza. Může se projevovat jako akutní, subakutní nebo chronické onemocnění. Nejčastěji je průběh infekce doprovázen silným průjmovým onemocněním spojeným s úbytkem hmotnosti a dehydratací (Xiao a kol. 2004). Imunokompetentní jedince obvykle provází mírnější infekce na rozdíl od imunosuprimovaných jedinců, jako jsou například pacienti s AIDS, kde může infekce probíhat velmi prudce a přivodit hostiteli i smrt. Za referenční druh kryptosporidií se považuje *Cryptosporidium parvum*, neboť je geograficky velmi rozšířeným druhem, významným v oboru veterinárního i medicínského lékařství, je infekční pro velké množství hostitelů a vyznačuje se vysokou infektivitou a produkcí oocyst. Je tedy snadno dostupným druhem, vhodným pro nejrůznější morfologické, imunologické, patologické a biochemické studie.

2. CÍLE PRÁCE

- Zpracovat kriticky literární rešerši o tématu.
- Pomocí experimentálních přenosů popsat průběh infekce *Cryptosporidium* mouse genotype I u *Mus musculus*.
- Popsat velikost exogenních vývojových stádií.
- Studovat genetickou variabilitu dvou izolátů *Cryptosporidium* mouse genotype I.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Historie

První zmínka o kryptosporidiích se objevila ve studiích Ernesta Edwarda Tyzzer. Poprvé tohoto parazita detekoval v žaludečních žlázách u laboratorních myší. V roce 1907 popsal jejich vývojová stádia (Tyzzer 1907). Zjistil, že jejich oocysty jsou vylučovány spolu s exkrementy hostitele. V roce 1910 pak popsal průběh infekce a patogenitu *Cryptosporidium muris* v žaludečních žlázách *Mus musculus*. Na základě pozorování světelným mikroskopem popsal vývojový cyklus *C. muris*. S ohledem na získané výsledky se domníval, že stejný organismus již musel pozorovat Jackson Clark v letech 1894–1895. V roce 1912 Tyzzer popsal další nový druh a to *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). Tohoto parazita lokalizoval v tenkém střevě hostitele. Zjistil také, že oocysty *C. parvum* jsou menší než oocysty *C. muris*. V roce 1929 popsal vývojová stádia parazita ve střevní stěně kuřete. Tento nový druh vyskytující se ve střevních stěnách drůbeže byl v roce 1955 nazván *Cryptosporidium meleagridis*. Jednalo se o první druh kryptosporidií spojovaný s prokazatelně patogenním působením na hostitele a jeho smrtí (Slavin 1955), nicméně zájem o tyto parazity zůstal stále nízký. Až v roce 1970 nastal průlom ve studiu těchto parazitů. Příčinou zájmu bylo spojování přítomnosti kryptosporidií v trusu dobytka s průjmovým onemocněním (Panciera a kol. 1971, Meutin a kol. 1974). V roce 1976 byl poprvé potvrzen výskyt kryptosporidií u lidí (Nime a kol. 1976). Kryptosporidie byly potvrzeny u dvou imunosuprimovaných pacientů sdílejících společnou domácnost. Oba pacienti byli v přímém styku s dobytkem a trpěli silným průjmem. Později byly zaznamenány další případy kryptosporidiózy u lidí (Lasser a kol. 1979, Weisburger a kol. 1979). V roce 1993 opět zájem o studium těchto organismů vzrostl na základě masivní infekce z vody v americkém Milwaukee. Odhaduje se, že kryptosporidiózou onemocnělo až 403 000 lidí (MacKenzie a kol. 1994). Následně se veřejná zdravotnická agenda, vedení zemědělských zařízení a další instituce začaly podílet na studiích o obecné biologii zástupců rodu *Cryptosporidium* se zaměřením na detekci vývojových stádií v prostředí a u nejrůznějších hostitelů, prevenci a léčbu nemocí, které způsobují.

3.2. Taxonomie

Všechny druhy rodu *Cryptosporidium* jsou intracelulární paraziti. Řadíme je mezi eukaryota, což znamená, že většina jejich DNA je centralizovaná v jádře a obalena dvojitou jadernou membránou. Kryptosporidie patří mezi jednobuněčné organismy. Rod *Cryptosporidium* zahrnuje 24 platných druhů a více než 80 genotypů, které řadíme do kmene Apicomplexa. Jsou to parazitické organismy z nichž některé jsou významnými původci chorob člověka a zvířat (Levine 1970). U druhů náležících do kmene Apicomplexa nalézáme tzv. apikální komplex, což je soubor organel na předním konci zoitů. Tento systém umožňuje invazi do hostitelské buňky a u kryptosporidií se podílí na výstavbě stěny parazitoformní vakuoly, jejíž vznik je součástí vývojového cyklu (Hausmann a kol. 2003). Většina druhů náležících do kmene Apicomplexa má složený životní cyklus. Probíhá u nich tedy sexuální i asexuální rozmnožování. Některé druhy se vyvíjí v gastrointestinálním traktu obratlovců. Například druhy z rodů *Eimeria*, *Isospora*, *Cyclospora* a *Cryptosporidium*. I přes četné morfologické shody a podobnosti v životním cyklu kryptosporidií a kokcií bylo molekulární studii genu kódujícího RNA malé ribozomální podjednotky prokázáno, že kryptosporidie mají z fylogenetického hlediska blíže ke gregarinám (Carreno a kol. 1999).

3.3. Zdroj a přenos infekce

K přenosu kryptosporidií z hostitele na hostitele dochází fekálně–orální cestou. Rozlišujeme dva základní způsoby přenosu infekce. Přímý kontakt s infikovaným jedincem, tedy (člověk–zvíře), (člověk–člověk), (zvíře–zvíře), nebo infekce způsobená požitím kontaminované vody nebo potravy (Cacció 2005, Gait a kol. 2008). Oocysty jsou velmi odolné negativním podmínkám vnějšího prostředí díky své trilaminární ochranné vrstvě stěny oocysty, která umožňuje přežití i ve vodě. Proto je také nejčastějším zdrojem infekce voda (Domenéch–Sánchez a kol. 2008). Ke kontaminaci vody nebo potravy dochází výkaly nebo stolicí obsahujícími oocysty.

3.4. Klinické projevy infekce

Klinické projevy kryptosporidiózy jsou závislé na stavu hostitele, druhu parazita a lokalizaci infekce v těle hostitele. Hlavním klinickým projevem kryptosporidiózy s lokalizací ve střevě, jak u imunokompetentních, tak imunosuprimovaných pacientů je silný průjem (Sterling a kol. 1986). Průjem může být provázen bolestmi v abdominální

oblasti, zvýšenou tělesnou teplotou, nepřiměřenou únavou, malátností i zvracením (Thompson 2005). Pokud je preferenčním místem infekce tlusté střevo, onemocnění může probíhat asymptomaticky (Vítovec a kol. 2006). U imunodeficientních jedinců bývá infekce persistentní a často se rozšíří i do dalších orgánů (Current a kol. 1991, Fayer a kol. 1997). Intenzita a délka infekce je závislá na stupni imunodeficiency (Flanigan a kol. 1992). Proto kryptosporidie představují obzvláště významné riziko pro HIV pacienty s rozvinutým AIDS, u kterých může dojít následkem dehydratace a malnutrice až ke smrti (Navin a kol. 1987, Blanshard a kol. 1992).

3.5. Prepatentní a patentní perioda

Prepatentní doba udává nejkratší časový interval od požití infekčních oocyst hostitelem do detekce první oocysty v exkrementech hostitele. Tato doba závisí jak na hostitelském organismu, tak na jednotlivém druhu *Cryptosporidium* a v neposlední řadě na infekční dávce. Experimentálně zjištěná prepatentní perioda se pohybuje v rozmezí 2–7 dní pro *Cryptosporidium parvum* u telat (Tzipori a kol. 1983), a 4–22 dní u lidí (DuPont a kol. 1995), 2–9 dní pro *Cryptosporidium suis* u prasat (Enemark a kol. 2003), 10–12 dní pro *Cryptosporidium bovis* u dobytka (Fayer a kol. 2005), 6–21 dní pro *Cryptosporidium muris* u myši (Matsui a kol. 1999), 5–6 dní pro *Cryptosporidium felis* u koček (Iseki 1979), 4–24 dní pro *Cryptosporidium baileyi* u kuřat (Current a kol. 1986). Prepatentní perioda u jednotlivých druhů je tedy rozmanitá. Například u lidského izolátu *Cryptosporidium* sp. byla prokázána doba k dokončení vývojového cyklu pouhé tři dny (Current a kol. 1984). Jiní autoři pak uvádějí dokonce i kratší interval a to 12–14 hodin (Smith a kol. 2005).

Patentní perioda udává dobu trvání infekce. Ta je obvykle charakterizována počtem dní, po kterou dochází k vylučování oocyst z těla hostitele. Experimentálně získané hodnoty patentní periody se pohybují v rozmezí 1–12 dní pro *C. parvum* u telat (Tzipori a kol. 1983), 1–20 dní u lidí, 9–15 dní pro *C. suis* u prasat (Enemark a kol. 2003), 18 dní pro *C. bovis* u dobytka (Fayer a kol. 2005), 7–10 dní pro *C. felis* u koček (Iseki 1979) a do 18 dní pro *C. baileyi* u kuřat (Current a kol. 1986). Nicméně v přirozených podmínkách se délka patentních period u jednotlivých druhů může výrazně lišit, zejména v závislosti na věku hostitele a dalších koinfekcích.

3.6. Lokalizace kryptosporidií

Kryptosporidie nejčastěji nalézáme v zažívacím traktu. Jejich místo působení je většinou u jednotlivých druhů specifické. Například infekce *C. parvum* je primárně lokalizována v tenkém střevě. Kryptosporidie však byly nalezeny i v extraintestinálních prostorech jak u lidí, tak u zvířat (Fleta a kol. 1995). Ve sliznici žaludečních žláz byly nalezeny *C. muris*, *C. andersoni* nebo *C. serpentis*. *Cryptosporidium baileyi* pak nacházíme u ptáků, kde napadají respirační trakt a kloaku (Current et al. 1986). U ovcí a prasat byla infekce detekována i ve žlučníku, močovém měchýři, lymfatických uzlinách, varlatech a děloze (Fleta a kol. 1995).

3.7. Vývojový cyklus

Referenčním druhem pro popsání životního cyklu kryptosporidií je *C. parvum*. Předpokládá se, že ve vývojovém cyklu jednotlivých druhů rodu *Cryptosporidium* se vyskytují pouze nepatrné odchylky. Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní. Skládá se z pěti hlavních fází: excystace, invaze hostitelské buňky, merogonie, gamogonie a sporogonie.

3.7.1. Excystace

Endogenní fáze životního cyklu začíná v okamžiku, kdy je oocysta pozřena hostitelem. Jakmile se dostane do těla nového hostitelského organismu, dochází k excystaci. Dochází k otevření stěny oocysty na jedné straně a uvolnění sporozoitů. U většiny kryptosporidií je excystace podmíněna předchozím vystavením oocysty kyselému prostředí v žaludku nebo pankreatickým enzymům či žlučovým solím v duodenu. Na základě experimentálních studií však bylo prokázáno, že oocystám k excystaci může postačit i vyšší teplota vodního prostředí. Za těchto podmínek pak může docházet k infekcím oka a respiračního traktu (Fayer a kol. 1990).

3.7.2. Invaze

Sporozoiti excystované z oocysty jsou pohybliví, kompetentní přichytit se k potenciální hostitelské buňce a mají schopnost aktivně buňku napadnout (Wetzel a kol. 2005). Je pro ně charakteristická přítomnost sekrečních organel, které využívají k invazi do hostitelské buňky (O'Hara a kol. 2005). Sporozoiti mají apikální komplex. Součástí je i glykoprotein CSL, který obsahuje ligandy napomáhající přichycení

k epiteliálním buňkám v průběhu infekce (Riggs a kol. 1997, Langer a Riggs 1999). Podobná funkce byla prokázána i u dalšího glykoproteinu, mucinu lokalizovaném také v apikální části sporozoitů (Cevallos a kol. 2000). Významnou látkou byl shledán i adhezivní trombospondin, který je zásadní pro invazi do hostitelské buňky (Spano a kol. 1998). Po přichycení se tvar sporozoitu z měsíčkového tvaru mění na kulatý. Změna tvaru je zapříčiněna vznikem parazitoforní vakuoly. Parazit je obklopen cytoplazmatickou membránou buněk mikrovillů hostitelského organismu (Umemiya a kol. 2005). Po dokončení procesu internalizace dochází k přeměně na trofozoit. Jádro trofozoita se rozdělí a dochází k nepohlavnímu rozmnožování (merogonii).

3.7.3. Merogonie

Merogonie je fáze nepohlavního rozmnožování. Dochází k ní při dělení jádra trofozoitu. U kryptosporidií obecně rozlišujeme dva typy nepohlavního rozmnožování. Při rozmnožování prvního typu se v merontu vyvíjí 6–8 merozoitů (vývojové stádium podobné sporozoitu). Každý zralý merozoit opouští meront, aby infikoval další hostitelskou buňku a vyvinul se v další meront typu I nebo meront typu II. Meronty typu II tvoří 4 merozoity (Aydin 1997). U druhu *C. bayleyi* je součástí vývojového cyklu meront typu III, ve kterém se tvoří 8 merozoitů (Current a kol. 1986).

3.7.4. Gamogonie

Pohlavní rozmnožování, neboli gamogonii, zahajuje poslední generace merontů. Hostitelskou buňku infikují za současné přeměny v mikrogamont (samčí stádium) nebo makrogamont (samičí stádium). Každý mikrogamont se stává mnohojaderným a každé jádro je začleněno do mikrogamet, spermatických buněk. Makrogamonty, respektive makrogamety zůstávají jednojaderné, ekvivalentní k vajíčku. Proces vzájemného rozpoznání samčích a samičích buněk není dosud zcela znám. Je však zřejmé, že dochází k přichycení, penetraci stěny hostitelské buňky a cytoplazmatické membrány makrogamety a následuje oplození. Po proniknutí mikrogamet skrz cytoplazmatickou membránu makrogamety dochází k předání jádra popřípadě jaderného obsahu. Pouze oplozené makrogamety se mohou vyvinout v oocystu. Po oplození makrogamety se vytváří trilaminární stěna a následuje meioza (Current a kol. 1987).

3.7.5. Sporogonie

Zralé oocysty obsahují 4 sporozoity (Fayer 1997). Oocysty z gastrointestinálního traktu jsou vyloučeny společně s výkaly, zatímco ty z respiračního traktu opouštějí tělo hostitele spolu se slizničním sekretem. U *C. parvum* vzniká přibližně 20 % tenkostěnných oocyst, ty mohou excystovat ještě v hostitelském organismu a podílet se na autoinfekci. Zbýlých 80 % procent jsou silnostěnné oocysty. Ty opouštějí tělo hostitele a jsou zodpovědné za infekci dalších organismů (Current 1985, 1988).

3.8. Kryptosporidie u hlodavců

Hlodavci jsou významnými přenašeči nejrůznějších druhů patogenů. Jsou jednak kosmopolitně rozšířeni, dále v úzkém kontaktu s hospodářskými zvířaty, kde následně může dojít k infekci jak hospodářských zvířat, tak vodních zdrojů. To může následně přinášet riziko infekce i pro člověka (Jellison a kol. 2002, Xiao a kol. 2000, 2006). Díky celosvětovému výskytu a úzkému kontaktu s hospodářskými zvířaty považujeme hlodavce za důležitý objekt studia kryptosporidiových infekcí.

U hlodavců nalézáme mnoho druhů kryptosporidií, z nichž nejvýznamnějšími a bezesporu nejfrekventovanějšími svým výskytem jsou zoonotické druhy *C. parvum* a *C. muris*. Tyto dva druhy byly původně popsány u myši domácí a odlišeny na základě morfologie a rozdílné lokalizace v těle hostitele (Tyzzer 1907, 1912). Následně byly pozorovány u dalších hostitelských druhů jako myšice východní (*Apodemus speciosus*), myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*), myši středozevní (*Mus spretus*) dále u křečků, veverek, hrabošů a burunduků (Iseki 1986, Chalmers a kol. 1994, 1997, Matsui a kol. 2000, Torres a kol. 2000, Hurkova a kol. 2003). Jak u *C. muris*, tak *C. parvum* byly vedle běžně se vyskytujícího typu nalezeny ještě další podtypy, které se liší nejen geneticky ale také infektivitou pro laboratorní hostitele (Hikosaka a Nakai 2005, Kváč a kol. 2008b).

Mezi další významné druhy kryptosporidií infikující hlodavce patří *C. andersoni* nalezené u sviště bobaka (*Marmota bobak*) (Ryan a kol. 2003), *C. wairi* detekováno u morčete domácího (*Cavia aperea porcellus*) (Feng a kol. 2010), *C. melagridis* u křeččka dlouhoocasého (*Peromyscus maniculatus*) (Xiao a kol. 2002, Feng a kol. 2007) a v neposlední řadě i *Cryptosporidium* mouse genotype I (Morgan a kol. 1999).

Tomuto druhu je v posledních letech věnováno poměrně hodně pozornosti, neboť se zdá být primárním zdrojem infekce pro myši domácí. Původně byl tento druh

zaměňován za *Cryptosporidium parvum*, nicméně na základě odlišné morfometrie a molekulární analýzy bylo prokázáno, že se jedná o dva odlišné zástupce rodu *Cryptosporidium* (Xiao a kol. 2004).

Na základě molekulárních analýz bylo potvrzeno, že u myši domácích je nejčastěji detekována infekce *C. muris*, *Cryptosporidium* mouse genotype I a II (Morgan a kol. 1999, 2000, Foo a kol. 2007).

U hlodavců byly popsány další druhy a genotypy, které se vyznačují svou hostitelskou specifitou. Mezi ně řadíme *Cryptosporidium* deer mouse genotype I, II, III, IV infikující křečička dlouhoocasého (*Peromyscus maniculatus*), *Cryptosporidium* rat genotype I, II a III primárně infikující krysy a potkany (Lv a kol. 2009), *Cryptosporidium* shrew genotype vyskytující se u rejsků (Alves a kol. 2005), *Cryptosporidium* vole genotype u hrabošů (Feng a kol. 2007a), *Cryptosporidium* muskrat genotype u ondatry pyžmové (*Ondatra zibethicus*) (Zhou a kol. 2004), *Cryptosporidium* squirrel genotype a *Cryptosporidium* ferret genotype vyskytující se u veverek (Kváč a kol. 2008) a *Cryptosporidium* beaver genotype u bobrů (Feng a kol. 2007a). Tyto jednotlivé druhy a genotypy kryptosporidií často infikují velmi málo hostitelů a to pouze v rámci blízkce příbuzných druhů.

U hlodavců byly detekovány i druhy, které primárně infikují jiné hostitele. Například *Cryptosporidium ubiquitum* běžně se vyskytující u přežvýkavců, jako jsou jelen sika (*Cervus nippon*), jelenec běloocasý (*Odocoileus virginianus*), bulovec běločelý (*Damaliscus pygargus phillipsi*), nyaly jižní (*Tragelaphus angasii*) a u dalších zvířat jako je třeba mýval severní (*Procyon lotor*), je přirozeně infekční i pro celou řadu hlodavců (Perz a Le Blancq 2001, da Silva a kol. 2003, Ryan a kol. 2003, Feng a kol. 2007a, Karanis a kol. 2007, Wang a kol. 2008a).

Je naprosto běžným jevem, že u jednoho hostitele nacházíme několik různých druhů a genotypů kryptosporidií. Například u ondatry pižmové (*Ondatra zibethicus*) byla prokázána současná infekce *Cryptosporidium* muskrat genotype I a II (Zhou a kol. 2004), u čipmanka východního (*Tamias striatus*) byla detekována smíšená infekce *Cryptosporidium* cervine genotype (dnes *Cryptosporidium ubiquitum*) a chipmunk genotype I (Feng a kol. 2007a). Nejčastěji je však smíšená infekce detekovaná u myši domácí (*Mus musculus domesticus*), kde bylo nalezeno nespočet kombinací různých druhů a genotypů (Feng 2008).

3.8.1. *Cryptosporidium* mouse genotype I

Dřívější publikace a články udávají název *Cryptosporidium parvum* mouse genotype, dnes je používán název *Cryptosporidium* mouse genotype I. První pojmenování bylo důsledkem fylogenetické příbuznosti těchto dvou kryptosporidií. Nejblíže má *Cryptosporidium* mouse genotype I k podtypu *Cryptosporidium parvum* IIfA6 se kterým sdílí 97,2 % shodných sekvencí.

Cryptosporidium mouse genotype I byl definován na základě molekulární analýzy genu pro malou ribozomální podjednotku SSU a Acetyl-CoA (Morgan a kol. 1999). Nalezen byl v nejrůznějších geografických oblastech od Španělska, Portugalska přes Velkou Británii, Austrálii a USA. Stejně jako *C. parvum* i *Cryptosporidium* mouse genotype I infikuje širokou škálu hostitelů. Za primární hostitele můžeme považovat myši (*Mus Musculus*) a malé hlodavce, jako je hraboš polní (*Microtus arvalis*), myšice lesní (*Apodemus flavicolis*), norník rudý (*Myodes glareolus*), u kterých *Cryptosporidium* mouse genotype I nalézáme nejčastěji. Oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype I byly ale detekovány i u bizona prérijního (*Bison bison*), takina indického (*Budorcas taxicolor*), pandy červené (*Ailurus fulgens*), levharta skvrnitého (*Panthera pardus*) a paovce hřivnaté (*Ammotragus lervia*) (Lv a kol. 2009). Tento druh byl nalezen i u bažanta ušatého (*Crossoptilum auritum*), není však zcela jasné, zda se nejednalo o pasáž, která se dostala do zažívacího traktu ptáka kontaminovanou vodou nebo potravou. U hadů a ještěrek byly také zjištěny oocysty tohoto druhu v trusu. Zde se však prokazatelně jednalo o pasáž zanesenou do těla spolu s potravou, proto nejsou plazi považováni za přirozené hostitelské organismy druhu *Cryptosporidium* mouse genotype I (Xiao a kol. 2004b). Dosud však výskyt *Cryptosporidium* mouse genotype I nebyl průkazně potvrzen u lidí (Xiao a Fayer 2008, Xiao a Feng 2008). V roce 2007 byly nalezeny oocysty ve stolici dítěte v Indii. Že se jedná o *Cryptosporidium* mouse genotype I, bylo potvrzeno pomocí RFLP analýzy SSU (Ajjampur a kol. 2007). Tato studie však postrádá průkaznost, neboť identický binding pattern při použité PCR-RFLP metodě má i *C. melagridis*. Mohlo se tedy jednat právě o tento druh, který infikuje lidi poměrně často. O hostitelské specifitě, prevalenci, patogenitě a průběhu infekce *Cryptosporidium* mouse genotype I toho není dosud příliš známo. Právě tato práce se snaží zodpovědět na otázky ohledně základních biologických vlastnostech tohoto druhu.

U *Cryptosporidium* mouse genotype I byly určeny dva podtypy IXa a IXb. Není dosud jasné, zda jednotlivé podtypy jsou vázány na geografickou oblast, či nikoli. U

studovaných vzorků byl prokázán podtyp IXa u myši domácí pocházející z Číny, podtyp IXb byl detekován rovněž u myši domácí pocházející z USA (Feng a kol. 2010). Oba podtypy mají pouze 6 kopií mikrosatelitní TCA, což může zodpovídat za nízkou variabilitu *Cryptosporidium* mouse genotype I.

U druhu *Cryptosporidium* mouse genotype I byly provedeny morfologické analýzy, při kterých bylo zjištěno, že oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype I jsou menší než oocysty *Cryptosporidium parvum*. Jednotlivé zdroje se mírně liší. Podle Lv a kol. (2009) jsou oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype I velké $4,83 \times 4,07 \mu\text{m}$. Jiný zdroj udává délku $4,5 \mu\text{m}$ a šířku $4,0 \mu\text{m}$ (Morgan a kol. 1999).

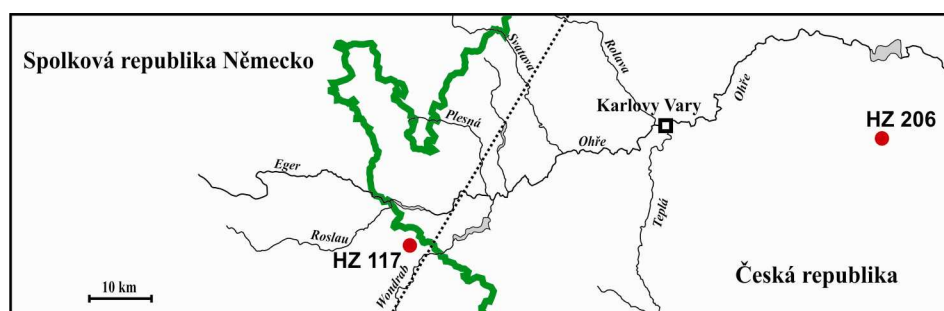
Vedle druhu *Cryptosporidium* mouse genotype I byl popsán i *Cryptosporidium* mouse genotype II. Studie tohoto druhu jsou však zatím na samém počátku i z důvodu nízké produkce oocyst (Foo a kol. 2007).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. PŮVOD IZOLÁTŮ

Na základě předchozích terénních sledování byly v průběhu roku 2009 odchyceny volně žijící myši východoevropské (*Mus musculus musculus*) a myši západoevropské (*Mus musculus domesticus*) v hybridní zóně zmíněných podruhů myši domácí v oblasti hranic západních Čech (Česká republika) a severovýchodní hranice Bavorska (Spolková republika Německo). Myši byly chytány do živochytných pastí v blízkosti lidských obydlí a ve stájích hospodářských zvířat. Odchycené myši byly drženy po dobu 24 hodin na sterilní podestýlce a napájeny a krmeny rovněž sterilně. Všechna zvířata byla vyšetřena na přítomnost kryptosporidií v trusu (kapitola 4.4.).

Z celkového počtu 352 vyšetřených zvířat byly získány dva odlišné izoláty *Cryptosporidium* mouse genotype I označené HZ 117 pocházející z myši *Mus musculus domesticus* (lokalita Münchenreuth) a HZ 206 pocházející z myši *Mus musculus musculus* (lokalita Buškovice) (Obrázek 1).



Obrázek 1: Původ izolátů *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117 a HZ 206.

Jak izolát *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 206, tak izolát *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117 byly nalezeny ve smíšené infekci společně s *Cryptosporidium muris*.

4.2. Pokusná zvířata

Vzhledem k nízké intenzitě infekce *Cryptosporidium* mouse genotype I u původních hostitelů, byly oba izoláty *Cryptosporidium* mouse genotype I pasážovány přes SCID myši (BC AV ČR, Parazitologický ústav vlastní chovy). Z důvodu popisu hostitelské specifity, průběhu infekce a lokalizace vývojového cyklu v hostiteli byly provedeny

experimentální infekce následujících hostitelů: SCID a BALB/c myši, divoké kmeny myši STUS (*Mus musculus musculus*), STRA a SCHEST (*Mus musculus domesticus*), krysa malá (*Mastomys coucha*), pískomil mongolský (*Meriones unquiculatus*), myšice lesní (*Apodemus flavicolis*).

4.3. Uchování a skladování izolátu

Trus infikovaných myší byl sbírán a skladován v plastových nádobách v 2,5% dichromanu draselném.

4.4. Detekce oocyst kryptosporidií v trusu (koprologické vyšetření)

4.4.1. Barvení oocyst Miláček–Vítovec

Oocysty v nátěru trusu byly obarveny specifickým barvením.

Zásobní roztoky:

- roztok metyl violeti
0,6 g metylvioleti
1 ml anilinu
1g fenolu
30 ml 96 % alkoholu
70 ml deionizované vody
- 2% roztok kyseliny sírové
- 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

Postup:

1. Na podložní sklo byl natřen vzorek trusu.
2. Po zaschnutí byl fixován metanolem v plameni.
3. Sklíčko bylo barveno v kyvetě roztokem metylvioleti po dobu 30 minut.
4. Kyveta se sklem byla důkladně propláchnuta vodou.
5. Do kyvety byl nalit 2 % roztok kyseliny sírové po dobu 2 minut.
6. Kyveta se sklíčkem byla znovu propláchnuta vodou.
7. Sklo bylo dobarveno roztokem tartrazinu 3 minuty.
8. Nátěr byl opláchnut proudem vody.

Sklo s nátěrem bylo následně prohlíženo světelným mikroskopem (Olympus BX 51) s imerzním olejem při zvětšení 1000×. Oocysty byly zbarvené fialově na světlejším pozadí.

4.5. Určení intenzity infekce

Intenzita infekce byla zjišťována pomocí nátěrů v průběhu infekčního období. Po odebrání vzorku trusu, vytvoření a obarvení nátěru bylo sklíčko prohlédnuto světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Oocysty byly počítány na celé sklo. Hmotnost trusu byla zjištěna na základě váhového rozdílu skla a skla s nátěrem trusu. Intenzita byla pak vyjádřena jako počet oocyst na gram trusu (OPG).

4.6. Oddělení izolátu

Oba izoláty *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117 a *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 206 byly získány jako smíšená infekce s *Cryptosporidium muris* z přirozených hostitelů. Izoláty byly odděleny na základě rozdílné prepatentní periody střevních a žaludečních kryptosporidií. Čistý izolát *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 206 a HZ 117 byl získán následujícím způsobem: Po perorální infekci SCID myši směsnou dávkou obsahující oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype I a *Cryptosporidium muris* byl monitorován průběh infekce od druhého dne po infekci. Při detekci prvních oocyst *Cryptosporidium* mouse genotype I v trusu byly exkrementy individuálně sbírány a mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií (kapitola 4.4.). Vzhledem ke kratší prepatentní periodě střevních kryptosporidií byly

vzorky trusu sbírány od 3 do 5 dne po infekci. V případě, že byl prokázán výskyt oocyst *C. muris*, takový vzorek nebyl použit k opakované pasáži *Cryptosporidium* mouse genotype I.

4.7. Příprava infekční dávky

4.7.1. Test na viabilitu

Pomocí tohoto testu bylo zjištěno procento životaschopných oocyst, tedy oocyst vhodných pro infekci zvířat.

Zásobní roztoky:

- Propidium iodid
1 mg propidium iodidu / 1 ml 0,1 M PBS (pH 7,2)

Postup:

1. Do eppendorfkky bylo dáno 100 μ l suspenze s oocystami (počet oocyst by neměl být větší než 10^6 ve 100 μ l).
2. Bylo přidáno 10 μ l zásobního roztoku propidium iodidu.
3. Po promíchání byla suspenze barvena ve tmě po dobu 30 minut.
4. Po barvení byla suspenze centrifugována 3 minuty při 1340 g.
5. Supernatant byl odsán a objem doplněn PBS.
6. Oocysty byly pozorovány na jamkovém sklíčku fluorescenčním mikroskopem s filtrem o vlnové délce 590 nm zvětšení 40 \times (Olympus IX 70).

Mrtvé, neinfekční oocysty byly detekovány podle červené fluorescence. Bylo vyhodnoceno 300 oocyst a byla vypočtena jejich životaschopnost.

4.7.2. Infikování zvířat

Zvířata byla infikována perorálně podáním 200 μ l suspenze s obsahem 1×10^6 životaschopných oocyst.

Postup:

1. Do Bürkerovy komůrky byla přidána suspenze s oocystami.
2. Komůrka byla prohlížena světelným mikroskopem (Olympus BX 51) při zvětšení 400 \times .
3. Oocysty byly počítány v 25 různých čtvercích.
4. Výsledný součet všech oocyst v 25 čtvercích vynásobený 10^4 udává konečnou koncentraci oocyst v 1 ml suspenze.

4.8. Čištění oocyst

4.8.1. Příprava materiálu pro čištění na sacharózovém gradientu

Před samotným čištěním bylo zapotřebí nasbíraný trus ještě rozmělnit a zbavit od větších částic v trusu.

Postup:

1. Materiál byl nalit do třecí misky a tloučkem rozmělněn.
2. Dále byl přepasírován pomocí špachtle přes sítko do kádinky. V průběhu bylo čajové sítko promýváno destilovanou vodou, aby nedocházelo k velkým ztrátám oocyst.
3. Sítko bylo několikrát promýváno vodou a získaná suspenze dvakrát přecezena.

Takto připravený materiál byl použit na čištění na sacharózovém gradientu.

4.8.2. Čištění na sacharózovém gradientu

Zásobní roztoky:

- Sheaterův roztok
259 ml deionizované vody
405 g cukru
7,29 g fenolu
- Pracovní Sheaterovy roztoky
1+2 (1 díl Sheateru + 2 díly PBS Tween)
1+4 (1 díl Sheateru + 4 díly PBS Tween)
- 1% PBS Tween
1 l PBS s přídatkem 0,5 ml Tween 20

Postup:

1. Do jednotlivých kyvet bylo nalito 30 ml pracovního roztoku 1+2 a následně na něj navrstveno 30 ml roztoku 1+4.
2. Na gradient bylo navrstveno pomocí kapátka 15 ml suspenze s oocystami.
3. Kyvety byly centrifugovány 20 minut při 1370 g a při 4 °C.
4. Oocysty byly koncentrovány na rozhraní gradientu. Vrchní zbarvená část s nečistotami byla odsáta pomocí vývěvy.
5. Supernatant byl přelit do čisté nádoby a objem byl doplněn destilovanou vodou.
6. Následně byl centrifugován 20 minut při 1370 g.
7. Supernatant byl odsán vývěvou do ½ a znovu doplněn destilovanou vodou.
8. Tento postup byl zopakován ještě jednou. Celkově bylo provedeno trojí promývání.
9. Po poslední centrifugaci byl sediment přenesen do čisté zkumavky s PBS nebo destilovanou vodou.

4.8.3. Cesium chloridový gradient

Oocysty vyčištěné přes sacharózový gradient byly dále čištěny na cesium–chloridovém gradientu.

- Zásobní roztoky:CsCl roztok cesium chloridu (hustota 1,15) (21,07 g CsCl + 100 ml deionizované vody)
- PBS (0,025 M, pH 7,2)

Postup:

1. Oocysty vyčištěné na cukru byly centrifugovány 20 minut při 1370 g a teplotě 4 °C. Sediment byl resuspendován v PBS.
2. Do eppendorfky o objemu 2 ml bylo napipetováno 1000 µl roztoku CsCl a následně opatrně navrstveno 500 µl suspenze oocyst v PBS.
3. Eppendorfky byly centrifugovány po dobu 3 minut při 14000 g.
4. Na rozhraní PBS a CsCl byl prstenec oocyst. Pomocí pipety byl odebrán do čisté zkumavky.
5. Suspenze čistých oocyst byla doředěna roztokem PBS a následně znovu centrifugována 3 minuty při 14000 g.
6. Supernatant byl odsán a sediment znovu naředěn roztokem PBS.
7. Tento postup byl opakován ještě jednou, aby byl roztok CsCl důkladně vymyt ze suspenze s oocystami.
8. Oocysty byly uchovávány v chladícím zařízení při 4 °C v roztoku PBS.

4.9. Sledování průběhu infekce

Infekce byla sledována po dobu 30 dní po infekci (DPI). Od každého zvířete byl denně odebrán vzorek trusu. Vzorek byl obarven pomocí barvení pomocí Miláčka–Vítovce (kapitola 4.4.) a sklo prohlíženo světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Část vzorku trusu byla uchována pro případnou molekulární analýzu v mikrozkuhavce při –20 °C. Pokud byla přítomnost oocyst v trusu u daného hostitele potvrzena koprologickým vyšetřením (kapitola 4.4.), molekulární analýzou byla potvrzena identita izolátu, který byl zvířeti podán (kapitola 4.12.).

4.10. Morfometrická analýza oocyst

Morfometrická analýza byla provedena jak u izolátu HZ 117, tak u izolátu HZ 206. Z každého izolátu bylo změřeno 150 oocyst a to vždy šířka a délka. Dohromady bylo provedeno 300 měření u každého izolátu. Pro morfometrickou analýzu byla použita digitální analýza obrazu, software M.I.S QuickPHOTO Pro, fotoaparát Olympus Camedia C-5060widezoom, 5.1 megapixelů a mikroskop Olympus BX 51. Oocysty byly změřeny v nativním stavu (Nomarski kontrast). Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí analýzy variance (ANOVA) ve statistickém programu Statistica, Realase 5.1. (Statsoft, Tulsa, OK, USA 1997).

4.11. Histopatologické vyšetření

U hostitelů, u nichž byla prokázána vnímavost na základě mikroskopického vyšetření trusu, bylo u vybraných zvířat provedeno 6. den po infekci histopatologické vyšetření žaludku a střeva, které bylo rozděleno na 1 cm dlouhé úseky. U jednotlivých částí zažívacího traktu byla vývojová stádia kryptosporidií detekována za pomoci barvení hematoxylinem–eosinem, Wolbachovou metodou a specifickými monoklonálními protilátkami proti stěně oocysty (kapitoly 4.11.5.). Intenzita infekce v jednotlivých částech zažívacího traktu byla hodnocena semikvantitativní metodou na základě počtu detekovaných vývojových stádií (Tabulka I).

Tabulka I: Semikvantitativní hodnocení intenzity infekce v zažívacím traktu hostitele na základě počtu detekovaných vývojových stádií na 1 cm střeva.

Intenzita infekce	Počet vývojových stádií
negativní	0
+	$0 < a \leq 50$
++	$50 < a \leq 100$
+++	>100

4.11.1. Příprava vzorků pro histologické zpracování

Zásobní roztoky:

- AFA (Alcohol–Formalin–Acid)
60 ml 40% formalínu
500 ml 95% etanolu
40 ml ledové kyseliny octové
400 ml deionizované vody
řada alkoholů (70%, 80% a 96%)

Postup:

1. Jednotlivé části střeva byly rozděleny na úseky o délce 1 cm, podélně rozstříženy a obsah střeva byl vymyt destilovanou vodou.
2. Rozstřížené střevo bylo narovnáno na kousek papírku a na Petriho misce fixováno roztokem AFA.
3. Následně byly vzorky fixovány v nadbytku AFA roztoku.
4. Po fixaci byly tkáně odvodněny ve stoupající řadě alkoholů (70%, 80% a 96%) po 5 minutách v každém roztoku
5. Po odvodnění byl alkohol z tkání vymyt. Tkáně byly přesyceny xylenem 3×20 minut a přeneseny do tekutého parafínu.
6. Nakonec byly vzorky přeneseny do přefiltrovaného parafínu a zhotoveny bločky.
7. Z bloček byly na mikrotonu krájeny řezy tenké 4–8 μm .

Před barvením byly řezy odparafínovány xylenem 3×20 minut a odvodněny přes snižující se alkoholovou řadu (96%, 80% a 70%). Nakonec byly řezy dvakrát opláchnuty destilovanou vodou po dobu 5 minut.

4.11.2. Barvení hematoxylinem-eosinem

Zásobní roztoky:

- Mayerův hematoxylin
1000 ml destilované vody
1 g hematoxylinu
0,2 g jodičnanu sodného
50 g kamence draselného

- 1 g kyseliny citronové
- 50 g chloralhydrátu
- 0,2% eosin
- 190 ml destilované vody
- 5 ml 2% eosinu
- 1 ml 1% kyseliny octové

Postup:

1. Odparafinované a odvodněné řezy byly barveny v kyvetě Mayerovým hematoxylinem po dobu 15 minut.
2. Řezy byly opláchnuty tekoucí vodou.
3. Poté byly řezy barveny 3–7 minut v kyvetě eosinem.
4. Nakonec byly preparáty opláchnuty tekoucí vodou.

Preparáty byly prohlíženy světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

4.11.3. Barvení Wolbachovou metodou

Zásobní roztoky:

- Giemsa (pracovní roztok byl ředěn vodou 1:10)
 - 4 ml Giemsa
 - 5 ml etanolu
 - 0,4 ml Na₂CO₃
 - 100 ml deionizované vody
- diferenciální roztok kalafuny (pracovní roztok byl ředěn etanolem 1:100)
 - 10 g kalafuny
 - 100 ml etanolu

Postup:

1. Odparafinované a odvodněné řezy byly barveny v kyvetě roztokem Giemsa přes noc.
2. Řezy byly opláchnuty deionizovanou vodou a 96% etanolem
3. Následně byly ponořeny do diferenciálního roztoku kalafuny na několik sekund.
4. Opět byly opláchnuty deionizovanou vodou a 96% etanolem.

Nabarvené preparáty byly prohlíženy světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Kryptosporidie byly zbarvené tmavě fialově.

4.11.4. *Cryptosporidium* – IF test

Tento test slouží k detekci kryptosporidií pomocí specifické monoklonální protilátky proti stěně oocysty.

Postup:

1. Nejprve byla připravena kontrola. Na jamkové sklíčko bylo kápnuto 20 µl suspenze s oocystami daného izolátu. Vzorek se nechal uschnout a následně byl fixován 5 minut v metanolu.
2. Byla připravena vlhká komůrka. Do ní byly naskládány odparafinované histologické preparáty spolu s kontrolou.
3. Na jednotlivé preparáty bylo kápnuto 10 µl Crypto Cell Regentu (Cellabs).
4. Preparáty byly inkubovány ve vlhké komůrce při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.
5. Následně byly preparáty omyty PBS a osušeny.
6. Bezprostředně před prohlížením bylo na prohlížený preparát aplikováno 10 µl mounting fluid.
7. Na preparát bylo přiloženo krycí sklíčko.

Preparáty byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem s filtrem o vlnové délce 520 nm. Oocysty byly zbarveny zeleně.

4.12. Molekulární analýza

4.12.1. Izolace DNA

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

Postup:

1. 200 mg trusu bylo dáno do Safe–Lock–Tube.
2. K materiálu byly přidány skleněné kuličky a 900 µl Lysis Buffer P.

3. Obsah byl rozbíjen po dobu 60 s při rychlosti 5,5 m/s pomocí beat beateru (MP Fast Prep–24).
4. Zkumavky byly inkubovány v termobloku při 95 °C po dobu 10 minut a následně centrifugovány 1 minutu při 16 000 g.
5. Veškerý supernatant byl přenesen do zkumavek InviAdsorb–Tube a zvortexován 15 s.
6. Obsah byl inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě. Následně byla zkumavka centrifugována 3 minuty při 16 000 g.
7. Supernatant byl přepipetován do čistých mikrozkušavek a znovu centrifugován 3 minuty při 16 000 g.
8. Do nových mikrozkušavek bylo napipetováno 25 µl Proteinase K a bylo přidáno 400 µl supernatantu. Veškerý obsah zkumavky byl zvortexován a následně inkubován v termobloku při 70 °C po dobu 10 minut.
9. Do zkumavky bylo přidáno 400 µl Binding Buffer P a zvortexováno.
10. Veškerý objem byl přenesen do Spin Filter + Tube a inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugován 1 minutu při 16 000 g.
11. Z mikrozkušavky byl vylit odpad a napipetováno 500 µl promývacího roztoku Wash I. Eppendorfka byla znovu centrifugována 1 minutu při 14 000 g.
12. Znovu byl vylit odpad a kolonka promyta 800 µl promývacího roztoku Wash II a opět centrifugována 1 minutu při 14 000 g.
13. Naposledy byl odpad vylit a mikrozkušavka s kolonou centrifugována 3 minuty při 14 000 g.
14. Odpadní mikrozkušavka byla vyhozena a nahrazena novou vyautoklávovanou mikrozkušavkou. Na kolonu bylo připipetováno 200 µl Elution Buffer D předehřátého na 70 °C. Obsah byl inkubován 3 minuty při laboratorní teplotě.
15. Na závěr byla zkumavka centrifugována 1 minutu při 6 000 g.

Získaná DNA byla uchovávána v mrazícím zařízení při –20 °C.

4.12.2. Polymerázová řetězcová reakce

Polymerázová řetězcová reakce byla použita k průkazu specifické DNA *Cryptosporidium* mouse genotype I pro ověření identity izolátu, jímž bylo dané zvíře infikováno (kapitola 5.3.) a dále pro určení délky patentní periody infekce u vnímavých hostitelů (kapitola 5.4.). Pro ověření identity izolátu byl proveden průkaz specifické DNA pouze za využití primerů pro amplifikaci části genu kódujícího glykoprotein 60 (GP60). Pro zjištění patentních period byly použity reakční směsi pro malou ribozomální podjednotku (SSU). Pro vnitrodruhovou variability obou studovaných izolátů byly použity primery amplifikující SSU, TRAP-C1 (trombospondin adhezivní protein), COWP (protein stěny oocysty kryptosporidií) a GP60 (Tabulka II, III, IV, V).

Zásobní roztoky:

- PCR H₂O
- MgCl₂ (25mM)
- 10 × koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu
- Taq purple DNA polymeráza
- deoxyribonukleosid trifosfáty
- primery (10μM)
- bovinní sérový albumin (BSA 10mg / ml)

Sety primerů pro molekulární analýzy

Primery pro amplifikaci části genu kódující RNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA)

Primární primery

- F 5' – TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG – 3'
- R 5' – CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA – 3'

Sekundární primery

- F 5' – GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG – 3'
- R 5' – CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A – 3'

Primery pro amplifikaci části genu kódujícího trombospondin adhezivní protein

(TRAPC-1)

Primární primery

- F 5' – GGA TGG GTA TCA GGT AAT AAG AA – 3'
- R 5' – CAA CTA GCC CAG TTC TGA CTC TCT GG – 3'

Sekundární primery

- F 5' – CCA ATT TCT TGA ACA TAT TCT GAG TG – 3'
- R 5' – AGA AAG TTG TAA TAA AGA TGT GGA ATG – 3'

Primery pro amplifikaci části genu kódujícího protein stěny oocysty kryptosporidií

(COWP)

Primární primery

- F 5' – CGC ACC TGT TCC CAC TCA ATG TAA ACC C – 3'
- R 5' – ACC GCT TCT CAA CAA CCA TCT TGT CCT C – 3'

Sekundární primery

- F 5' – GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G – 3'
- R 5' – GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G – 3'

Primery pro amplifikaci části genu kódujícího glykoprotein 60 (GP60)

Primární primery

- F 5' – ATA GTC TCC GCT GTA TTC – 3'
- R 5' – GGA AGA AAC GAT GTA TCT – 3'

Sekundární primery

- F 5' – TCC GCT GTA TTC TCA GCC – 3'
- R 5' – GCA GAG GAA CCA GCA TC – 3'

Tabulka II: Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu SSU.

Primární reakce		55 °C	Sekundární reakce		55 °C
H₂O	-----	11,30 µl	H₂O	-----	12,10 µl
MgCl₂	25 mM	1,20 µl	MgCl₂	25 mM	1,20 µl
10×buffer	-----	2,00 µl	10×buffer	-----	2,00 µl
dNTP	10 mM	0,40 µl	dNTP	10 mM	0,40 µl
forward	10 µM	0,40 µl	forward	10 µM	0,40 µl
reverse	10 µM	0,40 µl	reverse	10 µM	0,40 µl
BSA	10 mg/ml	0,80 µl	BSA	10 mg/ml	-----
taq	1U/1µl	0,50 µl	taq	1U/1µl	0,50 µl
DNA	-----	3,00 µl	DNA	-----	3,00 µl
celkem	-----	20,00 µl	celkem	-----	20,00 µl

Tabulka III: Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu TRAPC-1.

Primární reakce		55 °C	Sekundární reakce		53 °C
H₂O	-----	11,66 µl	H₂O	-----	11,26 µl
MgCl₂	25 mM	1,20 µl	MgCl₂	25 mM	1,60 µl
10×buffer	-----	2,00 µl	10×buffer	-----	2,00 µl
dNTP	10 mM	0,50 µl	dNTP	10 mM	0,50 µl
forward	10 µM	0,72 µl	forward	10 µM	0,72 µl
reverse	10 µM	0,72 µl	reverse	10 µM	0,72 µl
BSA	10 mg/ml	0,40 µl	BSA	10 mg/ml	0,40 µl
taq	1U/1µl	0,80 µl	taq	1U/1µl	0,80 µl
DNA	-----	2,00 µl	DNA	-----	2,00 µl
celkem	-----	20,00 µl	celkem	-----	20,00 µl

Tabulka IV. Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu COWP.

Primární reakce		55 °C	Sekundární reakce		53 °C
H₂O	-----	11,66 µl	H₂O	-----	11,26 µl
MgCl₂	25 mM	1,20 µl	MgCl₂	25 mM	1,60 µl
10×buffer	-----	2,00 µl	10×buffer	-----	2,00 µl
dNTP	10 mM	0,50 µl	dNTP	10 mM	0,50 µl
forward	10 µM	0,72 µl	forward	10 µM	0,72 µl
reverse	10 µM	0,72 µl	reverse	10 µM	0,72 µl
BSA	10 mg/ml	0,40 µl	BSA	10 mg/ml	0,40 µl
taq	1U/1µl	0,80 µl	taq	1U/1µl	0,80 µl
DNA	-----	2,00 µl	DNA	-----	2,00 µl
celkem	-----	20,00 µl	celkem	-----	20,00 µl

Tabulka V. Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu GP60.

Primární reakce		55 °C	Sekundární reakce		55 °C
H₂O	-----	11,30 µl	H₂O	-----	12,10 µl
MgCl₂	25 mM	1,20 µl	MgCl₂	25 mM	1,20 µl
10×buffer	-----	2,00 µl	10×buffer	-----	2,00 µl
dNTP	10 mM	0,40 µl	dNTP	10 mM	0,40 µl
forward	10 µM	0,40 µl	forward	10 µM	0,40 µl
reverse	10 µM	0,40 µl	reverse	10 µM	0,40 µl
BSA	10 mg/ml	0,80 µl	BSA	10 mg/ml	-----
taq	1U/1µl	0,50 µl	taq	1U/1µl	0,50 µl
DNA	-----	3,00 µl	DNA	-----	3,00 µl
celkem	-----	20,00 µl	celkem	-----	20,00 µl

Všechny PCR protokoly zahrnovaly počáteční denaturaci 94 °C po dobu 3 minut a 35 cyklů skládajících se z 94 °C po dobu 45 s, specifické nasedací teploty (uvedeny v tabulkách II, III, IV, V) po dobu 45 s, 72 °C po dobu 60 s a finálním dosyntetizováním řetězců při 72 °C po dobu 10 minut.

4.13. Gelová elektroforéza

Pomocí gelové elektroforézy byla zjištěna velikost fragmentů. Byl použit 1,5 % agarózový gel s přídavkem ethidium–bromidu (pro sekundární PCR reakce). Výsledek byl vizualizován pomocí UV transiluminátoru při vlnové délce 320 nm.

Zásobní roztoky:

- 50 × TAE pufr (242 g tris báze; 457,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA)
- Agaróza (Biotech, ČR)
- 100 bp DNA Ladder (Biogen, ČR)
- ethidium–bromid (Sigma–Aldrich, ČR)

Postup:

1. Agaróza byla v Erlenmeyerově baňce smíchána s 1× TAE pufr.
2. Následně byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě a poté ochlazena tekoucí vodou na cca 50 °C.
3. Do roztoku byly přimíchány 3 µl ethidium–bromidu.

4. Do připravené formy byl nalit agarózový gel a následně do něj byl vložen hřeben. Gel byl ponechán ztuhnout.
5. Po ztuhnutí byl hřeben vyjmut a do jedné jamky bylo aplikováno 1× 10 µl ladderu a do následujících jamek 20 µl sekundárního PCR produktu s rodově specifickými primery.
6. Napětí bylo nastaveno na 70 V a vyvýjení probíhalo dokud nedošlo k separaci všech fragmentů (cca 60 minut).

DNA fragmenty byly vizualizovány UV transluminátorem a dokumentovány (Electronic UV transiluminator).

4.14. Sekvenace

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány za použití sekundárních primerů. K přípravě vzorků k sekvenaci byl použit ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Sekvence byly upraveny v programu ChromasPro (Technelysium, Queensland, Australia). Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank pomocí programu ClustalX.

4.15. Fylogenetická analýza

Pro posouzení genetické příbuznosti různých druhů, genotypů, případně subtypů v rámci genotypizace GP60 rodu *Cryptosporidium*, byly vytvořeny fylogenetické stromy pomocí programu TreeconW založené na evoluční vzdálenosti vypočítané pomocí modelu Kimura–2–parametrického testu (neighbor–joining).

4.16. Statistická analýza

Rozdíly ve velikosti oocyst testovaných izolátů byly vyhodnoceny pomocí programu Statistica 8.0 (Statsoft, USA).

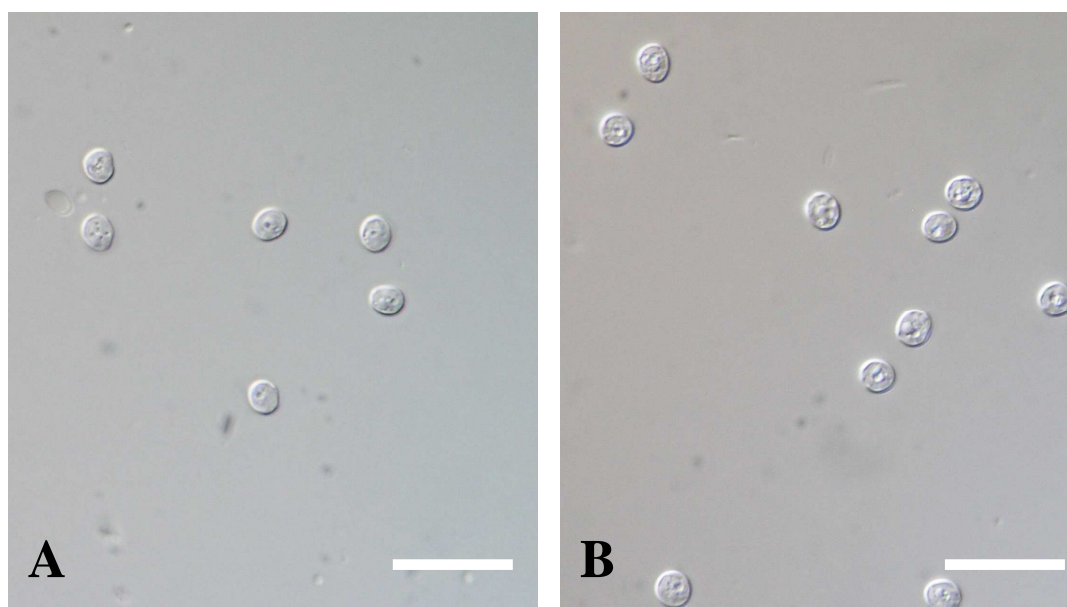
5. VÝSLEDKY

5.1. Morfometrická analýza oocyst

Veškeré naměřené hodnoty šířky a délky oocyst v nativním stavu byly vyhodnoceny na základě vypočítaných průměrných délek a šířek jednotlivých oocyst. Byl vypočten index tvaru pro oba izoláty. Na základě měření oocyst v nativním stavu (Obrázek 2) bylo zjištěno, že rozměry oocyst izolátu HZ 206 jsou statisticky významně větší ($P < 0,01$) než rozměry oocyst izolátu HZ 117 (Tabulka VI).

Tabulka VI: Morfologické parametry oocyst *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117 a HZ 206.

	<i>Cryptosporidium</i> mouse genotype I HZ 117	<i>Cryptosporidium</i> mouse genotype I HZ 206
délka	4,2 μm (3,6–5,1)	4,5 μm (4,0–5,0)
šířka	3,7 μm (3,2–4,3)	3,9 μm (3,4–4,4)
index tvaru	1,16	1,16

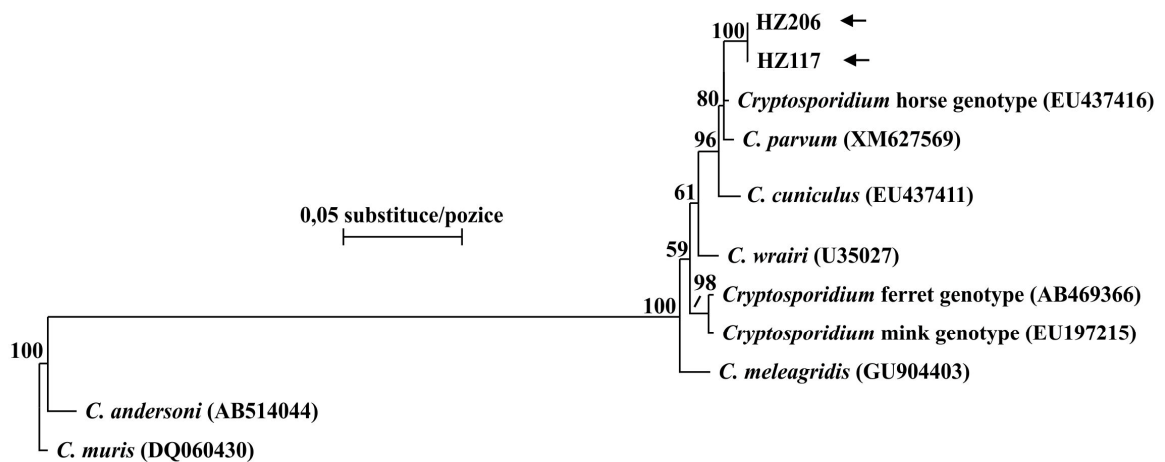


Obrázek 2: Oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype I v nativním stavu. Izolát HZ 117 (A) a izolát HZ 206 (B). Měřítko = 10 μm .

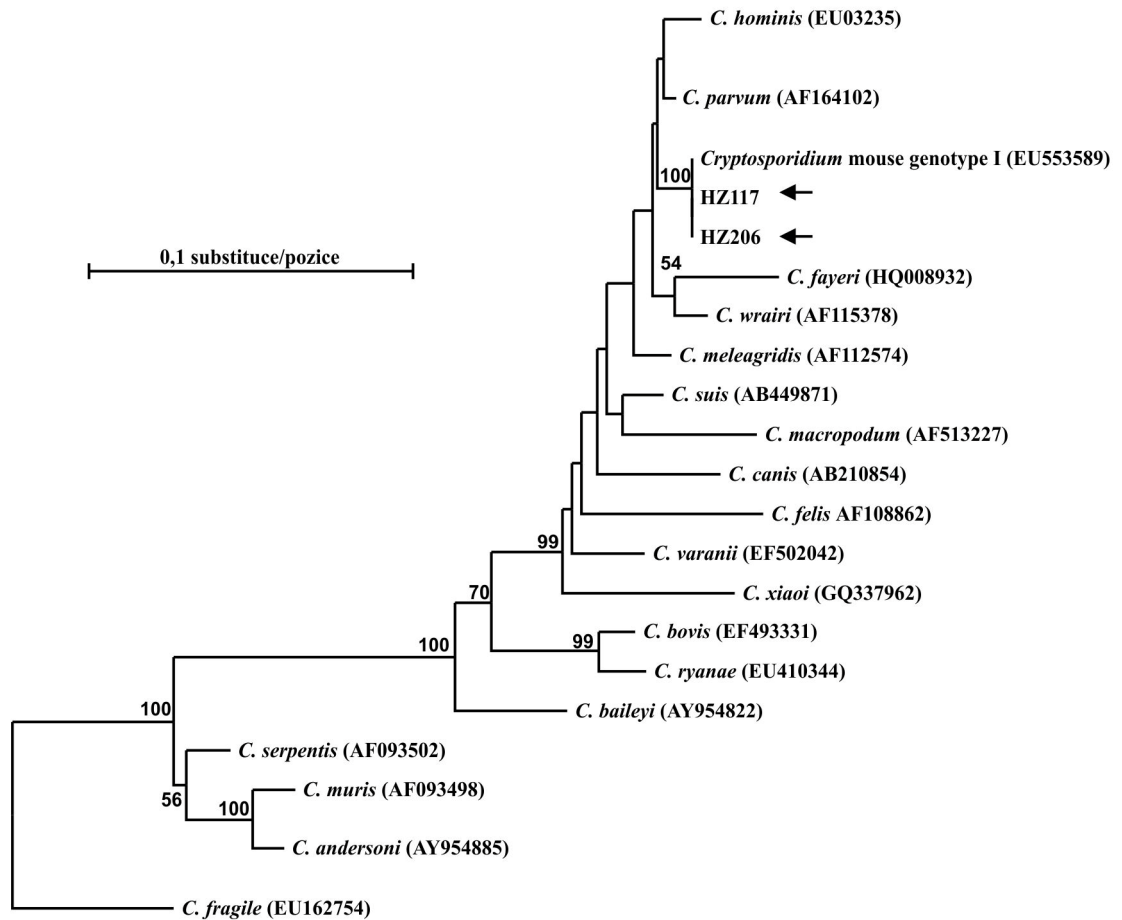
5.2. Genetická variabilita *Cryptosporidium* mouse genotype I

Na základě fylogenetických analýz založených na porovnání sekvencí části genů kódujících rRNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA), trombospondin adhezivní protein (TRAP–C1) nebo protein stěny oocysty kryptosporidií (COWP) nebyla mezi izoláty HZ 117 a HZ 206 zjištěna žádná variabilita. U obou izolátů byly detekovány identické sekvence zmíněných genů (Obrázky 3, 4 a 5). Zároveň byly všechny získané sekvence odlišné od odpovídajících sekvencí ostatních druhů a genotypů kryptosporidií.

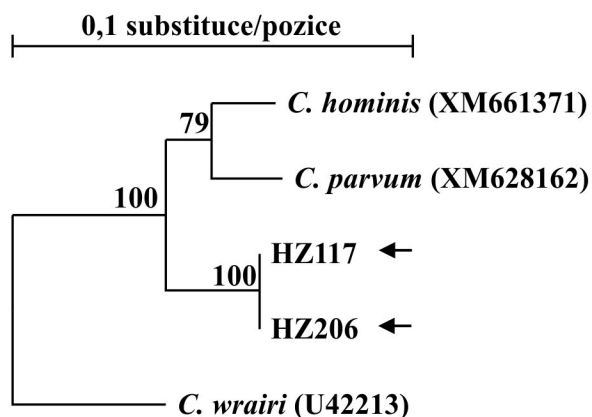
Analýzy sekvencí SSU rDNA, jež byly k dispozici od největšího počtu druhů a genotypů kryptosporidií, ukázaly shodu našich izolátů s *Cryptosporidium* mouse genotype I (EU553589). Sekvence genů COWP a TRAP–C1 pro tento genotyp nejsou k dispozici v databázi GenBank. *Cryptosporidium* mouse genotype I reprezentovaný našimi izoláty HZ 117 a HZ 206 je dle našich analýz sesterský k druhům *C. parvum* a *C. hominis*, respektive ke *Cryptosporidium* horse genotype (v případě COWP).



Obrázek 3. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z *Mus musculus musculus* (*Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 206) a z *M. m. domesticus* (*Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117) (šipky) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího protein stěny oocysty kryptosporidií (COWP) vytvořený metodou neighbor–joining v programu Treecon, 1000× bootstrap, znázorněny podpory větví více než 50 %.

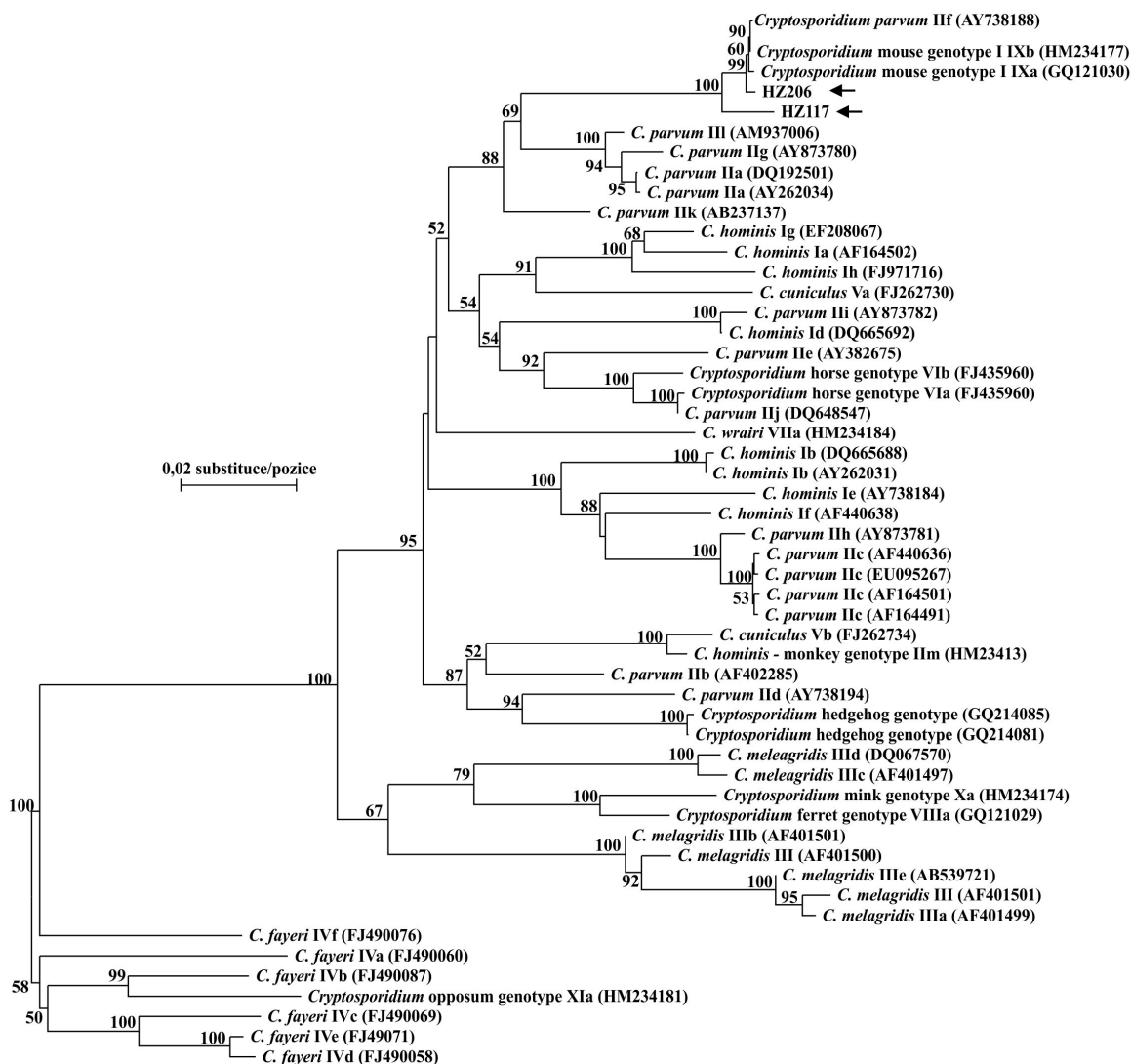


Obrázek 4. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z *Mus musculus musculus* (*Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 206) a z *M. m. domesticus* (*Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117) (šipky) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódující RNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA) vytvořený metodou neighbor-joining v programu Treecon, 1000× bootstrap, znázorněny podpory větví více než 50 %.

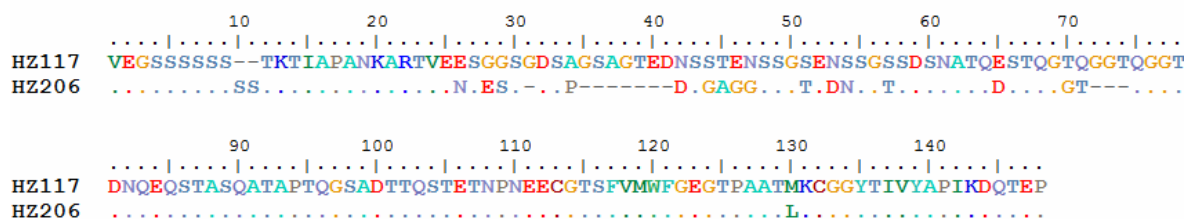


Obrázek 5. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z *Mus musculus musculus* (*Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 206) a z *M. m. domesticus* (*Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117) (šipky) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího trombospondin adhezivní protein (TRAP-C1) vytvořený metodou neighbor-joining v programu Treecon, 1000× bootstrap, znázorněny podpory větví více než 50 %.

Fylogenetická analýza části genu kódujícího GP60 ukázala, že námi získané izoláty HZ 117 a HZ 206 a *Cryptosporidium* mouse genotype I tvoří dobře podpořenou větev zřetelně odělenou od ostatních skupin. Oba izoláty se nicméně mezi sebou výrazně liší, přičemž výsledky naznačují, že izolát HZ 206 je příbuznější izolátům *Cryptosporidium* mouse genotype I dříve popsáným z myši domácí v Číně a USA a dětí v Kuwaitu (Feng a kol. 2010). Izolát HZ 117 tvoří bazální větev skupiny myších genotypů kryptosporidií (Obrázek 6). Odlišnost sekvencí těchto izolátů nespočívá pouze v záměně nukleotidů, ale i v přítomnosti insercí/delecí (Obrázek 7).



Obrázek 6. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z *Mus musculus musculus* (*Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 206) a z *M. m. domesticus* (*Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117) (šipky) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího glykoprotein 60 (GP60) vytvořený metodou neighbor-joining v programu Treecon, 1000× bootstrap, znázorněny podpory větví více než 50 %.



Obrázek 7. Porovnání sekvencí genu pro glykoprotein 60 izolátů kryptosporidií získaných z *Mus musculus musculus* (*Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 206) a z *M. m. domesticus* (*Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117).

5.3. Vnímavost jednotlivých hostitelů k infekci *Cryptosporidium* mouse genotype I

Na základě kombinace koprologického vyšetření a PCR detekce specifické kryptosporidiové DNA byla prokázána vnímavost myší SCID, BALB/c, STUS, STRA a SCHEST k oběma testovaným izolátům *Cryptosporidium* mouse genotype I. U těchto hostitelů byla prokázána vnímavost jak na základě detekce oocyst kryptosporidií v trusu infikovaných zvířat, tak průkazem specifické kryptosporidiové DNA. Vnímavost k *Cryptosporidium* mouse genotype I se celkově vyskytovala u 5 hostitelských druhů z 8 testovaných (Tabulka VII).

Tabulka VII: Vnímavost hostitelů k infekci *Cryptosporidium* mouse genotype I na základě koprologického vyšetření a detekce specifické DNA.

Hostitel	Průkaz oocyst koprologickým vyšetřením		Průkaz specifické DNA (gen pro GP 60)	
	HZ 117	HZ 206	HZ 117	HZ 206
SCID	ano	ano	ano	ano
BALB/c	ano	ano	ano	ano
STUS	ano	ano	ano	ano
STRA	ne	ano	ano	ano
SCHEST	ano	ano	ano	ano
krysa malá	ne	ne	ne	ne
pískomil mongolský	ne	ne	ne	ne
myšice lesní	ne	ne	ne	ne

5.4. Průběh a intenzita infekce u sledovaných hostitelů

5.4.1. Prepatentní perioda

U všech hostitelů, u kterých byla prokázána vnímavost ke *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117 a HZ 206 na základě koprologického vyšetření, byla určena prepatentní perioda (Tabulka VIII). Prepatentní perioda u izolátů *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117 a HZ 206 se výrazně nelišila a pro všechny vnímavé hostitele byla téměř shodná.

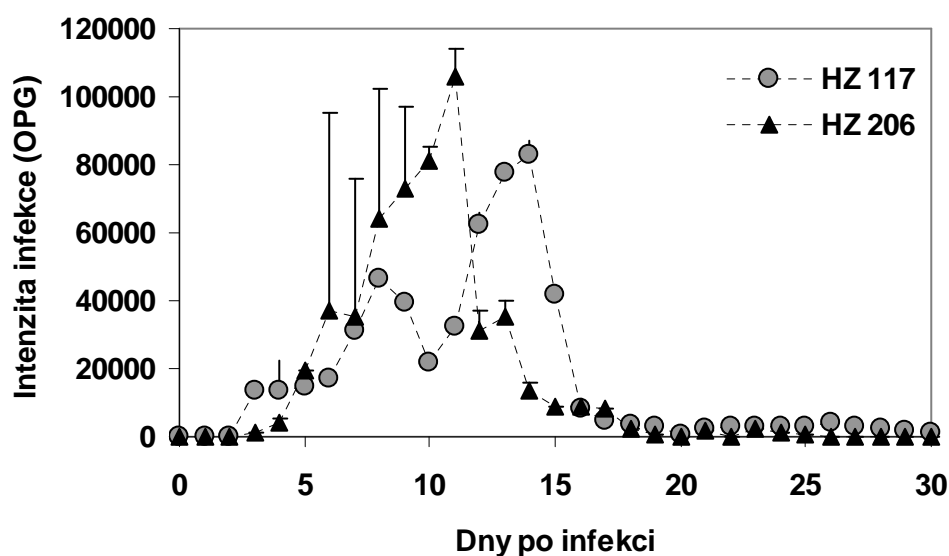
Tabulka VIII: Prepatentní perioda *Cryptosporidium* mouse genotype I u sledovaných hostitelů získaná na základě korpologického vyšetření na přítomnost oocyst.

Hostitel	Prepatentní perioda zjištěna na základě koprologického vyšetření vzorků trusu	
	HZ 117	HZ 206
SCID	3–5 DPI	4–5 DPI
BALB/c	4–5 DPI	4–6 DPI
STUS	4–5 DPI	4–6 DPI
STRA	nezjištěna	4–6 DPI
SCHEST	4–8 DPI	6–7 DPI

5.4.2. Průběh a intenzita infekce u vnímavých hostitelů.

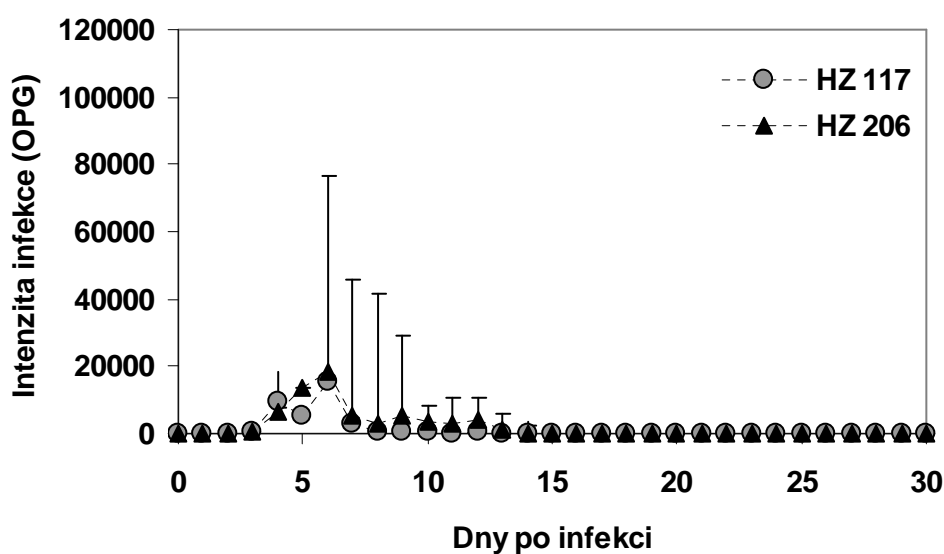
Na rozdíl od prepatentní periody, kdy nebyly zjištěny významné rozdíly mezi jednotlivými hostiteli, ani mezi izoláty kryptosporidií, v délce patentní periody, zejména v průběhu infekce, byly zjištěny výrazné rozdíly.

SCID myši byly vnímavé téměř shodně k oběma testovaným izolátům. Infekce byla persistentní. Přetrvávala po celou dobu sledování. Nejvyšší průměrná intenzita infekce byla dosažena 14. DPI a to ve výši 83 200 OPG u izolátu HZ 117 a 11. DPI ve výši 106 133 OPG u izolátu HZ 206 (Obrázek 8). U myši SCID byla intenzita infekce detekovatelná mikroskopickým vyšetřením po celou dobu sledování.



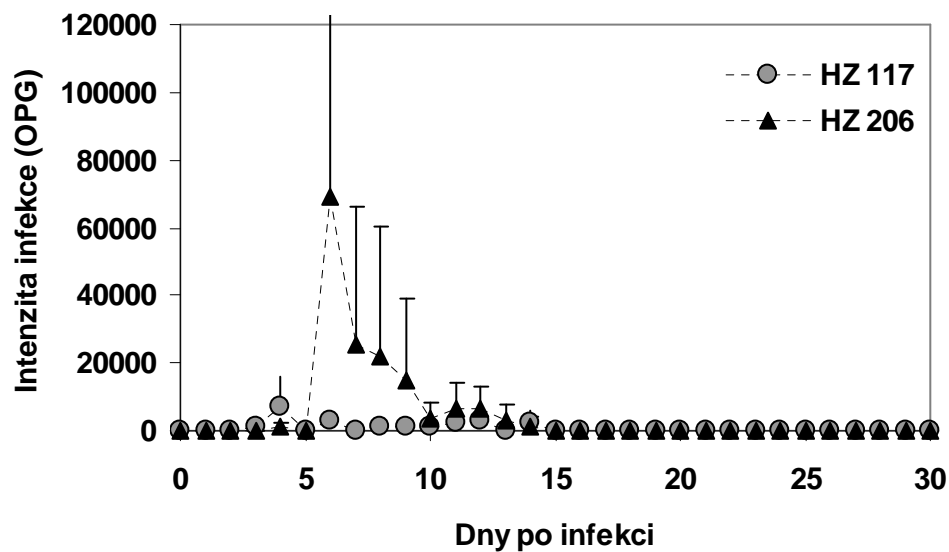
Obrázek 8: Průběh infekce *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117 a HZ 206 u SCID myši na základě koprologického vyšetření.

BALB/c myši byly také podobně vnímavé k oběma testovaným izolátům. Délka patentní periody zjištěná na základě koprologického vyšetření se pohybovala v rozmezí 7–9 dnů pro izolát HZ 117 a 8–14 dnů pro izolát HZ 206. Nejvyšší průměrná intenzita infekce byla u obou izolátů zjištěna 6. DPI a to ve výši 15 644 OPG pro izolát HZ 117 a 18 631 OPG u HZ 206 (Obrázek 9). Délka patentní periody byla následně ověřena molekulární analýzou, kde byla infekce zaznamenána až do 25–27. DPI u obou izolátů. Patentní perioda na základě molekulární analýzy byla tedy 22–24 dní. Intenzita infekce po 12–17. DPI byla natolik nízká, že infekci bylo možné detekovat pouze pomocí molekulárních metod.



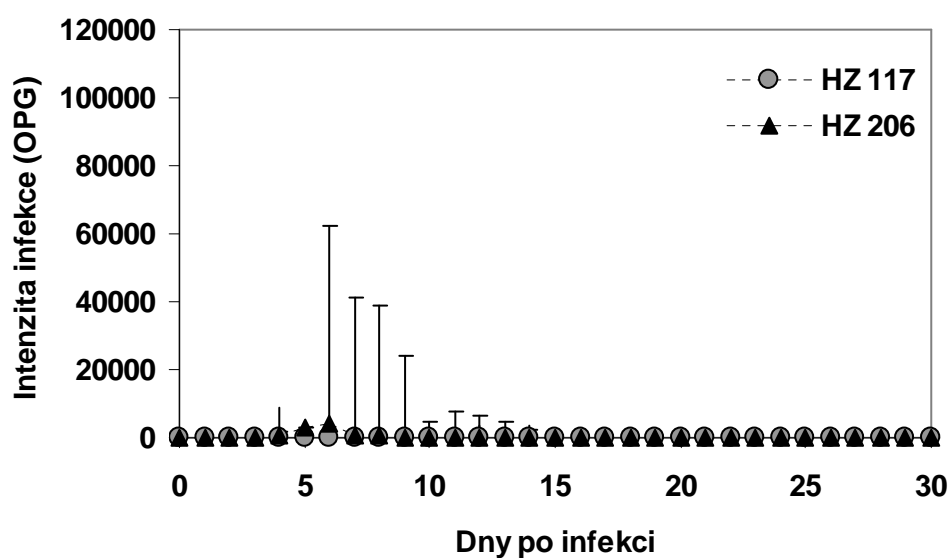
Obrázek 9: Průběh infekce *Cryosporidium* mouse genotype I HZ 117 a HZ 206 u BALB/c myši na základě koprologického vyšetření.

U kmene STUS (*Mus musculus musculus*) nebyly zjištěny výrazné odlišnosti v délce patentní periody, na druhou stranu rozdílnosti v intenzitě infekce jednotlivých izolátů byly znatelnější (Obrázek 10). Patentní perioda zjištěná mikroskopickým vyšetřením se pohybovala v rozmezí 8–11 dnů pro izolát HZ 117 a 9–11 dnů pro izolát HZ 206. Nejvyšší průměrná intenzita infekce byla zjištěna 4. DPI ve výši 7 111 OPG u izolátu HZ 117 a 6 DPI ve výši 68 977 OPG. Molekulární analýzou bylo prokázáno, že u kmene STUS probíhá infekce chronicky a byla detekována i 30. DPI.



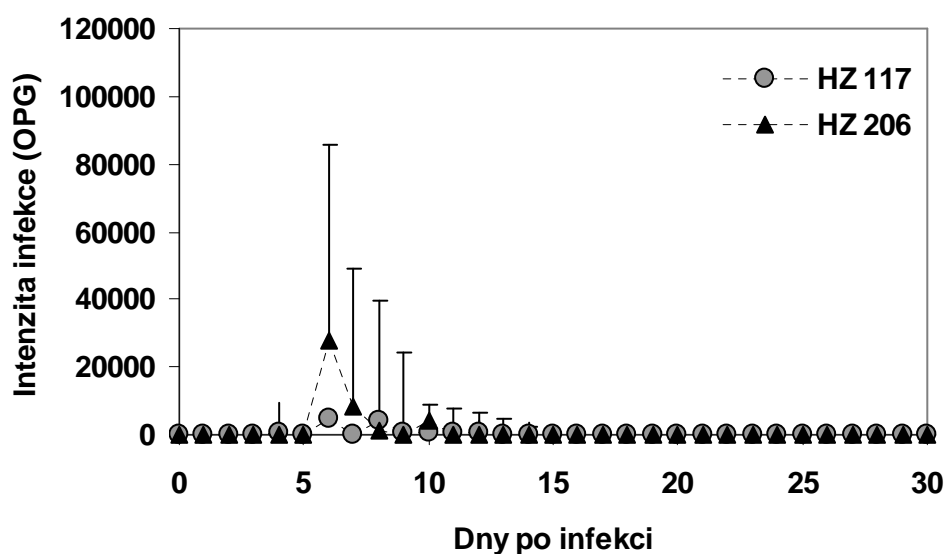
Obrázek 10: Průběh infekce *Crypsporidium* mouse genotype I HZ 117 a HZ 206 u *Mus musculus musculus* kmene STUS na základě koprologického vyšetření.

U kmene STRA (*Mus musculus domesticus*) nebyly mikroskopickým vyšetřením trusu detekovány oocysty izolátu HZ 117, nicméně jejich přítomnost ve vzorcích byla prokázána molekulárně. Intenzita infekce byla natolik nízká, že nebylo možné jí zaznamenat koprologickým vyšetřením. Molekulárně zjištěná patentní perioda byla 13 dní. U izolátu HZ 206 byla patentní perioda určena koprologickou metodou v rozmezí 8–9 dní. Nejvyšší průměrná intenzita infekce u izolátu HZ 206 byla zjištěna 6. DPI ve výši 4 266 OPG (Obrázek 11). Molekulárně bylo u myší STRA infikovaných izolátem HZ 206 prokázána infekce přetrvávající více jak 30 dní.



Obrázek 11: Průběh infekce *Cryptosporidium* mouse genotypu I HZ 117 a HZ 206 u *Mus musculus domesticus* kmene STRA na základě koprologického vyšetření.

U *Mus musculus domesticus* kmene SCHEST nebyly zaznamenány významné rozdíly v patentních periodách jednotlivých izolátů. Patentní perioda získaná na základě koprologického vyšetření byla 12–13 dní u izolátu HZ 117 a 5–6 dní u izolátu HZ 206. Nejvyšší průměrná intenzita infekce byla zjištěna 6. DPI ve výši 4 977 OPG u izolátu HZ 117 a 6. DPI ve výši 27 733 OPG u izolátu HZ 206 (Obrázek 12). Molekulárně bylo u myší infikovaných izolátem HZ 117 prokázáno trvání infekce do 23–25. DPI. U myší infikovaných izolátem HZ 206 byla opět zaznamenána infekce trvající déle jak 30 dní.



Obrázek 12: Průběh infekce *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117 a HZ 206 u *Mus musculus domesticus* kmene SCHEST na základě koprologického vyšetření.

U zbylých hostitelů, krysy malé, pískomila mongolského a myšice lesní, nebyla infekce prokázána mikroskopicky ani molekulární analýzou.

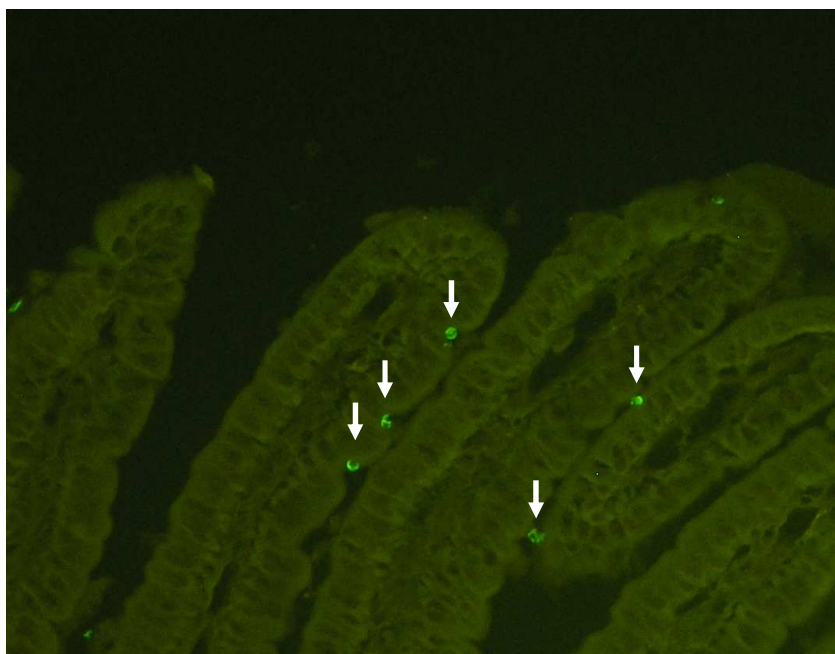
5.5. Lokalizace vývojového cyklu *Cryptosporidium* mouse genotype I v zažívacím traktu hostitelů

Histopatologické vyšetření bylo provedeno u hostitelů SCID, BALB/c a STUS infikovaných izolátem *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117 a myší kmeny SCID, BALB/c a STRA infikované izolátem HZ 206. Všechna zvířata byla mikroskopicky pozitivní na kryptosporidie. Intenzita infekce v jednotlivých částech střeva byla

vyhodnocena na řezech metodou specifických monoklonálních protilátek proti stěně oocyst (kapitola 4.11.5.), (Tabulka IX), (Obrázek 13).

Tabulka IX: Intenzita infekce v jednotlivých částech zažívacího traktu hostitelů SCID, STUS, BALB/c a STRAS šestý den po infekci.

Lokalita	SCID	BALB/c	STUS	SCID	BALB/c	STRAS
	HZ 117			HZ 206		
žaludek	0	0	0	0	0	0
dvanáctník	+++	+	++	+++	+	+
lačník	+++	+	+	+++	+	+
kyčelník	+	+	+	++	+	0
slepé střevo	+	0	0	+	0	0
tračník	0	0	0	0	0	0
rektum	0	0	0	0	0	0



Obrázek 13: Oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype I HZ 117 (šipky) ve střevním epitelu lačníku myši SCID. Měřítko = 10 μ m.

5.5.1. Patogenita a klinické příznaky kryptosporidiózy vyvolané *Cryptosporidium* mouse genotype I

Patogenita byla zhodnocena na histologických řezech barvených hematoxylinem–eosinem a Wolbachovou metodou (kapitola 4.11.3 a 4.11.4). Ve střevech hostitelů nebyly zaznamenány žádné histopatologické změny.

U všech vnímavých hostitelů nebyly zaznamenány žádné klinické příznaky spojené s infekcí *Cryptosporidium* mouse genotype I.

6. DISKUZE

Získané hodnoty délek a šířek obou izolátů jasně dokazují, že oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype I jsou menší než oocysty *Cryptosporidium parvum*, které mají průměrnou délku 5,42 μm a šířku 4,90 μm (Lv a kol. 2009). Přestože již oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype byly dříve měřeny (Morgan a kol. 1999, Lv a kol. 2009), mnou získané hodnoty se od již publikovaných mírně liší. Je třeba brát v úvahu, že i publikované hodnoty velikosti oocyst *Cryptosporidium* mouse genotype I nejsou shodné. Jednotlivá měření byla provedena v různých zeměpisných oblastech a získané izoláty, u nichž byla velikost oocyst měřena, pocházely rovněž z odlišných hostitelů. První izolát pocházel z potkana obecného (*Rattus Norvegicus*) a byl nalezen v Číně (Lv a kol. 2009). Druhý izolát pocházel z Austrálie a byl izolován z myši domácí (*Mus musculus domesticus*) (Morgan a kol. 1999). Toto zjištění nasvědčuje tomu, že jednotlivé izoláty získané z odlišných lokalit a hostitelů se mohou lišit svou infektivitou i v rámci jednoho druhu, respektive genotypu. Naměřené hodnoty velikostí u izolátu HZ 206 se nepatrně lišily od hodnot naměřených u izolátu získaného v Austrálii. S ohledem na možné odchylky v kalibraci přístrojů, jimiž byly oocysty měřeny, je pravděpodobné, že se jedná o shodný izolát (Morgan a kol. 1999). Můžeme tak soudit i na základě infekivity obou izolátů pro *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus*. Výsledky totiž prokazují že průběh a intenzita infekce u těchto dvou hostitelů je stejná i v případě, že byly infikovány izolátem získaným z opačného druhu, tedy pro *Mus musculus musculus* izolátem získaným z *Mus musculus domesticus* a naopak. I přesto, že izolát HZ 206 byl izolován původně z myši *Mus musculus musculus* je možné, že je totožný s izolátem *Cryptosporidium* mouse genotype I, jenž byl nalezen v Austrálii u *Mus musculus domesticus* (Morgan a kol. 1999). U tohoto izolátu však bohužel nebyla provedena molekulární analýza genu pro glykoprotein 60 (GP 60). Tvrzení, že se jedná o totožné izoláty proto postrádá průkaznost.

Prepatentní a patentní periody pro jednotlivé hostitelské organismy infikované *Cryptosporidium* mouse genotype I nebyly dosud popsány. Na základě našich experimentů bylo zjištěno, že prepatentní perioda se pro všechny testované hostitele pohybovala od 3 do 8 dnů po infekci, průměrně tedy 5,5 dnů po infekci. Tento zjištěný údaj je opět srovnatelný s průměrnou prepatentní periodou *Cryptosporidium parvum* u hlodavců, jež je udávána 6,2 dnů po infekci (Barbot a kol. 2001). Patentní perioda *C.*

parvum je poměrně rozmanitá a hostitelsky specifická, nejnak tomu je u *Cryptosporidium* mouse genotype I.

Přestože je myšice lesní (*Apodemus flavicolis*) nejčastějším hostitelem *Cryptosporidium* mouse genotype I (Lv a kol. 2009), vnímavost k izolátům HZ 117 a HZ 206 nebyla potvrzena a to jak na základě koprologického vyšetření, tak molekulární analýzou.

U druhu *C. parvum* nalézáme četné klinické projevy infekce. Rovněž patogenita je velmi vysoká. Infekce *C. parvum* je většinou provázena silným vodnatým průjmem, poruchou transcelulární a paracelulární propustností sliznice střeva, atrofií vilů, malnutričním syndromem (Barbot a kol. 2001) a syndromem dráždivého tračníku (IBS) (Khaldi a kol. 2009). Tyto projevy nalézáme jak u imunokompetentních, tak u imunosuprimovaných hostitelů, kterým může přivodit i smrt v důsledku výrazné ztráty hmotnosti (Garza a kol. 2008). U SCID myši bylo prokázáno, že infekce vyvolaná *C. parvum* může vést k vzniku intramukosálního adenokarcinomu (Certad a kol. 2007). Bylo tedy velmi překvapivé, že v průběhu infekce *Cryptosporidium* mouse genotype I izolátu HZ 117 i HZ 206 nebyly u experimentálních hostitelů pozorovány žádné klinické příznaky typické pro kryptosporidiózu. Vzhled a konzistence trusu byla stále stejná. Dokonce ani na histologických řezech barvených hematoxylinem–eosinem a Wolbachovou metodou nebyly v jednotlivých částech střeva prokázány žádné zánětlivé infiltráty nebo změny typické pro střevní kryptosporidiózu způsobenou druhem *C. parvum*.

Intenzita infekce je rovněž specifická nejen pro jednotlivé druhy, ale variabilitu můžeme pozorovat i v rámci jednoho druhu. U *C. parvum* intenzita infekce výrazně koreluje s klinickými projevy kryptosporidiózy. U SCID myši je intenzita několikanásobně vyšší než u běžných imunokompetentních myši (Chappell 1996). Při porovnání intenzity infekce *Cryptosporidium* mouse genotype I izolát HZ 117 a *Cryptosporidium* mouse genotype I izolát HZ 206 pozorujeme u druhého izolátu výrazně vyšší intenzitu. Vyšší intenzita infekce jednoho izolátu v rámci druhu *Cryptosporidium* mouse genotype I u experimentálních hostitelů může být zapříčiněna detekovanou variabilitou v genu kódující glykoprotein 60, který je lokalizovaný v apikální oblasti na povrchu vývojových stádií kryptosporidií. Jednotlivé druhy kryptosporidií, respektive podtypy lišící se právě v GP60 mají odlišné biologické vlastnosti, zejména se odlišují svým hostitelským spektrem (Cama a kol. 2007). Například podtypy *C. parvum* a *C. hominis* byly odlišeny právě na základě této

variability (Sulaiman a kol. 2005). Vyšší infektivita izolátu HZ 206 může být zapříčiněna právě odlišnostmi v genu pro glykoprotein 60.

Lokalizace vývojových stádií ve střevě hostitele rovněž nebyla u *Cryptosporidium* mouse genotype I doposud studována. Po vyhodnocení histologických řezů s imunofluorescenčním barvením bylo zjištěno, že vývojová stádia se vyskytují v dvanáctníku, lačníku, kyčelníku a slepém střevě. V tračníku a rektu už žádná vývojová stádia detekována nebyla. Naproti tomu při infekci *C. parvum* nalézáme vývojová stádia v mikrovilární vrstvě v rámci všech oddílů střeva (Yang a kol. 2009).

7. ZÁVĚR

- Bylo prokázáno, že oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype I jsou menší než oocysty *Cryptosporidium parvum*.
- Oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype I izolátu HZ 117 jsou menší než oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype I izolátu HZ 206.
- Oba studované izoláty HZ 117 a HZ 206 *Cryptosporidium* mouse genotype I jsou infekční pro SCID a BALB/c myši, pro divoké kmeny STUS (*Mus musculus musculus*) STRA a SCHEST (*Mus musculus domesticus*) a nejsou infekční pro krysy malé, myšice lesní a pískomily mongolské.
- Nebylo prokázáno žádné patogení působení *Cryptosporidium* mouse genotype I v zažívacím traktu vnímavých hostitelů.
- V rámci genu kódujícího glykoprotein 60 byla prokázána vnitrodruhová variabilita *Cryptosporidium* mouse genotype I, která pravděpodobně výrazně ovlivňuje infektivitu studovaných izolátů pro jednotlivé hostitele.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ajjampur, S.S., Gladstone, B.P., Selvapandian, D., Muliyl, J.P., Ward, H., Kang, G., 2007. Molecular and spatial epidemiology of cryptosporidiosis in children in a semi-urban community in south India. *J. Clinic. Microbiol.* 45, 915–920.

Alves, M., Xiao, L., Lemos, V., Zhou, L., Cama, V., da Cunha, M.B., Matos, O., Antunes, F., 2005. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium spp.* in mammals and reptiles at the Lisbon Zoo. *Parasitol. Res.* 97, 108–112.

Aydin, Y., 1997. The ultrastructure of the parasite and the mucus cell relationship and endogenous stages of *Cryptosporidium muris* in the stomach of laboratory mice. *Tr. J. Vet. A. Scien.* 23, 117–125.

Barbot, L., Topouchian, A., Capet, C., Magne, D., Huneau, J.F., Kapel, N., Gobert, J.G., 2001. *Cryptosporidium parvum*: functional study of the intestinal malabsorption syndrome. *Ann. Pharm. Fr.* 59, 305–311.

Blanshard, C., Jackson, A.M., Shanson, D.C., Francis, N., Gazzard, B.G., 1992. Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. *Q. J. Med.* 85, 813–823.

Cacció, S.M., 2005. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parasitology* 47, 185–192

Cama, V.A., Ross, J.M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Navincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, R.H., Bern, C., Xiao, L., 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J. Infect. Dis.* 196, 684–691.

Carreno, R.A., Martin, D.S., Barta, J.R., 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85, 899–904.

Certad, G., Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Gantois, N., Chassat, T., Mouray, A., Fleurisse, L., Pinon, A., Cailliez, J., Dei-Cas, E., Creusy, C., 2007. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect. Agent. Cancer.* 21, 22.

Cevallos, A.M., Zhang, X., Waldor, M.K., Jaison, S., Zhou, X., Tzipori, S., Neutra, M.R., Ward, H.D., 2000. Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infect. Immun.* 68, 4108–4116.

Chalmers, R.M., Sturdee, A.P., Casemore, D.P., Curry, A., Miller, A., Parker, N.D., Richmond, T.M., 1994. *Cryptosporidium muris* in wild house mice (*Mus musculus*). *Europ. J. Protistol.* 30, 151–155.

Chalmers, R.M., Sturdee, A.P., Bull, S.A., Miller, A., Wright, S.E., 1997. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus*, and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitology* 83, 478–482.

Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Sterling, C.R., Dupot, H.L., 1996. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *J. Infect. Dis.* 173, 232–236

Current, W.L., Haynes, T.B., 1984. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science* 224, 603–605.

Current, W.L., 1985. Cryptosporidiosis, a protozoologist's view of an emerging zoonosis. *Microecol. Ther.* 15, 165–200.

Current, W.L., 1988. The biology of *Cryptosporidium*. *ASM News* 54, 605–611.

Current, W.L., Upton, S.J., Haynes, T.B., 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplex, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool.* 33, 289–296.

Current, W.L., Reese, N.C., 1987. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J. Eukar. Microbiol.* 33, 98–108.

Current, W.L., Garcia, L.S., 1991. Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 325–358.

da Silva, A.J., Caccio, S., Williams, C., Won, K.Y., Nace, E.K., Whittier, C., Pieniazek, N.J., Eberhard, M.L., 2003. Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. *Vet. Parasitol.* 111, 297–307.

Domenéch-Sánchez, A., Olea, F., Berrocal, C.I., 2008. Infection related to recreational waters. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 11, 26–27.

DuPont, H., Chappell, C., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., Jakobowski, W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 332, 855–859.

Enemark, H.L., Ahrens, P., Bille-Hansen, V., Heegaard, P.M., Vigre, H., Thamsborg, S.M., Lind, P., 2003. *Cryptosporidium parvum*, infectivity and pathogenicity of the “porcine” genotype. *Parasitology* 126, 407–416.

Fayer, R., 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. *CRC Press.* 12, 1–41.

Fayer, R., Santin, M., Xiao, L., 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91, 624–629.

Feng, Y., Alderisio, K.A., Yang, W., Blancero, L.A., Kuhne, W.G., Nadareski, C.A., Reid, M., Xiao, L., 2007a. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6475–6483.

Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V., Xiao, L., 2007b. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Parasitol.* 144, 1–9.

Feng, Y., 2008. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp. Parasitol.* 124, 128–137.

Feng, Y., Lal, A., Li, N., Xiao, L., 2010. Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.* 127, 238–242

Flanigan, T., Whalen, C., Turner, J., Soave, R., Toerner, J., Havlir, D., Kotler, D., 1992. *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Am. Intern. Med.* 116, 840–842.

Fleta, J., Sanchez–Acedo, C., Clavel, Quilez, J., 1995. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extraintestinal tissues of sheep and pigs. *Vet. Parasitol.* 59, 201–205.

Foo, C., Farrell, J., Boxell, A., Robertson, I., and Ryan, M.U., 2007. Novel *Cryptosporidium* Genotype in Wild Australian Mice (*Mus domesticus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7693–7696.

Gait, R., Soutar, R.H., Hanson, M., Fraser, C., Chalmers, R., 2008. Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. *Vet. Res.* 162, 843–845.

Garza, A., Castellanos–Gonzalez, A., Griffiths, J., Robinson, P., 2008. Infection of immunocompetent mice with acid–water–pretreated *Cryptosporidium parvum* results in weight loss, and intestinal (structural and physiological) alterations. *Parasitol. Res.* 102, 457–463.

Hausmann, K., Hülsmann, N., 2003. Systém prvoků. V: Protozoologie. *Academia* 58–61.

Hikosaka, K., Nakai, Y., 2005. A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Parasitol. Res.* 97, 373–379.

Hurková, L., Hajdušek, O., Modrý, D., 2003. Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. *J. Wildl. Dis.* 39, 441–444.

Iseki, M., 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn. J. Parasitol.* 28, 285–307.

Iseki, M., 1986. Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Parasitol.* 35, 521–526.

Jellison, K.L., Hemond, H.F., Schauer, D.B., 2002. Sources and species of *Cryptosporidium* oocysts in the Wachusett Reservoir watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 569–575.

Karanis, P., Plutzer, J., Halim, N.A., Igori, K., Nagasawa, H., Ongerth, J., Liqing, M., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. *Parasitol. Res.* 101, 1575–1580.

Khaldi, S., Gargala, G., Le Groff, L., Parey, S., Francois, A., Fioramonti, J., Ballet, J., Dupot, J., Ducrotté, P., Favennec, L., 2009. *Cryptosporidium parvum* isolate-dependent postinfectious jejunal hypersensitivity and mast cell accumulation in an immunocompetent rat model. *Infect. Immun.* 11, 5163–5169

Kváč, M., Hofmannova, L., Bertolino, S., Wauters, L., Tosi, G., Modry, D., 2008a. Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitol.* 55, 95–99.

Kváč, M., Sak, B., Kvetonova, D., Ditrich, O., Hofmannova, L., Modry, D., Vitovec, J., Xiao, L., 2008b. Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Vet. Parasitol.* 153, 363–367.

Langer, R.C., Riggs M.W. 1999. *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 67, 5282–5291.

Lasser, K.H., Lewin, K.J. and Ryning, F.W., 1979. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Hum. Pathol.* 10, 234–240.

Levine, N.D., 1970. Taxonomy of the sporozoa. *J. Protozool.* 56, 208–209.

Levine, N.D., 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66, 830–834.

Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blasburn, B.L., 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 91–95

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. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7692–7699.

MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Eng. J. Med.* 331, 161–167.

Matsui, T., Fujino, T., Tsuji, M., 1999. Infectivity to hosts of the endogenous stages of chicken and murine *Cryptosporidium*. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 471–474.

Matsui, T., Fujino, T., Kajima, J., Tsuji, M., 2000. Infectivity to experimental rodents of *Cryptosporidium parvum* oocysts from Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus*) originated in the People's Republic of China. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 487–489.

Meutin, D.J., van Kruiningen, H.J., Kein, D.H. 1974. Cryptosporidiosis in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165, 914–917.

Morgan, U.N., Sturdee, A.P., Singleton, G., Gomez, M.S., Gracenta, M., Torres, J., Hamilton, S.G., Woodside, D.P., Thompson R.C.A., 1999. The *Cryptosporidium* “mouse” genotype is conserved across geographic areas. *J Clin Microbiol* 37, 1302–1305.

Navin, T.R., Hardy, A.M., 1987. Cryptosporidiosis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 155, 150.

Neumayerová, H., Koudela, B., 2008. Effect of low and high temperatures on efectivity of *Cryptosporidium muris* oocyst suspended in water. *Vet. Parasitol.* 153, 197–202.

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

O’Hara, S.P., Huang, B.Q., Chen, X.–M., Nelson, J., LaRusso, N.F., 2005. Distribution of *Cryptosporidium parvum* sporozoite apical organelles during attachment to and internalization by cultured biliary epithelial cells. *J. Parasitol.* 91, 995–999.

Pancier, R.J., Thomassen, R.W., Garner, F.M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8, 479–484.

Perz, J.F., Le Blancq, S.M., 2001. *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1154–1162.

Riggs, M.W., Stone, A.L., Yount, P.A., Langer, R.C., Arrowood, M.J., Bentley, D. L., 1997. Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite–like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *J. Immunol.* 158, 1787–1795.

Ryan, U.M., Xiao, L., Read, C., Sulaiman, I.M., Monis, P., Lal, A.A., Fayer, R., and Pavlasek, I., 2003. A redescription of *Cryptosporidium galli* from birds. *J. Parasitol.* 89, 809–813.

Slavin, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 65, 262–270.

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

Spano, F., Putignani, L., Naitza, S., Puri, C., Wright, S., Crisanti, A., 1998. Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 147–162.

Sterling, C.R., Seegar, K., Sinclair, N.A., 1986. *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea. *J. Infect. Dis.* 153, 380–381.

Sulaiman, I.M., Hira, P.R., Zhou, L., Al-Ali, F.M., Al-Shelahi, F.A., Sheweiki, H.M., Iqbal, J., Khalid, N. a Xiao, L., 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2805–2809.

Thompson, R.C.A., Olson, M.E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M.S., Hijawi, N.S., 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporiosis. *Adv. Parasitol.* 59, 77–158.

Torres, J., Gracenea, M., Gomez, M.S., Arrizabalaga, A., Gonzalez–Moreno, O., 2000. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Vet. Parasitol.* 92, 253–260.

Tyzzar, E.E., 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Doc. Exp. Biol. Med.* 5, 12–13.

Tyzzar, E.E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26, 394–412.

Tzipori, S., 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol. Rev.* 47, 84–96.

Umemiya, R., Fukuda, M., Fujisaki, K., Matsui, T., 2005. Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice. *J. Parasitol.* 91, 1034–1039.

Vítovec, J., Hamadejová, K., Landová, L., Kváč, M., Květoňová, D., Sak, B., 2006. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *J. Vet. Med.* 53, 239–243.

Wang, R., Wang, J., Sun, M., Dang, H., Feng, Y., Ning, C., Jian, F., Zhang, L., Xiao, L., 2008a. Molecular characterization of the *Cryptosporidium cervine* genotype from a sika deer (*Cervus nippon Temminck*) in Zhengzhou, China and literature review. *Parasitol. Res.* 103, 865–869.

Wang, R., Zhang, L., Feng, Y., Ning, C., Jian, F., Xiao, L., Zhao, J., Wang, Y., 2008b. Molecular characterization of a new genotype of *Cryptosporidium* from American minks (*Mustela vison*) in China. *Vet. Parasitol.* 154, 162–166.

Weisburger, W.R., Hutcheon, D.F., Yardley, J.H., Roche, J.C., Hillis, W.D., Charache, P., 1979. Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. *Am. J. Clin. Pathol.* 72, 473–478.

Wetzel, D.M., Schmidt, J., Kuhlenschmidt, M.S., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2005. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect. Immun.* 73, 5379–5387.

Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M., Lal, A.A., 2000. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5492–5498.

Xiao, L., Sulaiman, I.M., Ryan, U.M., Zhou, L., Atwill, E.R., Tischler, M.L., Zhang, X., Fayer, R., Lal, A.A., 2002. Host adaptation and host–parasite co–evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int. J. Parasitol.* 32, 1773–1785.

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* sp. in captive reptiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 891–899.

Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 72–97.

Xiao, L., Alderisio, K. and Jiang, J., 2006. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: effect of the number of samples and analytic replicates on test results. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5942–5947.

Xiao, L., Fayer, R., 2008. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Inter. J. Parasitol.* 38, 1239–1255.

Xiao, L., Feng, Y., 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *Immun. Med. Microbiol.* 52, 309–323.

Yang, Y.L., Serrano, M.G., Sheoran, A.S., Manque, P.A., Buck, A., Widmer, G., 2009. Over–expression and localization of a host protein on the membrane of *Cryptosporidium parvum* infected epithelial cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 168, 95–101.

Zhou, L., Fayer, R., Trout, J.M., Ryan, U.M., Schaefer 3rd, F.W., Xiao, L., 2004. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur–bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7574–7577.