

**Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Katedra parazitologie**



Magisterská diplomová práce

Vnímavost různých kmenů myši domácí střeoevropské (*Mus musculus musculus*) a myši domácí západoevropské (*Mus musculus domesticus*) k infekci *Cryptosporidium* mouse genotype I

Vypracovala: **Bc. Lenka Moravcová**

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.**

České Budějovice 2011

Moravcová L., 2011: Vnímavost různých kmenů myši domácí střeoevropské (*Mus musculus musculus*) a myši domácí západoevropské (*Mus musculus domesticus*) k infekci *Cryptosporidium* mouse genotype I [The susceptibility of different strains of *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus* to the *Cryptosporidium* mouse genotype I infection] - 48 p., University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, Czech Republic.

Annotation:

The infectivity of *Cryptosporidium* mouse genotype I for 14 different strains of two subtypes of *Mus musculus* - *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*, was studied using infection experiments. Two different isolates of *Cryptosporidium* mouse genotype I – HZ 117 (isolated from *M. musculus domesticus*) and HZ 206 (isolated from *M. musculus musculus*) were used. The susceptibility of mice was evaluated using infection intensity determination, prepatent and patent period duration.

Prohlašuji, že jsem tuto práci 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách a to se zachováním svého 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 své kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29. dubna 201

.....

Lenka Moravcová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli Bohumilu Sakovi za odborné vedení mé práce, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli specialistovi Martinu Kváčovi. Můj velký dík patří i Daně Květoňové a Míše Kotkové za pomoc při zpracovávání vzorků a dále děkuji všem kamarádům z laboratoře Veterinární a humánní protistologie za vytváření přátelské atmosféry. Za psychickou podporu bych rovněž ráda poděkovala své rodině.

Práce byla financována z interního SGA PřF JU v Českých Budějovicích (SGA2010/005).

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Kryptosporidie	1
1.2 Historie.....	1
1.3 Taxonomie	2
1.4 Životní cyklus	4
1.4 Kryptosporidie u hlodavců.....	5
1.4.1 <i>Cryptosporidium</i> mouse genotype I.....	5
1.4.2 <i>Cryptosporidium parvum</i>	6
1.4.3 <i>Cryptosporidium andersoni</i>	7
1.4.4 <i>Cryptosporidium muris</i>	8
1.4.5 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	8
1.4.6 <i>Cryptosporidium wrairi</i>	9
2. Cíle práce	10
3. Materiál a metody	11
3.1 Získávání pokusných zvířat	11
3.1.1 Experimentální zvířata	11
3.2 Oocysty <i>Cryptosporidium</i> mouse genotype I	12
3.3 Experimentální infekce	12
3.4 Purifikace oocyst.....	12
3.4.1 Sacharózový gradient (Arrowood and Sterling 1987)	13
3.5 Dezinfekce a dekantace přes sítko	14
3.6 Příprava infekční dávky	14
3.6.1 Barvení propidium iodididem (Brescia et al. 2009).....	14
3.7 Koprologické vyšetření.....	15
3.7.1 Barvení kryptosporidií (Miláček and Vítovec 1985).	15
3.8 Vyhodnocení intenzity infekce	16
3.9 Molekulární analýza.....	16
3.9.1 Izolace DNA	16
3.9.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	17
3.10 Gelová elektroforéza	18
3.11 Statistické vyhodnocení výsledků.....	19
4. Výsledky	20
4.1 Molekulární charakteristika izolátu <i>Cryptosporidium</i> mouse genotype I.....	20
4.2 Dynamika infekce	20
4.3 Intenzita infekce.....	22
5. Diskuze	33
6. Závěry	37
7. Literatura	38

1. Úvod

1.1 Kryptosporidie

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření lékařsky i veterinárně významní jednobuněční paraziti, kteří převážně infikují epiteliální buňky zažívacího traktu všech druhů obratlovců. Některé kryptosporidie infikují také buňky dýchacího aparátu (O'Donoghue 1995).

U kryptosporidií, které infikují zažívací trakt, rozlišujeme dvě linie, první primárně infikují žaludek, zatímco druhá linie má afinitu ke sliznici tenkého střeva. Některé kryptosporidie jsou úzce hostitelsky specializované, jiné infikují celou řadu hostitelů.

Onemocnění kryptosporidiemi se nazývá kryptosporidióza a je řazeno mezi oportunní parazitózy a zoonózy. U imunodeficientních pacientů způsobuje závažné onemocnění, u AIDS pacientů a podvyživených dětí může mít letální následky (MacFarlane and Horner-Bryce 1987, Manabe et al. 1998). U imunokompetentních jedinců je onemocnění často provázeno vodnatými průjmy, křečemi a abdominálními bolestmi. V těchto případech dochází většinou k samovyléčení tzv. „self-cure“ (Chappel et al. 1999, Xiao et al. 2004).

1.2 Historie

První kryptosporidie byla pozorována v roce 1907 Ernestem Edvardem Tyzzerem, který objevil tohoto prvoka ve sliznici žaludku laboratorní myši (*Mus musculus*) a pojmenoval jej *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907).

V roce 1912 tentýž autor popsal další druh kryptosporidie, tentokrát lokalizovaný v tenkém střevě laboratorní myši, a pojmenoval jej *Cryptosporidium parvum*. Povšimnul si také, že *C. parvum* má oocysty menší a kulaté na rozdíl od *C. muris*, jehož oocysty jsou oválného tvaru a přibližně dvakrát tak velké (Tyzzer 1912).

U člověka byla poprvé kryptosporidióza diagnostikována v roce 1976, a to ve dvou na sobě nezávislých případech. Oba pacienti, 3leté dítě i 39letý muž, žili na farmě, kde se pěstoval hovězí dobytek, trpěli těžkým vodnatým průjmem a nemoc byla

určena pomocí mikroskopického vyšetření materiálu získaného při biopsii zažívacího traktu (Nime et al. 1976, Meisel et al. 1976).

1.3 Taxonomie

Vzhledem k tomu, že životní cyklus kryptosporidií probíhá v gastrointestinálním traktu hostitele, stejně jako u rodů *Eimeria*, *Isospora* a *Cyclospora*, byly dříve řazeny mezi kokcidie (Corliss 1994, Fayer et al. 1997). Nicméně na základě studií genu pro malou ribosomální podjednotku (SSU rRNA) byla prokázána jejich příbuznost s gregarinami, s nimiž tvoří sesterskou skupinu na bázi celého kmene Apikomplexa (Carreno et al. 1999).

Jejich bazální postavení podporuje i nepřítomnost apikoplastu a fylogenetické studie celých genomů u sedmi druhů Apikomplex (Zhu et al. 2000, Kuo et al. 2008). Mezi společné znaky gregarin a kryptosporidií patří také zánik apikálního komplexu brzy po invazi hostitelské buňky a morfologická stavba organel sloužících k přichycení k hostitelské buňce (u kryptosporidií *feeder organela* a u gregarin *epimerit*) (Valigurová et al. 2007). V současné době je uznáno 23 platných druhů kryptosporidií, které byly rozlišeny na základě molekulárních rozdílů, morfologie oocyst lokalizace vývojového cyklu a hostitelské specifity (tabulka 1.). Je popsáno také mnoho genotypů, u kterých se předpokládá, že budou v budoucnu popsány jako samostatné druhy (Xiao et al. 2004, Chacín-Bonilla 2007, Plutzer and Karanis 2009).

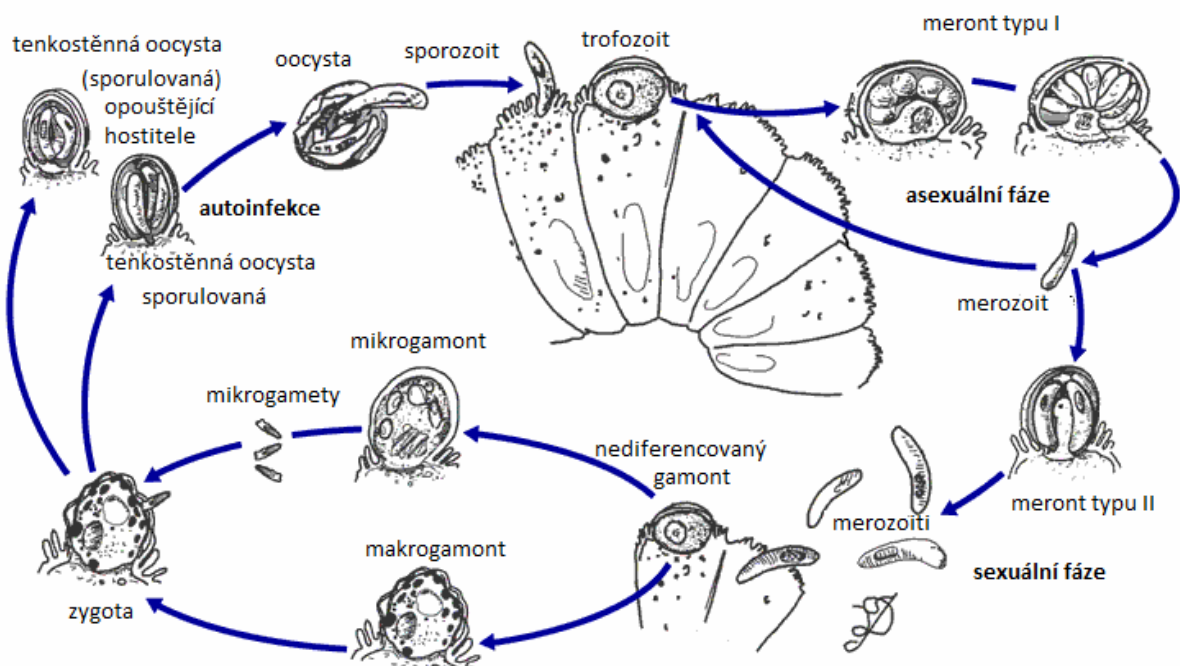
Tabulka 1. Platné druhy rodu *Cryptosporidium*

Druh	Autor	Hostitel	Lokalizace
<i>C. andersoni</i>	Lindsay et al., 2000	<i>Bos taurus</i>	žláznatý žaludek
<i>C. baileyi</i>	Current et al., 1986	<i>Gallus gallus</i>	bursa Fabricii
<i>C. bovis</i>	Fayer et al., 2005	<i>Bos taurus</i>	tenké střevo
<i>C. canis</i>	Fayer et al., 2001	<i>Canis familiaris</i>	tenké střevo
<i>C. cuniculus</i>	Robinson et al., 2010	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	tenké střevo
<i>C. fayeri</i>	Ryan et al., 2008	<i>Macropus rufus</i>	střevo
<i>C. felis</i>	Iseki, 1979	<i>Felis catis</i>	tenké střevo
<i>C. fragile</i>	Jirků et al., 2008	<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	žaludek
<i>C. galli</i>	Ryan et al., 1999	<i>Gallus Gallus</i>	žláznatý žaludek
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan et al., 2002	<i>Homo sapiens</i>	tenké střevo
<i>C. macropodum</i>	Power and Ryan, 2008	<i>Macropus giganteum</i>	střevo
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955	<i>Meleagris gallopavo</i>	tenké střevo
<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero and Sitjà-Bobadilla, 2002	<i>Sparus aurata</i> <i>Dicentrarchus labrax</i>	žaludek tenké střevo
<i>C. muris</i>	Tyzzler, 1907	<i>Mus musculus</i>	žaludek
<i>C. parvum</i>	Tyzzler, 1912	<i>Mus musculus</i>	tenké střevo
<i>C. ryanae</i>	Fayer et al., 2008	<i>Bos taurus</i>	střevo
<i>C. scophthalmi</i>	Alvarez-Pellitero et al., 2004	<i>Scophthalmi maximus</i>	střevo
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1980 (Browstein et al., 1977)	<i>Elaphe guttata</i> <i>Elaphe subocularis</i> <i>Sanzinia madagascarensus</i>	žaludek
<i>C. suis</i>	Ryan et al., 2004	<i>Sus scrofa</i>	tlusté střevo
<i>C. ubiquitum</i>	Fayer et al. 2010	<i>Bos taurus</i>	střevo
<i>C. varanii</i>	Pavlásek and Ryan 2008	<i>Varanus prasinus</i>	žaludek tenké střevo
<i>C. wrairi</i>	Vetterling et al., 1971	<i>Cavia procellus</i>	tenké střevo
<i>C. xiaoi</i>	Fayer and Santin, 2009	<i>Ovis aries</i>	střevo

1.4 Životní cyklus

Životní cyklus kryptosporidií je monoxenní, což znamená, že všechna vývojová stádia (asexuální i sexuální) jsou lokalizována pouze v jednom hostiteli. K nákaze dochází fekálně orální cestou požitím oocysty s kontaminovanou vodou nebo potravou. Sporulovaná oocysta obsahující čtyři sporozoity je vyloučena spolu s výkaly do vnějšího prostředí. Oocysty mají poměrně velké reziduální tělísko, nemají mikropyle a jejich stěna je takřka bezbarvá s charakteristickou suturou na jednom pólu, kterou sporozoiti opouštějí oocystu během exystace. Životní cyklus je většinou lokalizován v gastrointestinálním traktu. Po požití oocysty dochází pomocí proteolytických enzymů (serinové a cysteinové endopeptidázy, aminopeptidázy) k degradaci sutury. Z oocysty se posléze uvolní infekční stádia – sporozoiti, kteří adherují k hostitelským buňkám. Lokalizace kryptosporidií je označována jako epiplasmatická. Sporozoiti se posléze mění na trofozoity lokalizované v parazitoformní vakuole v enterocytech mikrokřků. Jádro trofozoita se mění a dochází k asexuálnímu množení – merogonii. Vznikají dva typy merontů: meront typu I (vytváří 6 – 8 merozoitů) z něhož následně vzniká meront typu II (vytváří 4 merozoity). Merozoiti vznikající z meronta typu I se dále množí asexuálně, zatímco merozoiti z meronta typu II vstupují do sexuální fáze – gametogonie. Merozoiti typu II napadají hostitelské buňky, ve kterých se transformují v pohlavní stádia – jednojaderné makrogamonty a vícejaderné mikrogamonty. Z mikrogamontů se uvolňují pohyblivé mikrogamety, které oplodní makrogamety vzniklé z makrogamontů. Jejich splynutím vznikne zygota. Během endogenní sporulace vznikají ze zygoty dva typy oocyst – silnostěnné a tenkostěnné. Silnostěnné oocysty opouštějí tělo hostitele a slouží k přenosu infekce na další hostitele. Oocysty kryptosporidií jsou plně infekční ihned po vyloučení z těla hostitele. Tenkostěnné oocysty excystují ještě v těle hostitele, dochází k aktivnímu uvolňování sporozoitů a napadání zatím neinfikovaných mikrokřků střeva, tento jev je nazýván jako autoinfekce (Tyzzer 1910, Tyzzer 1912, Uni et al. 1987).

Výše uvedeným způsobem probíhá životní cyklus u většiny kryptosporidií s výjimkou *Cryptosporidium baley*. Tato kryptosporidie má tři generační typy merontů. První generace merontů obsahuje osm merozoitů; druhá generace obsahuje čtyři merozoity; třetí generace obsahuje osm merozoitů (Current et al. 1986).



Obrázek 1: Vývojový cyklus kryptosporidií (Centers for Disease Control and Prevention – CDC)

1.4 Kryptosporidie u hlodavců

1.4.1 *Cryptosporidium mouse genotype I*

Tato kryptosporidie byla poprvé popsána ze střeva myši domácí (*Mus musculus*) v Austrálii (Morgan et al. 1999). Nejběžnější je tento druh právě u myši domácí (*Mus musculus*) a dalších malých hlodavců – hraboše polního (*Microtus arvalis*), myšice lesní (*Apodemus sylvaticus*) a norníka rudého (*Myodes glareolus*) (Morgan et al. 1999, Bajer et al. 2003). Dále bylo *Cryptosporidium mouse genotype I* popsáno u krys a bizonů ve Španělsku, Portugalsku, USA a Velké Británii (Xiao and Fayer 2008, Xiao and Feng 2008). Existuje také záznam o výskytu u netopýrů (Dubey et al., 1998), dále u pandy červené, levharta skvrnitého a takina indického (Lv et al 2009). Oocysty *Cryptosporidium mouse genotype I* byly nalezeny i u některých studenokrevných obratlovců, například hadů, ještěrek a želv, u těchto nálezů se však předpokládá, že jde pouze o pasáž, která se dostala do těla hostitele společně s kontaminovanou potravou (Xiao et al. 2004).

K dispozici jsou již také první záznamy o výskytu této kryptosporidie u člověka. Jeden pochází z Indie, kdy bylo *Cryptosporidium mouse* genotype I diagnostikováno u dítěte a potvrzeno na základě RFLP analýzy genu pro malou ribosomální podjednotku (SSU rRNA). Je však možné, že se mohlo jednat i o *Cryptosporidium meleagridis*, velikost jehož fragmentů je při PCR RFLP metodách shodná a navíc je to druh běžně se vyskytující u lidí (Ajajampur et al. 2007). Výskyt *Cryptosporidium mouse* genotype I byl zaznamenán i u dítěte v Kuwaitu, zde se jednalo o sekvenci AY738188 (Sulaiman et al. 2005).

Na základě fylogenetických analýz bylo zjištěno, že *Cryptosporidium mouse* genotype I je nejbližší *C. parvum* podtypu IIFA6, a to z 97,2 %. Velikost oocyst byla měřena pomocí světelného mikroskopu a bylo zjištěno, že oocysty *C. mouse* genotype I jsou menší než oocysty *C. parvum*. Velikost oocyst *C. parvum* je $5,42 \times 4,90 \mu\text{m}$ a velikost oocyst *C. mouse* genotype I je $4,8 \times 4,1 \mu\text{m}$ (Lv et al. 2009).

Na základě odlišností v sekvencích genu kódující glykoprotein GP60 byly u *Cryptosporidium mouse* genotype I odlišeny dva podtypy, IXa a IXb. Podtyp IXa byl nalezen u 4 ze šesti vzorků pocházejících od myši domácí z Číny. Podtyp IXb byl nalezen u dvou myši domácích pocházejících z USA. Zatím není zcela jasné, zda jsou tyto podtypy vázány na geografickou oblast nebo zda jde o důsledek limitované migrace myši (Lv et al. 2009). Oba podtypy mají pouze 6 kopií mikrosatelitní sekvence TCA (Feng et al. 2010).

Vedle druhu *C. mouse* genotype I byl nalezen i další druh, a to *Cryptosporidium mouse* genotype II. U tohoto druhu se zatím nepodařilo provést platnou morfologickou analýzu. Analýza byla provedena z menšího počtu oocyst, velikost oocyst se nijak nelišila od oocyst *Cryptosporidium parvum* ($5,0 \times 4,3 \mu\text{m}$), prevalence byla 7,6 %. Zatím není přesně znám potenciál infekivity u zvířat ani u lidí (Foo et al. 2007).

1.4.2 *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium parvum je nejrozšířenější druh kryptosporidie s nejnižší hostitelskou specifitou. Vnímavost jednotlivých hostitelů k tomuto druhu byla popsána experimentálně. Poprvé byl tento druh nalezen u myši (Tyzzer 1912). Pravděpodobně je infekční pro většinu savců, u kterých je také ve velké míře nalézán. Nejčastěji bývají

infikování tímto druhem přežvýkavci (de Graaf 1999). Rezervoárem pro hospodářská zvířata a také pro člověka jsou drobní hlodavci (Morgan et al. 2000). *Cryptosporidium parvum* je také nejčastější kryptosporidií infikující člověka (Xiao et al. 2004). U imunodeficientních pacientů končí diseminované infekce většinou smrtí. Stav imunitního systému je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících průběh a léčbu nákazy (Nimri and Batchoun 1994, Current and Garsia 1991). Ačkoliv je životní cyklus u *C. parvum* v hostiteli většinou lokalizován v zažívacím traktu, může pronikat i do jiných orgánů, například plic, jater a sleziny (Ditrich et al. 1991, Meamar et al. 2006).

Primárně probíhá infekce *C. parvum* v distální části tenkého střeva a kolonu. Patologické změny v tenkém střevě jsou charakterizovány atrofií střevních klků, ztrátou epitelálních buněk a zánětem střevního epitelu (Thompson et al. 2005).

Velikost oocyst je $5,0 \times 4,5 \mu\text{m}$ (Upton and Current 1985).

1.4.3 *Cryptosporidium andersoni*

U *C. andersoni* jsou známy dva „kmeny“ lišící se velikostí oocyst. Upton and Current (1985) uvádějí velikost oocyst izolovaných ze skotu $7,4 \times 5,6 \mu\text{m}$. Oocysty *C. andersoni*, které popsal Lindsay et al. (2000) v USA a Kváč and Vítovec (2003) v České Republice měly rozměry $8,4 \times 6,2 \mu\text{m}$, což je bližší rozměrům *C. muris*.

Cryptosporidium andersoni spolu s *C. muris* patří do skupiny kryptosporidií osidlující žláznatý žaludek savců. První nálezy kryptosporidií osidlující žlázy slezu u skotu (*Bos taurus*) popsali v roce 1985 Upton and Current. Tyto kryptosporidie nebyly infekční pro myši, proto byly nazvány *Cryptosporidium muris-like*. Anderson (1991) experimentálně ověřil, že oocysty morfologicky shodné s *C. muris* získané z trusu velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) byly infekční pro myši, ačkoli oocysty označené jako *C. muris* získané z trusu krávy pro myši infekční nebyly.

Až v roce 2000 na základě molekulárních analýz a hostitelské specifity byl *C. muris-like* popsán jako samostatný druh *C. andersoni* (Lindsay et al. 2000). Byla provedena molekulární analýza bovinního a murinního izolátu ze žaludku krávy, respektive myši. Na základě molekulárních poznatků se oocysty murinního izolátu nazývají *C. muris*, zatímco oocysty bovinního izolátu byly nazvány *C. andersoni*.

Typickým hostitelem *C. andersoni* je skot, dále byla přirozená infekce popsána u velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*), sviště stepního (*Marmota bobac*) a zubra evropského (*Bizon bonasus*) (Ryan et al. 2003). Většina autorů považuje *C. andersoni* za neinfekční pro hlodavce. Toto bylo popsáno u hraboše polního (*Microtus arvalis*), norníka rudého (*Clethrionomys glareolus*), myši polní (*Apodemus silvaticus*), morčete (*Cavia porcellus*) a potkana (*Rattus norvegicus*).

Překvapivě však byly popsány přirozené a experimentální infekce u několika zástupců řádu Rodentia. Izolát *C. andersoni* (kmen Kawatabi) z krávy byl použit k úspěšné infekci imunokompetentních myší a SCID myší (Satoh et al. 2003, Matsubayashi et al. 2004, 2005).

1.4.4 *Cryptosporidium muris*

Plně vysporulované oválné oocysty měří okolo $8,4 \times 6,3 \mu\text{m}$ (Iseki et al. 1986). Typickými hostiteli *Cryptosporidium muris* jsou hlodavci z čeledi myšovitých (Muridae) a křečkovitých (Criceridae). Experimentální transmisní studie ukázaly, že izoláty *C. muris* z laboratorních myší jsou infekční i pro jiná zvířata, včetně psů, morčat, králíků, jehňat a pískomilů (Fayer 1990). Přirozená infekce byla popsána i u damana (*Procavia capensis*) ze ZOO (Fayer et al. 1997), u velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) s chronickou kryptosporidiózou (Tzipori and Griffiths 1998, Anderson et al. 1991) a žirafy síťované (*Giraffa camelopardalis reticulata*) (Kodádková et al. 2010).

1.4.5 *Cryptosporidium meleagridis*

Tato kryptosporidie byla poprvé popsána v roce 1955 (Slavin 1955). Typickými hostiteli jsou ptáci, především drůbež (Morgan et al. 2001). Přirozené infekce se také vyskytují u člověka. Jedná se o třetí nejběžnější druh kryptosporidie, který je u člověka diagnostikován (Xiao et al. 2001, Pedraza-Diaz et al. 2000). *Cryptosporidium meleagridis* je jediná známá kryptosporidie, která infikuje jak ptáky, tak savce. Byly popsány experimentální infekce u kuřat, myší, selat a telat (Akiyoshi et al. 2003).

U ptáků se infekce *C. meleagridis* projevuje průjmem bez ztráty na hmotnosti a dalších vážnějších klinických příznaků (Tůmová et al. 2000). Patologické změny vznikající na sliznici infikovaných částí zažívacího traktu a jsou charakterizovány zkrácením mikrovilární vrstvy a nepravidelností epiteliálního povrchu.

Infekce *C. meleagridis* je u ptáků i u experimentálně infikovaných hlodavců lokalizována v tenkém střevě (Akioši et al. 2003, Huang et al. 2003).

Oocysty mají kulatý tvar a jejich velikost je $4,5 \times 4,0 \mu\text{m}$ (Lindsay et al. 1989).

1.4.6 Cryptosporidium wrairi

Tento druh kryptosporidie způsobuje chronickou enteritidu u morčat (Vetterling et al. 1971). Na rozdíl od *C. parvum*, kterému je velmi podobné, je schopné infikovat dospělé imunokompetentní jedince morčat. Infekce je vymezená striktně na tenké střevo.

Velikost oocyst je u *C. wrairi* srovnatelná s velikostí oocyst u *C. parvum* ($5,4 \times 4,6 \mu\text{m}$).

2. Cíle práce

- Zpracovat kriticky literární rešerši o tématu
- Pomocí experimentálních přenosů popsat vnímavost a průběh infekce *Cryptosporidium* mouse genotype I u různých kmenů myši domácí středoevropské (*Mus musculus musculus*) a myši domácí západoevropské (*Mus musculus domesticus*)

3. Materiál a metody

3.1 Získávání pokusných zvířat

Pokusná zvířata byla chytána v lokalitě na pomezí českých a německých hranic v hybridní zóně. Na tomto území dochází ke křížení dvou poddruhů myši domácí, a to myši domácí západoevropské (*Mus musculus domesticus*) a myši domácí střeoevropské (*Mus musculus musculus*). Jednotlivé kmeny myši byly pojmenovány podle místa odchyty a poté dlouhodobě po několik generací imbredně množeny na Ústavu biologie obratlovců, AV ČR, Studenec.

Přímo v lokalitě hybridní zóny byla odchycená zvířata vyšetřována na přítomnost kryptosporidií v trusu. Myši byly chytány do živochytných pastí v blízkosti lidských obydlí a ve stájích hospodářských zvířat. Z celkového počtu 352 vyšetřených zvířat byly získány dva odlišné izoláty *Cryptosporidium* mouse genotype I. Jeden označený jako HZ 117 izolovaný z myši *Mus musculus domesticus* odchycené v lokalitě Münchenreuth a druhý HZ 206 – izolovaný z myši *Mus musculus musculus* odchycené v lokalitě Buškovice.

3.1.1 Experimentální zvířata

Pro experimentální infekce bylo použito celkem 14 různých kmenů myši (tabulka 2.) různého stáří a pohlaví (vždy však nejméně 3 samice a 3 samci ve skupině). Jako kontrola byly použity 2 SCID myši.

Pokusná zvířata byla chována v chovných nádobách s podestýlkou, krmena komerční granulovanou směsí pro hlodavce a napájena vodou *ad-libitum*.

Tabulka 2. Kmeny myši použité v experimentu

název kmene	typ	místo odchyty
BULS	M	Buškovice CZ
BUSNA	M	Buškovice CZ
PLOSSEN	D	Plössen G
PWD	M	Praha CZ
SCHEST	D	Schweben G
SCHUNT	D	Schweben G
SIN	D	Orkneys, Sunday Isl. G
SIT	D	Orkneys, Sunday Isl. G
SMON	D	Montferrier G
SPOS	D	Poschiavo G
STRA	D	Straas G
STRB	D	Straas G
STUF	M	Studenec CZ
STUS	M	Studenec CZ

3.2 Oocysty *Cryptosporidium* mouse genotype I

Dva izoláty *Cryptosporidium* mouse genotype I (HZ 117 a HZ 206) byly v laboratoři udržovány pasážováním přes SCID myši (myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí). Trus od těchto myši byl pravidelně odebírán, poté byl přečištěn a takto získané oocysty byly použity k infekčním experimentům.

3.3 Experimentální infekce

Každé zvíře bylo infikováno per-orálně pomocí jícní sondy dávkou 1×10^6 viabilních oocyst *C. mouse* genotyp I. Pro snadnější manipulaci byla zvířata předem uspána inhalační éterovou narkózou.

3.4 Purifikace oocyst

Vzorky trusu získané ze SCID myši byly zhomogenizovány ve třecí misce a přefiltrovány přes sítko do 100 ml zkumavky a centrifugovány při 1350 g po dobu 20

minut, následně byl odsán supernatant. Poté byl získaný sediment přečištěn na sacharózovém gradientu (Arrowood and Sterling 1987).

3.4.1 Sacharózový gradient (Arrowood and Sterling 1987)

Použité roztoky:

Sheaterův roztok: 259 ml deionizované vody

405 g cukru

7,29 g fenolu

1% PBS Tween: do 1 l PBS přidat 0,5 ml Tween 20

Pracovní Sheaterův roztok: A (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween)

B (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

Pracovní postup:

1. do centrifugační kyvety navrstvit sacharózový gradient - 30 ml roztoku A; 30 ml roztoku B; 15 ml vzorku
2. centrifugovat při 1370 g po dobu 30 min při 4° C
3. vodní vývěvou odsát čirou vrstvu supernatantu, zbylý supernatant převést do čisté kyvety
4. doplnit objem deionizovanou vodou
5. centrifugovat 20 min při 1370 g
6. odsát vodní vývěvou ½ supernatantu a doplnit objem deionizovanou vodou
7. krok 6. a 7. opakovat třikrát
8. purifikované oocysty uchovávat ve tmě při 4° C

3.5 Dezinfekce a dekantace přes sítko

K roztoku oocyst s deionizovanou vodou (1 ml) bylo z důvodu možné přítomnosti bakterií přidáno 5 ml 5% NaClO (Savo) a mícháno 15 min na ledu. Následně byl roztok 5× promyt nadbytkem deionizované vody (centrifugace 20 min, 1370 g, 4 °C). Aby byly ze suspenze oocyst odstraněny případné oocysty eimerií, byl roztok přefiltrován přes mikrosítka s otvory o velikosti 10 µl a oocysty byly dále skladovány v chladničce při 4 °C.

3.6 Příprava infekční dávky

Po přečištění byl počet oocyst v suspenzi stanoven počítáním v Bürkerově počítací komůrce. Následně byl proveden test viability oocyst pomocí barvení propidium iodidem. Byla připravena infekční dávka obsahující 1×10^6 viabilních oocyst *C. mouse* genotyp I.

3.6.1 Barvení propidium iodidem (Brescia et al. 2009)

Použité chemikálie:

P – 4170 (Sigma) skladovat při 4 °C

Roztok PI:

1 mg P – 4170 rozpustit v 1 ml 0,1 M PBS, pH 7,2, uchovávat při 4 °C

Pracovní postup:

1. připravit 100 µl suspenze oocyst (ne více než 1×10^6 oocyst ve 100 µl)
2. přidat 10 µl roztoku PI
3. barvit 30 min při laboratorní teplotě
4. dobře propláchnout v PBS nebo destilované vodě
5. pozorovat fluorescenčním mikroskopem

3.7 Koprologické vyšetření

Vzorky trusu byly odebírány denně od prvního dne po infekci (DPI) až do 30 DPI. Přítomnost oocyst v trusu byla detekována pomocí specifického barvení anilin-karbol-metyl violetí s dobarvením tartrazinem (Miláček and Vítovec 1985).

3.7.1 Barvení kryptosporidií (Miláček and Vítovec 1985).

Použité roztoky:

Roztok methylvioleti: 0,6 g methylvioleti

1 ml anilinu

1 g fenolu

30 ml 96% etanolu

70 ml deionizované vody

Kyselina sírová: 2% vodný roztok

Tartrazin: 1% tartrazin v 1% kyselině octové

Pracovní postup:

1. tenký nátěr trusu na podložním skle fixovat metanolem v plameni
2. barvit metylvioletí po dobu 30 min
3. opláchnout slabým proudem vody
4. diferencovat roztokem kyseliny sírové po dobu 1 – 2 min
5. opláchnout vodou
6. dobarvit tartrazinem po dobu 1 – 2 min
7. opláchnout slabým proudem vody
8. nechat uschnout a prohlížet světelným mikroskopem při zvětšení 1000×

3.8 Vyhodnocení intenzity infekce

Bylo zjišťováno množství trusu (v gramech), které bylo použito na pořízení nátěru. Váha trusu byla získána jako rozdíl hmotnosti trusu natřeného na sklíčku a hmotnosti čistého sklíčka. Byly spočítány všechny oocysty na sklíčku při zvětšení 1000×. Ze zjištěných údajů byla odhadnuta intenzita infekce a vyjádřena jako OPG – počet oocyst v gramu trusu dle Kváč et al. (2007).

3.9 Molekulární analýza

3.9.1 Izolace DNA

Celková DNA byla extrahována přímo z trusu pokusných zvířat pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex) s mírnou modifikací.

Postup:

1. do mikrozkušavek (Safe Lock Tube, 2,5 ml) přidat 200 mg trusu, 150 mg skleněných kuliček (průměr 0,5 mm, BioSpec Product Inc., USA)
2. přidat 1,2 ml Lysis Buffer P a zvortexovat
3. provést rozbíjení oocyst pomocí homogenizátoru (FASTPREP® - 24 Instrument MP Biomedicals, Solon, OH, USA) 1 min rychlostí 5,5 m/s.
4. další kroky byly provedeny podle návodu poskytnutého výrobcem. Získaná DNA byla uchovávána při -20 °C.

3.9.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Chemikálie:

- **Deoxyribonukleosid trifosfáty** (200 μ M dNTP's, 10 mM roztok, Top-Bio, ČR)
- **10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu** (Top-Bio, ČR)
- **Taq purple DNA polymeráza** (1 U/ μ l, Top-Bio, ČR)
- **PCR H₂O** (Top-Bio, ČR)
- **MgCl₂** (25 mM, Top-Bio, ČR)
- **Bovinní sérový albumin** (BSA 10 mg/ml, Sigma-Aldrich ČR)
- **Primery** (10 μ M, Generi Biotech, ČR)

Pro amplifikaci GP60 byla použita nested PCR dle protokolu Feng et al. 2007. Celkový objem jednotlivých reakčních směsí byl 20 μ l (tabulka 3.).

Primery:

Primární

- F 5' ATAGTCTCCGCTGTATTC 3'
- R 5' GGAAGGAACGATGTATCT 3'

Sekundární

- F 5' TCCGCTGTATTCTCAGCC 3'
- R 5' GCAGAGGAACCAGCATC 3'

Tabulka 3. Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci GP60.

primární reakce		50 °C	sekundární reakce		50 °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 mM	0,40 µl	Forward	10 mM	0,40 µl
Reverse	10 mM	0,40 µl	Reverse	10 mM	0,40 µl
BSA	10 mg/ml	0,80 µl	BSA	-----	
Taq	1 U/µl	0,50 µl	Taq	1 U/µl	0,50 µl
DNA	-----	3,00 µl	DNA	-----	3,00 µl
Celkem	-----	20 µl	Celkem	-----	20 µl

Požadované úseky templátové DNA byly amplifikovány v termocycleru (Bioer, Krd, ČR) za použití následujícího programu: po počáteční denaturaci 94 °C 3 min, bylo provedeno celkem 35 cyklů sestávajících z denaturace 94 °C po 45 s, annealingu 50 °C po 45 s a extenze 72 °C po 60 s, s finální extenzí 72 °C 7 min. Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 3 µl primárního PCR produktu.

3.10 Gelová elektroforéza

Výsledný PCR produkt byl detekován na 1% agarózovém gelu s přídavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (320 nm).

Chemikálie:

- 50× TAE pufr (242 g tris báze; 457,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,6 M EDTA)
- agaróza (Biotech, ČR)
- ethidium-bromid (Sigma-Aldrich, ČR)
- 100 bp DNA Ladder (O'Gene Ruler™, Biogen, ČR)

Postup:

1. smíchat agarózu s 1× TAE pufrem (pro 1% gel smíchat 0,8 g agarózy s 80 ml TAE pufrem)
2. nechat agarózu rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou přibližně na teplotu 50 °C
3. přidat 2 µl ethydium-bromidu a promíchat
4. do předem připravené formy nalít gel, vložit hřeben a nechat ztuhnout
5. gel vložit do elektroforetické vany naplněné 1× TAE pufrem
6. do jamek nanést 1× 10 µl ladderu a 20 µl sekundárního PCR produktu s druhově specifickými primery
7. nastavit napětí 70 V a vyvíjet dobu potřebnou pro separaci fragmentů

DNA fragmenty byly vizualizovány UV transluminátorem a vyfoceny kamerou propojenou s počítačem. Byla také provedena sekvenace získaného PCR produktu v Laboratoři genomiky na Ústavu molekulární biologie rostlin Akademie věd České republiky za účelem ověření identity použitého vzorku s vzorku získaného z experimentálních zvířat.

3.11 Statistické vyhodnocení výsledků

Pro statistické vyhodnocení variability intenzity infekce (kumulativní hodnoty plochy pod křivkou (Area Under Curve – AUC), času dosažení nejvyšší intenzity infekce (t_{max}) a nejvyšší hodnoty koncentrace oocyst (C_{max}) byla použita Kruskal-Walissova a Wilcoxonova analýza. Rozdíly v průběhu infekce byly vyhodnoceny pomocí neparametrického Mann-Whitney *U*-testu. Analýzy byly provedeny programem Statistica 6.0 (StatSoft CR, Praha).

4. Výsledky

4.1 Molekulární charakteristika izolátu *Cryptosporidium* mouse genotype I

Částečné sekvence původních izolátů *Cryptosporidium* mouse genotype I (HZ 117 a HZ 206) použitého k experimentálním infekcím a sekvence získané po izolaci z infikovaných zvířat v poslední den patentní periody byly identické.

4.2 Dynamika infekce

Prepatentní a patentní perioda u experimentálních zvířat vnímavých k infekci *Cryptosporidium* mouse genotype I se pohybovala v rozmezí od dvou do čtrnácti dnů a lišila se jak u různých kmenů myši a jednotlivých pohlaví, tak i u obou izolátů (tabulka 4., 5.).

Nejdelší prepatentní periodu pro izolát HZ 117 vykazovaly samice kmenů SIT a SPOS a trvala 6 dnů. Naopak nejkratší prepatentní periodu měly samice kmenů BUSNA, SCHEST, STUF a SIT dále samci kmenů BUSNA, SCHEST, SPOS, STRB a STUF, a to shodně 3 dny. U izolátu HZ 206 byla nejdelší pozorovaná prepatentní perioda v délce 14 dnů, a to u samce kmene SMON. Nejkratší prepatentní periodu vykazovaly samice kmenů BUSNA a SIN a samci kmene BULS a STUF opět shodně, tentokrát v délce trvání 2 dny.

Nejdelší patentní perioda pro izolát HZ 117 byla 27 dnů, a to u obou pohlaví kmene BUSNA, vylučování oocyst bylo pozorováno i 30 DPI, kdy byl experiment ukončen. U samice kmene SIT byla mikroskopicky zaznamenána přítomnost oocyst v trusu pouze 7. den po infekci.

Nejdelší patentní perioda pro izolát HZ 206 byla u samců kmene BUSNA, zde byla přítomnost oocyst v trusu pozorována až do 19. respektive 23. DPI, molekulárně byla však přítomnost *Cryptosporidium* mouse genotype I potvrzena i 30. DPI. Nejkratší patentní perioda byla zaznamenána opět jeden den, tentokrát u samců kmene SMON, a to 15. den po infekci.

U každé z myši bylo molekulárně ověřeno, zda opravdu došlo k vyléčení z kryptosporidiózy.

Z tabulek 4. a 5. je patrné, že ačkoliv většina myší již nebyla mikroskopicky pozitivních, infekce u nich přetrvávala až do konce experimentu. Intenzita infekce byla však tak nízká, že ji nebylo možné mikroskopicky detekovat. Z infekce *C. mouse* genotype I (HZ 117) se dokázali vyléčit samci kmene SCHEST; samice kmene SIN; samice i samci kmene SIT; samci kmene STUF a samice i samci kmene STUS. Z infekce *C. mouse* genotype I (HZ 206) se dokázaly vyléčit následující myši: samice i samci kmene SIN; samci kmene SMON; samci kmene STRA a samice i samci kmene STUF.

Tabulka 4. Prepatentní a patentní perioda izolát HZ 117

kmen	prepatentní perioda		patentní perioda	
	samice	samci	mikroskopicky / PCR pozitivní	mikroskopicky / PCR pozitivní
			samice	samci
BULS	*	*	*	*
BUSNA	3	3	27 / 30.	27 / 30.
PLOSSEN	N	N	N	N
PWD	N	N	0 / 30.	0 (30.)
SCHEST	3	3	11 / 30.	9 / 12.
SCHUNT	N	N	0 / 30.	0 / 30.
SIN	4	4	6 / 10.	25 / 30.
SIT	6	4	1 / 7.	14 / 18.
SMON	*	*	*	*
SPOS	6	3	22 / 30.	19 / 22.
STRA	N	N	0 / 30.	N
STRB	5	3	9 / 30.	4 / 30.
STUF	3	3	26 / 30.	23 / 26.
STUS	3	5	19 / 22.	15 / 20.

* = kmen myší nebyl k dispozici

N = negativní

Tabulka 5. Prepatentní a patentní perioda izolát HZ 206

kmen	prepatentní perioda		patentní perioda	
	samice	samci	mikroskopicky / PCR pozitivní	mikroskopicky / PCR pozitivní
			samice	samci
BULS	4	2	6 / 30.	14 / 30.
BUSNA	2	3	19 / 30.	23 / 30.
PLOSSEN	*	*	*	*
PWD	3	4	7 / 30.	16 / 30.
SCHEST	4	4	20 / 24.	19 / 30.
SCHUNT	3	3	13 / 30.	10 / 30.
SIN	2	3	12 / 14.	13 / 16.
SIT	*	*	*	*
SMON	3	14	12 / 30.	1 / 15.
SPOS	*	*	*	*
STRA	4	5	11 / 30.	9 / 14.
STRB	8	4	3 / 30.	10 / 30.
STUF	3	2	9 / 13.	14 / 16.
STUS	*	*	*	*

* = kmen myši nebyl k dispozici

N = negativní

4.3 Intenzita infekce

Stejně jako u patentní a prepatentní periody byly zjištěny rozdíly v intenzitě infekce u jednotlivých kmenů myši, a to jak v rámci kmenů, tak i mezi jednotlivými pohlavími. Zároveň byla pozorována různá intenzita infekce u obou izolátů (tabulka 6., 7.).

Z výsledků vyplývá, že u kmenů BULS, BUSNA, PWD, SCHUNT, SIT, SPOS, STRA, STRB a STUF byli samci vnímavější k infekci *Cryptosporidium* mouse genotype I než samice. U dvou kmenů – SCHEST a STUS byly naopak vnímavější samice. Ve všech případech byla vyšší vnímavost u daného pohlaví shodná k oběma izolátům - jak k HZ 117 tak k HZ 206. Pouze u kmene SIN byly samice vnímavější k izolátům HZ 117, zatímco samci byli vnímavější k izolátu HZ 206.

K izolátu HZ 117 byly podle mikroskopického vyšetření nevnímavé kmeny PLOSSEN, PWD, SCHUNT a STRA. Molekulární analýza však odhalila pozitivitu u kmenů PWD, SCHUNT a STRA. Intenzita infekce u těchto 3 kmenů byla však tak nízká, že nebylo možné ji mikroskopicky zaznamenat. Jediným kmenem nevnímavým k experimentální infekci *Cryptosporidium* mouse genotype I, izolát HZ 117, je tedy kmen PLOSSEN. Naopak nejvíce vnímavým kmenem byly myši kmene SPOS. U samců tohoto kmene byla 12. DPI zjištěna intenzita infekce $76,8 \times 10^3$ OPG (oocyst na gram trusu).

K izolátu HZ 206 byly vnímavé všechny použité kmeny myší, nejvíce vnímavým byl kmen SIN, a to samci tohoto kmene, jak již bylo řečeno výše, samice tohoto kmene byly vnímavější k izolátu HZ 117 (tabulka 6., 7.).

Tabulka 6. Izolát HZ 117: Srovnání intenzity infekce u jednotlivých kmenů experimentálně infikovaných myší

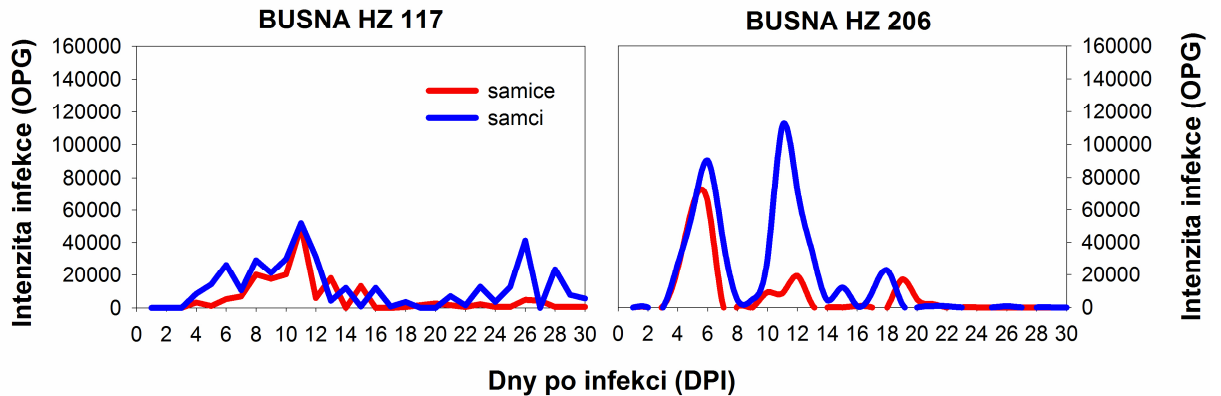
kmen	nejvyšší zjištěná intenzita infekce			
	samice		samci	
	OPG	DPI	OPG	DPI
BUSNA	$50,1 \times 10^3$	11	$51,9 \times 10^3$	11
SCHEST	$15,4 \times 10^3$	6	$10,7 \times 10^3$	6
SIN	$7,8 \times 10^3$	10	$3,4 \times 10^3$	10
SIT	$0,7 \times 10^3$	7	$2,8 \times 10^3$	12
SPOS	$48,4 \times 10^3$	12	$76,8 \times 10^3$	12
STRB	$0,7 \times 10^3$	11	$5,0 \times 10^3$	6
STUF	$22,6 \times 10^3$	8	$42,0 \times 10^3$	6
STUS	$17,1 \times 10^3$	9	$3,6 \times 10^3$	7

Tabulka 7. Izolát HZ 206: Srovnání intenzity infekce u jednotlivých kmenů experimentálně infikovaných myší

kmen	nejvyšší zjištěná intenzita infekce			
	samice		samci	
	OPG	DPI	OPG	DPI
BULS	$1,4 \times 10^3$	7	$3,6 \times 10^3$	14
BUSNA	$64,7 \times 10^3$	6	$111,6 \times 10^3$	11
PWD	$2,1 \times 10^3$	4	$2,8 \times 10^3$	14
SCHEST	$13,5 \times 10^3$	8	$2,1 \times 10^3$	13
SCHUNT	$2,8 \times 10^3$	11	$3,6 \times 10^3$	5
SIN	54×10^3	6	$141,5 \times 10^3$	5
SMON	$3,5 \times 10^3$	6	$1,4 \times 10^3$	15
STRA	$2,8 \times 10^3$	5	$2,1 \times 10^3$	13
STRB	$1,4 \times 10^3$	9	$2,1 \times 10^3$	13
STUF	$7,8 \times 10^3$	6	$64,7 \times 10^3$	4

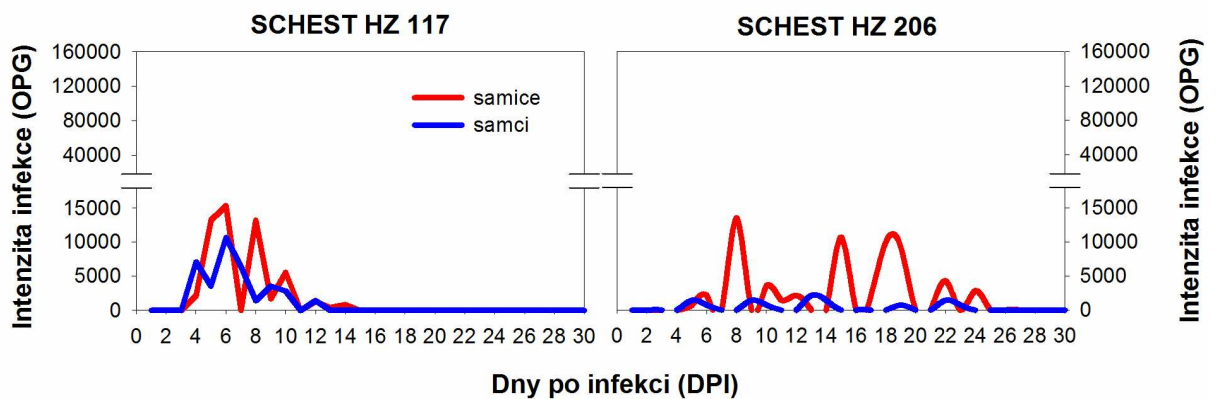
Pouze u osmi kmenů myší (BUSNA, PWD, SCHEST, SCHUNT, SIN, STRA, STRB a STUF) byl získán dostatečný počet myší k provedení experimentálních infekcí oběma izoláty *C. mouse* genotype I. U ostatních kmenů myší byla z důvodu časově omezené dostupnosti provedena infekce buď izolátem HZ 117 (kmeny PLOSSEN, SIT, SPOS a STUS) nebo izolátem HZ 206 (BULS a SMON). Následující grafy shrnují získané výsledky.

Graf 1. Průběh infekce kmen BUSNA, srovnání obou izolátů



Graf č. 1 ukazuje průběh infekce u myši kmene BUSNA (*M. musculus musculus*). Je jasně patrné, že samci tohoto kmene jsou vnímavější k infekci *C. mouse* genotype I, a to více k izolátu HZ 206. U samců tohoto kmene byla zjištěna druhá nejvyšší intenzita infekce vůbec, a to $111,6 \times 10^3$ OPG (oocyst na gram trusu). Všeobecně jsou myši kmene BUSNA vnímavější k izolátu HZ 206. U izolátu HZ 117 jsme zase pozorovali delší patentní periodu. Podle výsledků molekulární analýzy se myši nedokázaly vyléčit z infekce ani u jednoho z izolátů.

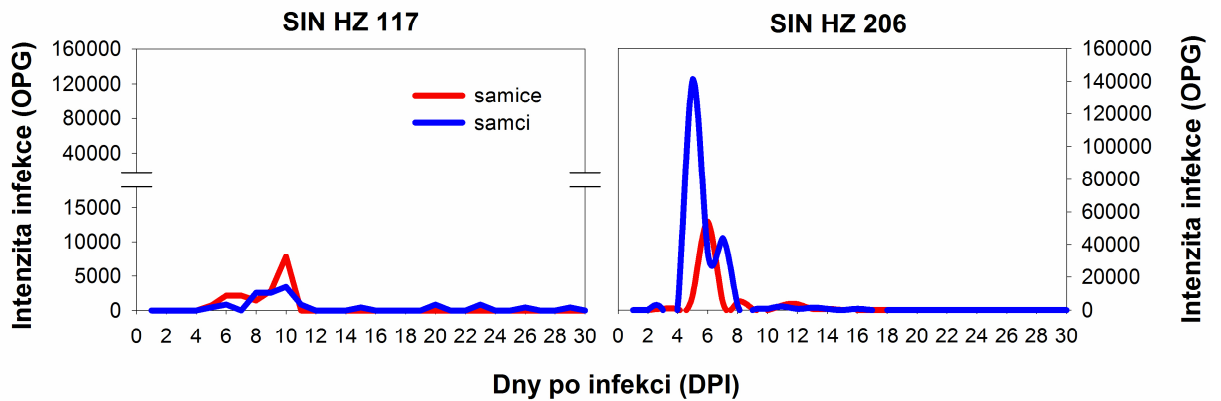
Graf 2. Průběh infekce kmen SCHEST, srovnání obou izolátů



Graf č. 2 ukazuje průběh infekce u myši kmene SCHEST (*M. musculus domesticus*). Jedná se o jediný kmen, u něhož jsou k infekci oběma izoláty výrazně vnímavější samice. Vnímavost k jednotlivým izolátům se nijak diametrálně neliší. Liší

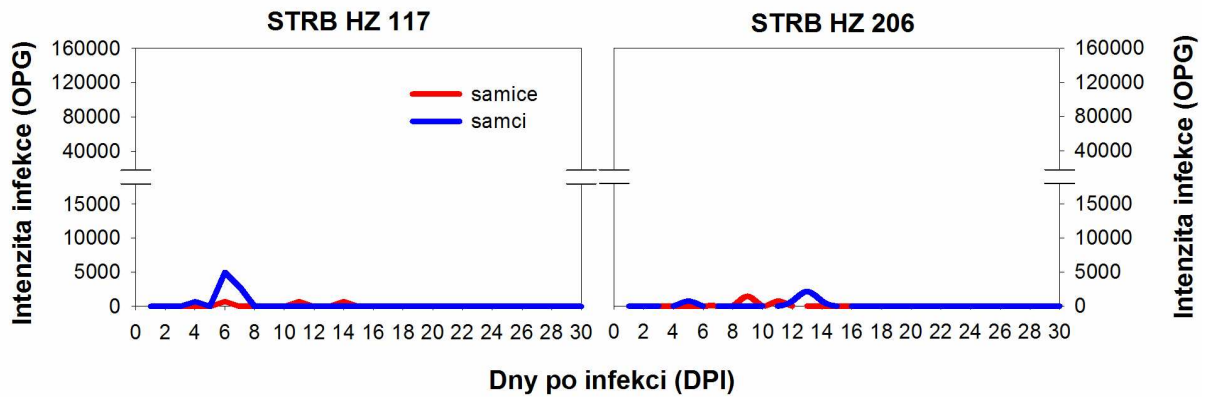
se ale patentní perioda, která je delší u izolátu HZ 206. Podle molekulární analýzy se dokázaly vyléčit pouze samice při infekci izolátem HZ 206

Graf 3. Průběh infekce kmen SIN, srovnání obou izolátů



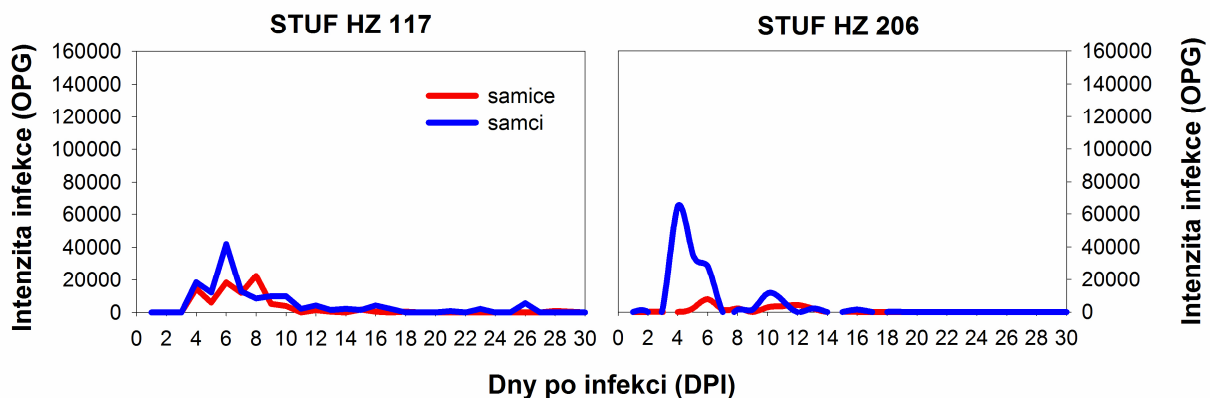
Graf č. 3 ukazuje průběh infekce u myši kmenu SIN (*M. musculus domesticus*). Ukázalo se, že k izolátu HZ 117 jsou vnímavější samice, zatímco k izolátu HZ 206 jsou vnímavější samci. Intenzita infekce u samců při infekci izolátem HZ 206 dosahuje takřka třicetinásobku intenzity infekce samců u izolátu HZ 117 a jedná se o vůbec nejvyšší zjištěnou intenzitu infekce a to $141,5 \times 10^3$ OPG (oocyst na gram trusu). Pouze samci při infekci izolátem HZ 117 se nedokázali vyléčit. U ostatních skupin nebyla při provedení molekulární analýzy prokázána přítomnost *C. mouse* genotype I v trusu.

Graf 4. Průběh infekce kmen STRB, srovnání obou izolátů



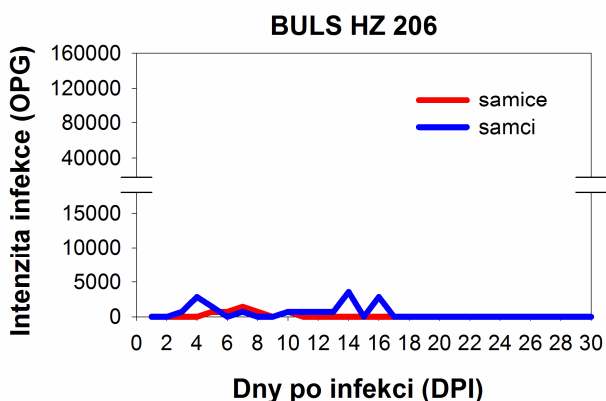
Graf č. 4 ukazuje průběh infekce u myší kmene STRB (*M. musculus domesticus*). U tohoto kmene byla nepatrně vyšší intenzita infekce u samců k izolátu HZ 117. Všeobecně byla intenzita infekce u tohoto kmene poměrně nízká, avšak molekulární analýza prokázala, že trvala až do konce experimentu, a to u obou izolátů a u všech skupin pokusných zvířat.

Graf 5. Průběh infekce kmen STUF, srovnání obou izolátů



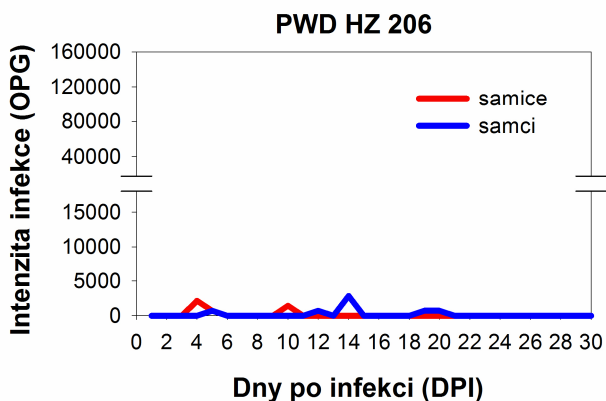
Graf č. 5 ukazuje průběh infekce u myší kmenu STUF (*M. musculus musculus*). Myši tohoto kmene jsou vnímavější k izolátu HZ 206, a to opět samci. U tohoto kmene můžeme delší patentní periodu pozorovat u izolátu HZ 117 a pomocí molekulární analýzy byly samice pozitivní i na konci experimentu, zatímco samci se dokázali vyléčit, a to jak u izolátu HZ 117, tak i u druhého izolátu HZ 206.

Graf 6. Průběh infekce kmen BULS, izolát HZ 206



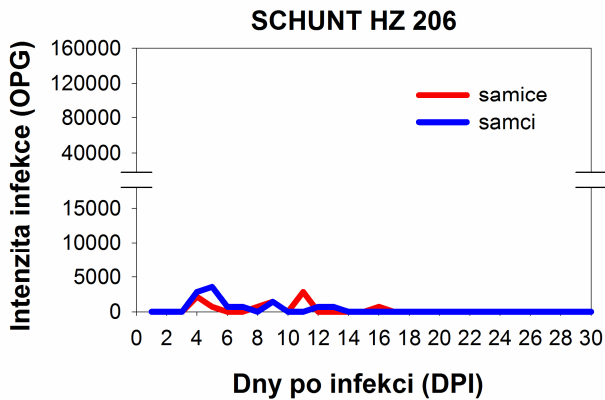
Graf č. 6 ukazuje průběh infekce u myší kmenu BULS (*M. musculus musculus*). U tohoto kmene jsou opět nepatrně vnímavější samci. I když celková intenzita infekce byla dost nízká, opět bylo pomocí molekulární analýzy prokázáno, že samice i samci vylučují oocysty až do konce experimentu.

Graf 7. Průběh infekce kmen PWD, izolát HZ 206



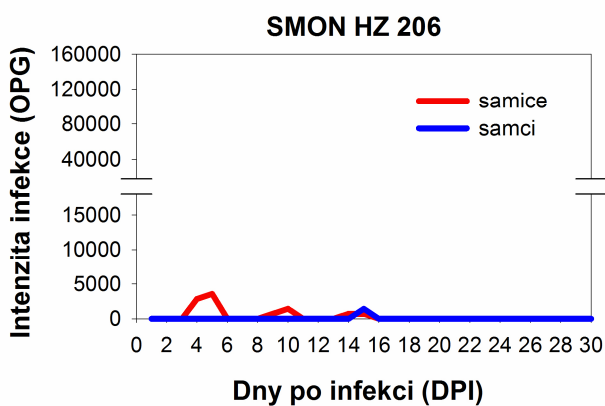
Graf č. 7 ukazuje průběh infekce u myší kmenu PWD (*M. musculus musculus*). Také u tohoto kmenu jsou vnímavější samci a intenzita infekce byla opět poměrně nízká. Pomocí molekulární analýzy bylo prokázáno, že infekce trvala až do konce experimentu, a to i u izolátu HZ 117, kde byla intenzita infekce tak nízká, že se ji po celou dobu trvání experimentu nepodařilo mikroskopicky zaznamenat.

Graf 8. Průběh infekce kmen SCHUNT, izolát HZ 206



Graf č. 8 ukazuje průběh infekce u myši kmenu SCHUNT (*M. musculus domesticus*). U tohoto kmene jsou opět k infekci vnímavější samci, ale bylo prokázáno, že i samice vylučují oocysty do úplného konce experimentu. U tohoto kmene je situace obdobná jako u kmene PWD. I zde byly při infekci izolátem HZ 117 při mikroskopickém vyšetření všechna zvířata po celou dobu experimentu negativní, avšak molekulární analýza prokázala přítomnost *C. mouse* genotype I v trusu, a to i 30 DPI.

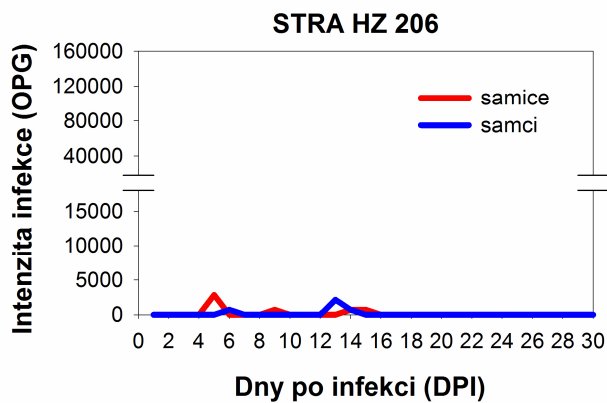
Graf 9. Průběh infekce kmen SMON, izolát HZ 206



Graf č. 9 ukazuje průběh infekce i u kmenu myši SMON (*M. musculus domesticus*). U tohoto kmene jsou k infekci izolátem HZ 206 vnímavější samice.

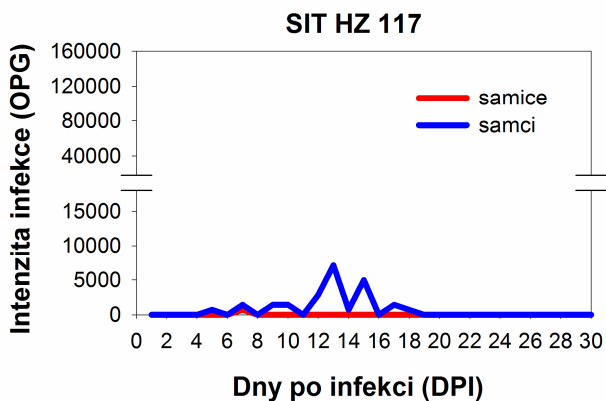
Pomocí molekulární analýzy bylo prokázáno, že samci se z infekce dokázali vyléčit, zatímco u samic trvala až do konce experimentu.

Graf 10. Průběh infekce kmen STRA, izolát HZ 206



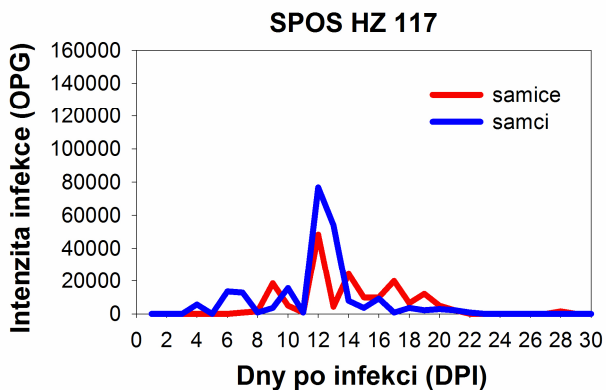
Graf č. 10 ukazuje průběh infekce u myší kmene STRA (*M. musculus domesticus*). U tohoto kmene je vnímavost jednotlivých pohlaví takřka na stejné úrovni. Molekulární analýzou se podařilo prokázat, že samci se dokázali vyléčit, zatímco samice vylučovaly po celou dobu trvání experimentu. I u tohoto kmene myší byla při experimentální infekci izolátem HZ 117 při mikroskopickém vyšetření všechna zvířata negativní. Avšak molekulární analýza prokázala přítomnost *C. mouse* genotype I v trusu samic i 30. DPI.

Graf 11. Průběh infekce kmen SIT, izolát HZ 117



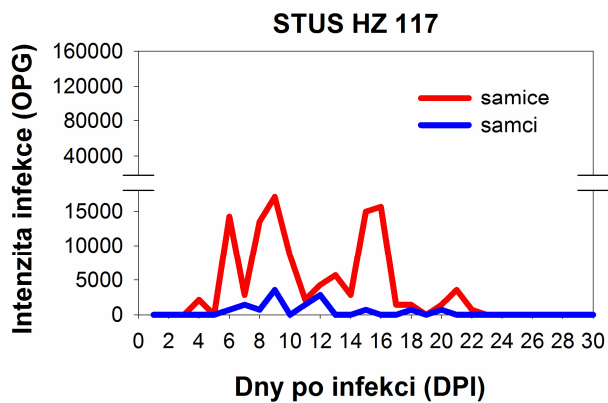
Graf č. 11 ukazuje průběh infekce u myší kmenu SIT (*M. musculus domesticus*). U těchto myší je intenzita infekce větší u samců. Molekulární analýzou bylo prokázáno, že obě pohlaví se dokázala vyléčit.

Graf 12. Intenzita infekce kmen SPOS, izolát HZ 117



Graf č. 12 ukazuje průběh infekce u kmenu myší SPOS (*M. musculus domesticus*). Samci tohoto kmene byli k infekci izolátem HZ 117 vnímavější a jedná se vůbec o nejvnímavější kmen u tohoto izolátu, nejvyšší dosažená OPG byla $76,8 \times 10^3$. Podle molekulární analýzy se samice na rozdíl od samců nedokázaly vyléčit.

Graf 13. Intenzita infekce kmen STUS, izolát HZ 117



Graf č. 13 ukazuje průběh infekce u kmenu myši STUS (*Mus musculus musculus*). U tohoto kmene se ukázaly jako vnímavější samice, a to poměrně výrazně. Avšak patentní i prepatentní perioda je srovnatelná u obou pohlaví a rovněž u obou pohlaví došlo podle molekulární analýzy k vyléčení.

5. Diskuze

V oblasti hybridní zóny se provádí především řada genetických a evolučních studií týkající se dvou odlišných poddruhů myši domácí (*Mus musculus*), a to myši domácí západoevropské (*Mus musculus domesticus*) a myši domácí středoevropské (*Mus musculus musculus*) (Piálek et al. 2008). V nedávné době zde bylo započato i s výzkumem výskytu parazitů (mikrosporidií a kryptosporidií) běžně infikujících myšovitě hlodavce (Sak et al. 2010) se zaměřením na posouzení vnitrodruhové variability ve vztahu parazit - hostitel.

Při studiích přímo v oblasti hybridní zóny byly získány dva izoláty *Cryptosporidium* mouse genotype I, HZ 117 a HZ 206. Vnímavost jednotlivých kmenů myši k experimentální infekci těmito izoláty nebyla doposud nikým sledována. Nebyla zatím ani zjišťována úspěšnost experimentální infekce myši domácí západoevropské (*Mus musculus domesticus*) izolátem HZ 206 (původně získaným z *M. musculus musculus* v lokalitě Buškovice) a myši domácí středoevropské *M. musculus musculus* izolátem HZ 117 (původně získaným z *M. musculus domesticus* v lokalitě Münchereuth). Zrovna tak nebyly dosud popsány patentní a prepatentní periody u jednotlivých hostitelů *Cryptosporidium* mouse genotype I. Z námi získaných výsledků vyplývá, že vnímavost jednotlivých kmenů myši se od sebe diametrálně liší. Prepatentní perioda se pohybovala v rozmezí 3 – 6 dnů po infekci u izolátu HZ 117 a v rozmezí 2 – 14 dnů po infekci u izolátu HZ 206. Tento údaj je srovnatelný s prepatentní periodou uváděnou pro *Cryptosporium parvum* u hlodavců, průměrná prepatentní perioda je zde uváděna 6,2 dnů po infekci (Yang et al. 2000, Barbot et al. 2001). Další běžně se vyskytující kryptosporidií u hlodavců je *Cryptosporidium muris*. Tato kryptosporidie má životní cyklus lokalizovaný v žaludku. Žaludeční kryptosporidie vykazují všeobecně delší prepatentní periodu než kryptosporidie střevní. U myši je uváděna prepatentní perioda v délce 18 – 36 dnů po infekci (Koudela et al. 1998). Na základně různě dlouhých prepatentních period je možné střevní a žaludeční kryptosporidie snadno oddělit při smíšených infekcích.

Během této studie jsme sledovali průběh experimentální infekce *Cryptosporidium* mouse genotype I (izoláty HZ 117 a HZ 206) celkem u 14 odlišných kmenů myši, 5 kmenů myši *Mus musculus musculus* (BULS, BUSNA, PWD, STUF a STUS) a 9 kmenů myši *Mus musculus domesticus* (PLOSSEN, SCHEST, SCHUNT, SIN, SIT, SMON, SPOS, STRA a STRB). Srovnání vnímavosti k oběma izolátům

jsme provedli pouze u kmenů myši (BUSNA, PWD, SCHEST, SCHUNT, SIN, STRA, STRB a STUF), u ostatních kmenů myši nebyl k dispozici dostatečný počet jedinců, proto jsme provedli infekci pouze jedním ze dvou izolátů.

Jak již bylo řečeno, vnímavost jednotlivých kmenů se mezi sebou lišila a byla pozorována i odlišnost mezi vnímavostí u jednotlivých pohlaví. U většiny kmenů jsme pozorovali vyšší intenzitu infekce, vyjádřenou množstvím oocyst na gram trusu, u samců, pouze u kmene SCHEST byly k infekci oběma izoláty výrazně vnímavější samice. Samice byly nepatrně vnímavější i u kmenů STRA infekce izolátem HZ 206, SMON infekce izolátem HZ 206. U kmene myši STUS byly samice opět výrazně vnímavější k experimentální infekci izolátem HZ 117. U všech kmenů byla vnímavost samic a samců shodná k oběma izolátům. Pouze u kmene SIN byly při infekci izolátem HZ 117 vnímavější samice, zatímco při infekci izolátem HZ 206 byli vnímavější samci. Vyšší vnímavost samců bývá přičítána imunosupresivnímu účinku testosteronu. V průběhu našeho experimentu se díky vyšší vnímavosti samic u některých kmenů ukázalo, že imunosupresivní účinek testosteronu zřejmě nehraje jedinou roli. Existuje zde variabilita mezi jednotlivými geneticky se lišícími kmeny myši a dokonce i variabilita v rámci jednoho kmene při infekci různými izoláty *Cryptosporidium* mouse genotype I. Jednotlivé izoláty od sebe byly odlišeny na základě rozdílů v genu pro glykoprotein 60 (GP60), 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 et al. 2007). Například podtypy *C. parvum* a *C. hominis* byly odlišeny právě na základě této variability (Sulaiman et al. 2005).

U kmenů myši, kde jsme měli možnost srovnat průběh experimentální infekce oběma izoláty, byla prokázána vnímavost jednotlivých myši jak k izolátu HZ 117, tak k izolátu HZ 206. U kmenů myši BUSNA, SCHEST, STRB a STUF byla vyšší vnímavost k infekci pozorována u izolátu původně získaného z daného poddruhu myši, takže u kmenů BUSNA a STUF k izolátu HZ 206 („*musculoidní* izolát“) a u kmenů SCHEST a STRB k izolátu HZ 117 („*domestikoidní* izolát“). V jediném případě, a to u myši kmene SIN (*Mus musculus domesticus*), byla vyšší intenzita infekce pozorována u izolátu HZ 206 („*musculoidní* izolát“). Rozdíl mezi jednotlivými izoláty byl opravdu markantní, u izolátu HZ 206 byla nejvyšší intenzita infekce u samců až třicetinásobná oproti izolátu HZ 117. U kmenů myši SCHUNT, SMON, STRA a STUS jsme úspěšně provedli experimentální infekci izolátem původně získaným z druhého poddruhu myši.

U kmene myši PLOSSEN (*M. musculus domesticus*) nebyla experimentální infekce izolátem HZ 117 („domestikoidní izolát“) úspěšná.

Různá vnímavost u jednotlivých kmenů myši může být způsobena jak rozdíly v genu pro GP60 jak již bylo zmíněno výše, tak například i různě namířenou imunitní odpovědí u jednotlivých poddruhů myši. U *Cryptosporidium* mouse genotype I nebyly zatím provedeny žádné imunologické studie. Nejlépe je imunitní odpověď proti kryptosporidii prostudována u střevní kryptosporidie *C. parvum*. Ta je však věkově specifická a dospělá zvířata jsou považována za rezistentní vůči tomuto druhu. Vhodným modelem pro studium imunitní odpovědi u hlodavců je žaludeční kryptosporidie *C. muris*, a to především z důvodu dlouhé prepatentní a patentní periody a také z důvodu absence věkové specifity, díky které lze provádět srovnávací studie infekitivity u imunokompetentních a imunodeficitních myši (McDonald and Bancroft 1993). Důležitosti přítomnosti T-buněčné odpovědi proti kryptosporidiové infekci si jako první povšimnul Heine, který zjistil, že novorozené nahé myši při experimentální infekci *C. parvum* trpí chronickou a nakonec fatální formou kryptosporidie, zatímco myši s neporušenou T-buněčnou imunitní odpovědí jsou nakonec schopné se z infekce vyléčit (Heine et al. 1984). V podobných studiích byl stejný průběh prokázán i u experimentálních infekcí druhem *C. muris* u SCID myši (Mead et al. 1991, Kuhls et al. 1992, McDonald et al. 1992). T-lymfocyty TCR $\alpha\beta$ exprimují na svém povrchu další znaky, podle kterých jsou T-lymfocyty rozlišeny na CD4+ a CD8+ lymfocyty. Důkazy o protektivní roli CD4+ lymfocytů přinesla řada experimentů. Myši s nedostatkem MHC II se nebyly schopny vyléčit z infekce *C. parvum* (Aquirre et al. 1994). Podáním protilátek proti CD4+ antigenu významně zhoršilo průběh infekce (Ungar et al. 1991, McDonald et al. 1994). Depleční pokusy na SCID myších ukázaly, že myši byly po přidání suspenze lymfocytů schopny kontrolovat infekci, ovšem když byly CD4+ T-lymfocyty ze suspenze odstraněny, myši nebyly schopny se vyléčit (Chen et al. 1993, McDonald et al. 1994).

Při infekci kryptosporidii hrají podstatnou roli také NK buňkami sekretované cytokiny, za klíčový je považován IFN- γ . Rovněž cytotoxická aktivita NK buněk je považována za jeden z účinných obranných mechanismů při kryptosporidii. Při infekci myši s tzv. beige mutation, která je charakterizována nedostatečnou cytotoxickou aktivitou NK buněk (Reder and Duwe 1979), byl pozorován těžší průběh infekce *C. parvum* oproti zdravým myším (Enriquez and Sterlina 1991).

Výše zmíněná fakta mohou ovlivňovat vnímavost jednotlivých kmenů hostitelů i při infekci *Cryptosporidium* mouse genotype I. Je zapotřebí dalších infekčních studií se zaměřením na imunitní odpověď u jednotlivých kmenů a u případných hybridů, vzniklých křížením vnímavých a nevnímavých kmenů.

6. Závěry

- Různé kmeny myši obou poddruhů myši domácí (*Mus musculus*) jsou vnímavé k experimentální infekci *Cryptosporidium* mouse genotype I pocházejících z hybridní zóny.
- V rámci jednoho kmene byly pozorovány rozdíly ve vnímavosti hostitelů v závislosti na pohlaví. Nicméně nebyla jednoznačně potvrzena předpokládaná vyšší vnímavost samců.
- Experimentálními infekcemi byla prokázána hostitelská adaptace použitých izolátů *Cryptosporidium* mouse genotype I na odpovídající poddruhy myši domácí.
- Faktory ovlivňující vnímavost jednotlivých hostitelů je třeba dále studovat na genetické a imunologické úrovni.

7. Literatura

- 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. Clin. Microbiol.* **45:** 915-920.
- Akiyoshi D. E., Dilo J., Pearson C., Chapman S., Tumwine J., Tzipori S. 2003:** Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of Human Origin Passaged through Different Host Species. *Infect. Immun.* **71:** 1828-1832.
- Alvarez-Pellitero P., Quiroga M. I., Sitjà-Bobadilla A., Redondo M. J., Palenzuela O., Padrós F., Vázquez S., Nieto J. M. 2004:** *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. Aquat. Organ.* **62:** 133-145.
- Alvarez-Pellitero P., Sitjà-Bobadilla A. L. 2002:** *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Int. J. Parasitol.* **32:**1007-1021.
- Anderson B. C. 1991:** Experimental infection in mice of *Cryptosporidium muris* isolated from camel. *J. Protozool.* **38:** 16-17.
- Aquirre S. A., Mason P. H., Perryman L. E. 1994:** Susceptibility of major histocompatibility complex (MHC) class I- and MHC II-deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* **62:** 697-699.
- Arrowood M. J., Sterling C. R. 1987:** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.* **73:** 314-319.
- Bajer A., Cacciò S., Bednarska M., Behnke J. M., Pieniazek N. J., Sinski E. 2003:** Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents Poland. *J. Parasitol.* **89:** 1053-1055.

- Barbot L., Topouchia A., Capet C., Magne D., Huneau J. F., Kapel N., Gober J. G. 2001:** *Cryptosporidium parvum*: functional study of the intestinal malabsorption syndrome. *Ann. Pharm. Fr.* **59**: 305-311.
- Brescia C. C., Griffin S. M., Ware M. W., Varughese E. A., Egorov A. I., Villegas E. N. 2009:** *Cryptosporidium* propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 6856-6863.
- Browstein D. G., Strandberg J. D., Montali R. J., Bush M., Fortner J. 1977:** *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. *Vet. Pathol.* **14**: 606-617.
- 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 person. *J. Infect. Dis.* **196**: 648-691.
- 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.
- Chacín-Bonnilla L. 2007:** *Cryptosporidium*: phylogeny and taxonomy. *Invest. Clin.* **48**: 1-4.
- Chappell C. L., Okhuysen P. C., Sterling C. R., Wang C., Jakubowski W., DuPont H. L. 1999:** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 157-164.
- Chen W., Harp J. A., Harmsen A. G. 1993:** Requirements for CD4+ cells and gamma interferon in resolution of established *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Infect. Immun.* **61**: 3928-3932.
- Corliss J. O. 1994:** An interim utilitarian ("user friendly") hierarchical classification and characterization of the protist. *Acta Protozool.* **33**: 1-51.

- Current V. L., Upton S. J., Haynes T. B. 1986:** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool.* **33:** 289-371.
- Current W. L., Garsia L. S. 1991:** Cryptosporidiosis. *Clin. J. Microbiol.* **4:** 325-358.
- De Graaf D. C., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora L. M., Abbassi H., Peeters J. E. 1999:** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* **29:** 1269-1287.
- Ditrich O., Palkovič L., Štěrba J., Prokopič J., Loudová J., Giboda M. 1991:** The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. *Parasitol. Res.* **77:** 44-47.
- Dubey J. P., Hamir A. N., Sonn R. J., Topper M. J. 1998:** *Cryptosporidiosis* in a bat (*Eptesicus fuscus*). *J. Parasitol.* **84:** 622-623.
- Enriquez F. J., Sterling C. R. 1991:** *Cryptosporidium* infections in inbred strains of mice. *J. Protozool.* **38:** 100-102.
- Fayer R., Santin M. 2009:** *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* **164:** 192-200.
- Fayer R., Santin M., Macarisin D. 2010:** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* **172:** 23-32.
- Fayer R., Santin M., Trout J. M. 2008:** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* **156:** 191-198.
- Fayer R., Santin M., Xiao L. 2005:** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* **91:** 624-629.
- Fayer R., Speer C. A., Dubey J. P., 1997:** The general biology of *Cryptosporidium*. In Fayer R. (Eds.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *CRC Press*. pp. 2-33.
- Fayer R., Trout J. M., Xiao L., Morgan U. M., Lai A. A., Dubey J. P. 2001:** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* **87:** 1415-1422.

- Fayer, R., Guidry, A., Blagburn, B.L. 1990:** Immunotherapeutic efficacy of bovine colostral immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infect. Immun.* **58:** 2962-2965.
- Feng Y., Lal A., Na Li, Xiao L. 2010:** Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.* **127:** 238-242.
- Feng Y., Ortega Y., He G., Das P., Xu M., Zhang X., Fayer R., Gatei W., Cama V., Xiao L. 2007:** Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Parasitol.* **144:** 1-9.
- Foo C., Farrell J., Boxell A., Robertson I., Ryan U. M. 2007:** Novel *Cryptosporidium* genotype in wild Australian mice (*Mus domesticus*) *Appl. Environ. Microbiol.* **73:** 7693-7696.
- Heine J., Moon H. W., Woodmansee D. B. 1984:** Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect. Immun* **43:** 856-859.
- Huang K., Akiyoshi D. E., Feng X., Tzipori S. 2003:** Development of patent infection in immunosuppressed C57Bl/6 mice with a single *Cryptosporidium meleagridis* oocyst. *J. Parasitol.* **89:** 620-622.
- 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.
- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Krížek J., Modrý D., Slapeta J. 2008:** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol.* **55:** 81-94.
- Kodádková A., Kvác M., Ditrich O., Sak B., Xiao L. 2010:** *Cryptosporidium muris* in a reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). *J. Parasitol.* **96:** 211-212.
- Koudela B., Modrý D., Vítovec J. 1998:** Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. *Vet. Parasitol.* **76:** 181-188.

- Kuhls T. L., Grennfield R. A., Mosier D. A., Crawford D. L., Joyce W. A. 1992:** Cryptosporidiosis in adult and neonatal mice with severe combined immunodeficiency. *J. Comp. Pathol.* **106:** 399-410.
- Kuo C., Wares J. P., Kissinger J. C. 2008:** The Apicomplexan whole-genome phylogeny: An analysis of incongruence among Gene Trees. *Mol. Biol. Evol.* **25:** 2689-2698.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. 2007:** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* **143:** 229-233.
- Kváč M., Vítovec J. 2003:** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med B Infect Dis. Vet. Public Health* **50:** 451-457.
- Levine N. D. 1980:** Some corrections of coccidian (Apicomplexa, Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* **66:** 830-834.
- Lindsay D. S., Blagburn B. L., Sundermann C. A. 1989:** Morphometric comparison of the oocyst of *Cryptosporidium meleagridis* and *Cryptosporidium baileyi* from birds. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* **56:** 91-92.
- Lindsay D. S., Upton S. J., Owens D. S., Morgan U. M., Mead J. R., Blagburn B. L. 2000:** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *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.
- MacFarlane D., Horner-Bryce J. 1987:** Cryptosporidiosis in well-nourished and malnourished children. *Acta. Paediatr. Scand.* **76:** 474-477.

- Manabe Y., Clark D., Moore R., Lumadue J., Dahlman H., Belitsos P., Chaisson R., Sears C. 1998:** Cryptosporidiosis in patients with AIDS: Correlates of disease and survival. *Clin. Infect. Dis.* **27:** 536-542.
- Matsubayashi M., Kimata I., Iseki M., Hajiri T., Tani H., Sasai K., Baba E. 2005:** Infectivity of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. *Vet. Parasitol.* **129:** 165-168.
- Matsubayashi, M., Kimata, I., Abe, N., Tani, H., Sasai, K. 2004:** The detection of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* oocyst in cattle in Japan. *Parasitol. Res.* **93:** 504-506.
- McDonald V., Bancroft G. J. 1993:** *Cryptosporidium muris* in adult mice: a model for investigation of the immunology of mammalian cryptosporidiosis. In Bartha J. R., Fernando M. A. (Ed.) Proceedings of the VIth International Coccidiosis Conference. University of Guelph, Canada p. 133.
- McDonald V., Deer R., Uni S., Iseki M., Bancroft G. J. 1992:** Immune response to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect. Immun.* **60:** 3325-3331.
- McDonald V., Robinson H. A., Kelly J. P., Bancroft G. J. 1994:** *Cryptosporidium muris* in adult mice: adoptive transfer of immunity and protective roles of CD4 versus CD8 cells. *Infect. Immun.* **62:** 2289-2294.
- Mead J. R., Arrowood M. J., Sidwell R. W., Healey M. C. 1991:** Chronic *Cryptosporidium parvum* infections in congenitally immunodeficient SCID and nude mice. *J. Infect. Dis.* **163:** 1297-1304.
- Meamar A. R., Rezaian M., Rezaie S., Mohraz M., Kia E. B., Houtp E. R., Solaymani-Mohammadi S. 2006:** *Cryptosporidium parvum* bovine genotype oocysts in the respiratory samples of an AIDS patient: efficacy of treatment with a combination of azithromycin and paromomycin. *Parasitol. Res.* **98:** 593-595.
- Meisel J. L., Perera D. R., Meligro C., Rubin C. E. 1976:** Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* **70:** 1156-1160.

- Miláček P., Vítovec J. 1985:** Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* **32:** 50.
- Morgan U. M., Monis P. T., Xiao L., Limor J., Sulaiman I., Raidal S., O'Donoghue P., Gasser R., Murray A., Fayer R., Blagburn B.L., Lla A. A., Thompson R. C. 2001:** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.* **31:** 289-296.
- 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.
- Morgan U., Weber R., Xiao L., Sulaiman I., Thompson R. C., Ndiritu W., Lal A., Moore A., Deplazes P. J. 2000:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *Clin. Microbiol.* **38:** 1180-1183.
- Morgan-Ryan U. M., Fall A., Ward L. A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R. C., Olson M., Lal A., Xiao L. 2002:** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **49:** 433-440.
- Nime F. A., Burek J. D., Page L. L., Holscher M. A., Yardley J. H. 1976:** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* **70:** 592-598.
- Nimri F. L., Batchoun R. 1994:** Prevalence of *Cryptosporidium* species in elementary school children. *J. Clin. Microbiol.* **32:** 1040-1042.
- O'Donoghue P. J. 1995:** *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and animals. *J. Parasitol.* **25:** 139-195.
- Pavlásek I., Ryan U. 2008:** *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. *Exp. Parasitol.* **118:** 434-437.

- Pedraza-Diaz S., Amar C., McLauchlin J. 2000:** The identification and characterization of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**: 189-194.
- Piálek J., Vyskocilová M., Bímová B., Havelková D., Piálková J., Dufková P., Bencová V., Dureje L., Albrecht T., Hauffe H. C., Macholán M., Munclinger P., Storchová R., Zajícová A., Holán V., Gregorová S., Forejt J. 2008:** Development of unique house mouse resources suitable for evolutionary studies of speciation. *J. Hered.* **99**: 34-44.
- Plutzer J., Karanis P. 2009:** Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet. Parasitol.* **165**: 187-199.
- Power M. L., Ryan U. M. 2008:** A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J. Parasitol.* **94**: 1114-1117.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S. J., Katzer F., Bartley P. M., Hunter P. R., Nath M., Innes E. A., Chalmers R. M. 2010:** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* **40**: 1539-1548.
- Roder J., Duwe A. 1979:** The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function. *Nature* **29**: 451-453.
- Ryan U. M., Monis P., Enemark H. L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R. C., Xiao L. 2004:** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* **90**: 769-773.
- Ryan U. M., Power M., Xiao L. 2008:** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryot. Microbiol.* **55**: 22-26.

- Ryan U. M., Xiao L., Read C., Sulaiman I. M., Monis P., Lal A. A., Fayer R., Pavlasek I. 1999:** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J. Parasitol.* **89**: 809-813.
- Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A. A., Pavlasek I. 2003:** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4302-4307.
- Sak B., Kváč M., Květoňová D., Albrecht T., Piálek J. 2011:** The first report on natural *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon* spp. Infections in wild East-European house mice (*Mus musculus musculus*) and West-European house mice (*M. musculus domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic-Germany border. *Vet. Parasitol.* v tisku
- Satoh M., Hikosaka K., Sasaki T., Suyama Y., Yanai T., Ohta M., Nakai Y. 2003:** Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 691-692.
- Slavin D. 1955:** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.) *J. Comp. Pathol.* **65**: 262-266
- Sulaiman I. M., Hira P. R., Zhou L., Al-Ali F. M., Al-Shelahi F. A., Shweiki H. M., Iqbal J., Khalid N., Xiao L. 2005:** Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 2805-2809.
- Thompson R. C., Olson M. E., Zhu G., Enomolo S., Abrahamsen M. S., Hijjawi N. S. 2005:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* **59**: 77-158.
- Tůmová M., Skřivan M., Marounek M., Pavlásek I., Ledvinka Z. 2002:** Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with *Cryptosporidium baley* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Avian. Dis.* **46**: 203-207.
- 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. 1910:** An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* **23**: 487-511.

- Tyzzler 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., Griffiths J. K. 1998:** Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* **40:** 5-36.
- Ungar B. L., Kao T. C., Burris J. A., Finkelman F. D. 1991:** *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN-gamma and CD4+ T lymphocytes in protective immunity. *J. Immunol.* **147:** 1014-1022.
- Uni S., Iseki M., Maekawa T., Moriva K., Takada S. 1987:** Ultrastructure of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) parasitizing the murine stomach. *Parasitol. Res.* **74:** 123-132.
- Upton S. J., Current W. L. 1985:** The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *J. Parasitol.* **71:** 625-629.
- Valigurová A., Hofmannová L., Koudela B., Vávra J. 2007:** An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *J. Eucaryot. Microbiol.* **54:** 495-510.
- Vetterling J. M., Jervis H. R., Merrill T. G., Sprinz H. 1971:** *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *J. Protozool.* **18:** 243-724.
- Xiao L., Bern C., Limor J., Sulaiman I., Roberts J., Checkley W., Cabrera L., Gilman R. H., Lal A. A. 2001:** Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.* **183:** 492-497.
- Xiao L., Fayer R. 2008:** Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* **38:** 1239-1255.
- 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., Feng, Y. 2008:** Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52:** 309-323.

Yang S., Benson S. K., Du C., Healey M. C. 2000: Infection of immunosuppressed C57BL/6N adult mice with a single oocyst of *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* **86:** 884-887.

Zhu G., Marchewka M. J., Keithly J. S. 2000: *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology* **146:** 315-321.