

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA**

**Detekce kryptosporidií pomocí molekulárních metod  
v klinických vzorcích: infekce nebo pasáž oocyst  
zaživacím traktem hostitele?**

Bakalářská práce

Autor práce: Lucie Munzarová

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

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

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2012

Detekce kryptosporidií pomocí molekulárních metod v klinických vzorcích: infekce nebo pasáž oocyst zažívacím traktem hostitele?

## **ABSTRAKT**

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou lékařsky a veterinárně významní jednobuněční parazitičtí prvoci, kteří infikují všechny třídy obratlovců včetně člověka. Jejich vývojový cyklus je monoxenní, což znamená, že je kompletně ukončen v jednom hostiteli. Jejich exogenní infekční vývojová stádia - oocysty - jsou většinou vylučovány výkaly. Způsobují onemocnění zvané kryptosporidíóza. Obecně se předpokládá, že izoláty kryptosporidií z jedné třídy obratlovců nejsou infekční pro jiné hostitele z dalších tříd, a také, že většina druhů a genotypů kryptosporidií má nízkou hostitelskou specifitu. Nicméně existuje celá řada případů, kdy byla prokázána přítomnost oocyst, respektive specifické kryptosporidiové DNA v trusu tzv. netypických hostitelů. Vzhledem k tomu, že většina genotypů a jejich potenciálních hostitelů byla popsána pouze na základě přítomnosti specifické kryptosporidiové DNA v trusu, vyvstává otázka, kterou se zabývá tato bakalářská práce, zda tito hostitelé jsou ve všech případech vnímaví k dané infekci nebo se jednalo o pouhou kontaminaci vzorku či pasáž oocyst zažívacím traktem hostitele. Na tuto otázku se studie snaží odpovědět sérií experimentů. Pro experimentální infekci hlodavců byly použity různé izoláty kryptosporidií, kterými byla zvířata perorálně infikována a po dosažení předpokládané patentní periody utracena. Pomocí kombinace standardních parazitologických a molekulárních metod jsme sledovali přítomnost oocyst a specifické DNA kryptosporidií v trusu a ve sliznici zažívacího traktu infikovaných hostitelů. Výsledky studie ukázali, že pasáž oocyst zažívacím traktem je možné detekovat v rozmezí pouze 6-24 hodin po infekci, a to ne ve všech případech. Na základě tohoto zjištění jsme částečně potvrdili hypotézu 1: Detekcí specifické kryptosporidiové DNA ve vzorcích stolice nebo trusu nelze jednoznačně posoudit, zda se jedná o probíhající infekci v hostiteli nebo o pasáž oocyst zažívacím traktem. Hypotézu 2: Specifickou kryptosporidiovou DNA v klinických vzorcích stolice nebo trusu lze detekovat pouze v případech úspěšné infekce hostitele, jsme zavrhnuli.

Detection of cryptosporidia by means of molecular methods in clinical samples:  
infection or the transit of oocysts through the host gastrointestinal tract?

## **SYNOPSIS**

Representatives of the *Cryptosporidium* family are, from a medical and veterinary aspect, designated as important unicellular parasitic protozoa infecting all classes of vertebrates including humans. Their development cycle is monoxene, which means that its life cycle is completed uniquely in one host. Their exogenous stages of infection development – oocysts – are mostly secreted in faeces causing a parasitic disease called Cryptosporidiosis. Generally, it is assumed that isolated cryptosporidia from one class of vertebrates are not contagious for other hosts from different classes, and also, that the majority of cryptosporidia types and genotypes have low host specificity. However, there are many cases where the presence of oocysts was proved, or the presence of specific cryptosporidium DNA in faeces of atypical hosts. With regard to the fact that the majority of genotypes and their potential hosts were described only on the basis of the presence of the specific cryptosporidium DNA in faeces, the question arises as to whether the aforementioned hosts are in all cases perceptive to the given infection, or it was only contamination in a sample or the transit of oocysts through the host gastrointestinal tract. This issue is also characterised as being the main objective of this thesis. The study gives an appropriate answer to this question by a series of experiments. Different isolations of cryptosporidia were used for experimental infection of rodents which were per orally infected and put down after reaching the specified patent period. By means of the combination of standard parasitological and molecular methods, the presence of oocysts and specific DNA of cryptosporidia in faeces and in mucous membrane of the gastrointestinal tract of infected hosts was observed. The results of this study prove that the transit of oocysts through the gastrointestinal tract can be detected in the interval between 6 and 24 hours after infection, yet not in every case. On the basis of this finding, the first hypothesis which stated that it is not possible to qualify explicitly by detection of a specific cryptosporidium DNA in faeces whether the infection has begun in the host or it is the transit of oocysts through the host

gastrointestinal tract, was thus partially proved. On the other hand the second hypothesis stating that the specific cryptosporidium DNA in clinical samples of faeces can be detected only in cases of the host's successful infection, was rejected.

Práce je součástí programu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie  
Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i

### **Prohlášení**

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 práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 3. 5. 2012

.....

Lucie Munzarová

## **Poděkování**

Chtěla bych velice poděkovat především svému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, bez kterého by nemohla vzniknout, jeho rady a trpělivost. Mé poděkování patří také Bohumilovi Sakovi a Daně Květoňové. Dále celému kolektivu laboratoře Veterinární a medicínské protistologie za ochotu kdykoliv pomoci a vytvoření přátelské atmosféry. Rovněž chci poděkovat za podporu své rodině.

Tato studie byla finančně podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LH11061). Izoláty z divokých myší byly získány v rámci projektu Grantové agentury České republiky (206/08/0640).

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	10
<b>1. SOUČASNÝ STAV</b> .....	11
1.1 Taxonomie.....	11
1.2. Historie.....	11
1.3 Hostitelská specifita .....	12
1.4 Kryptosporidie a kryptosporidióza nescifických hostitelů .....	13
1.5 Vývojový cyklus .....	15
1.6 Prepatentní a patentní perioda.....	18
1.7 Průběh a projevy kryptosporidiózy .....	19
1.8 Prevence a léčba.....	20
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	21
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	22
3.1. Materiál .....	22
3.1.1. Paraziti.....	22
3.1.3. Chovatelské podmínky .....	22
3.2. Metodika .....	23
3.2.1. Sběr parazitů a jejich příprava na purifikaci.....	23
3.2.2 Purifikace oocyst .....	23
3.2.2.1 Sacharózový gradient (Arrowood a Sterling 1987) .....	23
3.2.2.2 Cesium chloridový gradient.....	24
3.2.3 Zjištění koncentrace oocyst .....	24
3.2.4 Test životaschopnosti oocyst.....	25
3.2.5 Design experimentů.....	25

3.2.5.1 Infekční dávka.....	25
3.2.5.2 Kontrolní zvířata .....	25
3.2.5.3 Průběh infekce u hostitelů infikovaných žaludečnými kryptosporidiiemi	26
3.2.5.3.1 Odběr biologického materiálu.....	26
3.2.5.3.2. Detekce <i>Cryptosporidium muris</i> HZ206 v průběhu prepatentní periody u dospělých krys malých.....	26
3.2.5.3.3 Detekce <i>Cryptosporidium muris</i> TS03 v průběhu prepatentní periody u dospělých krys malých.....	26
3.2.5.3.4 Detekce <i>Cryptosporidium muris</i> HZ206 v průběhu prepatentní periody u dospělých SCID myší .....	26
3.2.5.3.5 Detekce <i>Cryptosporidium muris</i> TS03 v průběhu prepatentní periody u dospělých SCID myší.....	27
3.2.5.4. Průběh infekce u hostitelů infikovaných střevními kryptosporidiiemi....	27
3.2.5.4.1 Odběr biologického materiálu.....	27
3.2.5.4.2 Detekce <i>Cryptosporidium parvum</i> HA1 v průběhu prepatentní periody u neonatálních BALB/c myší.....	27
3.2.5.4.3 Detekce <i>Cryptosporidium parvum</i> HA1 v průběhu prepatentní periody u dospělých BALB/c myší .....	27
3.2.5.4.4 Detekce <i>Cryptosporidium parvum</i> HA1 v průběhu prepatentní periody u dospělých SCID myší .....	28
3.2.5.4.5 Detekce <i>Cryptosporidium tyzzeri</i> v průběhu prepatentní periody u dospělých SCID myší.....	28
3.2.5.4.6 Detekce <i>Cryptosporidium tyzzeri</i> v průběhu prepatentní periody u dospělých BALB/c myší .....	29
3.2.6 Parazitologické vyšetření nasbíraného materiálu .....	29
3.2.6.1 Barvení dle Miláčka a Vítovce (1985).....	29
3.2.7 Molekulární analýzy .....	30
3.2.7.1 Izolace DNA z trusu .....	30



3.2.7.2 Izolace DNA z tkáně (DNeasy Blood and Tissue Kit) .....	31
3.2.7.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	31
3.2.7.4 Gelová elektroforéza.....	33
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>35</b>
4.1 Experimentální infekce dospělých krys malých <i>Cryptosporidium muris</i> HZ206.	35
4.2 Experimentální infekce dospělých krys malých <i>Cryptosporidium muris</i> TS03 ...	36
4.3 Experimentální infekce dospělých SCID myši <i>Cryptosporidium muris</i> HZ206 ..	37
4.4 Experimentální infekce dospělých SCID myši TS03 <i>Cryptosporidium muris</i> TS03	37
4.5 Experimentální infekce neonatálních BALB/c myši <i>Cryptosporidium parvum</i> HA1 .....	38
4.6 Experimentální infekce dospělých BALB/c myši <i>Cryptosporidium parvum</i> HA1	39
4.7 Experimentální infekce dospělých SCID myši <i>Cryptosporidium parvum</i> HA1 ...	40
4.8 Experimentální infekce dospělých SCID myši <i>Cryptosporidium tyzzeri</i> .....	40
4.9 Experimentální infekce dospělých BALB/c myši <i>Cryptosporidium tyzzeri</i> .....	40
<b>5. DISKUZE</b> .....	<b>41</b>
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>44</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>45</b>
<b>8. KLÍČOVÁ SLOVA</b> .....	<b>58</b>

## ÚVOD

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou jednobuněční parazitičtí prvoci patřící do kmene Apicomplexa. Kryptosporidie jsou ubiquitárně rozšířeny a vyjma Antarktidy byly nalezeny na všech kontinentech (Palacios a kol. 2010). Až do konce minulého století bylo popsáno poměrně málo druhů kryptosporidií. S rozvojem molekulárních metod a jejich celosvětové dostupnosti (Nagamani a kol. 2007) došlo zejména v první polovině prvního desetiletí dvacátého prvního století k výraznému boomu v oblasti molekulární epidemiologie kryptosporidií.

Zatímco v roce 1999 bylo hlášeno až na 100 zpráv o molekulární detekci rodu *Cryptosporidium* u různých hostitelů, v současnosti je jich na 600 (zdroj: Web of Science).

Vzhledem k tomu, že celá řada genotypů a jejich potenciálních hostitelů byla popsána pouze na základě přítomnosti specifické kryptosporidiové DNA v trusu, je otázkou, zda tito hostitelé jsou ve všech případech vnímaví k dané infekci nebo se jednalo o pouhou kontaminaci vzorku či pasáž oocyst zažívacím traktem hostitele. Tato práce se pokusí sérií experimentů na tuto otázku odpovědět.

## 1. SOUČASNÝ STAV

### 1.1 Taxonomie

Rod *Cryptosporidium* je jedním z více než 300 rodů zahrnujících 4800 druhů patřících do kmene Apicomplexa. Všichni zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou intracelulární paraziti.

Vzhledem k podobnosti vývojového cyklu byly dříve kryptosporidie řazeny ke kokcidiím (Corliss 1994, Fayer a kol. 1997). V současné době jsou kryptosporidie na základě fylogenetických analýz řazené do příbuznosti ke gregarinám (Carreno a kol. 1999). Nicméně na základě dnešních znalostí není možné určit, zda se kryptosporidie z gregarin vyvinuly nebo jsou jejich sesterskou skupinou (Leander a kol. 2003). Jejich společným znakem je morfologická stavba organel sloužících k přichycení k hostitelské buňce (Valigurová a kol. 2007). K přichycení používají kryptosporidie apikální orgány (rhoptrie, mikronemy, denzní granula) a všechna jejich endogenní stádia jsou uzavřena v parazitoformní vakuole, která tento rod odlišuje od ostatních rodů z kmene Apikomplexa (Valigurová a kol. 2008).

### 1.2. Historie

Roku 1907 popsal Ernest Edward Tyzzer prvoka parazitujícího v buňkách žaludečního epitelu laboratorní myši (*Mus musculus*) a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). O pět let později popsal ještě další druh v tenkém střevě laboratorní myši a nazval ho *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). Je zřejmé, že každý druh a genotyp má individuální vlastnosti, které se liší od ostatních. To je důležité mít na paměti při posuzování informací z velké části založených na jednom nebo několika málo druzích. Nicméně je třeba uvést na pravou míru „skutečnou“ identitu druhu *C. parvum*. Tento druh byl sice Tyzzerem popsán v roce 1912, ale popsal parazita infikujícího běžné laboratorní myši a prokázal experimentální přenos infekce na dospělé myši, zatímco dnešní *C. parvum*, izolované převážně z telat, je na základě velkého množství experimentálních infekcí považováno pro dospělé myši za velmi málo infekční nebo neinfekční. V roce 2012 byl popsán nový druh

kryptosporidie, *Cryptosporidium tyzzeri*, který je hostitelsky specifický pro myši (Ren a kol. 2012). Příslušnost Tyzzerova *C. parvum* k současnému *C. tyzzeri* či jinému druhu nebo genotypu kryptosporidií nemůže být zpětně ověřena, neboť se nedochoval žádný referenční materiál.

### 1.3 Hostitelská specifita

Přirozená hostitelská specifita je jedním ze základních znaků odlišujících od sebe jednotlivé druhy kryptosporidií (Xiao a Ryan 2004a).

V rámci rodu *Cryptosporidium* rozlišujeme dvě výrazné, morfologicky odlišné skupiny - první má menší, kulaté oocysty a afinitu ke střevu - k enterocytům (př. *C. parvum*  $5 \times 4,5 \mu\text{m}$ , *C. bovis*, *C. canis*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. scophthalmi*, *C. suis*, *C. wrairi*, *C. meleagridis*, *C. bailey*, *C. varanii*), druhá má oocysty větší, oválné a afinitu k žaludečním žlázám (př. *C. andersoni*  $8,4 \times 6,2 \mu\text{m}$ , *C. muris*, *C. galli*, *C. serpentis*, *C. molnari*). Primárně infikují buňky gastrointestinálního traktu celé řady obratlovců včetně člověka (Tyzzer 1912, Lindsay a kol. 2000, Xiao 2010). Například u savců byly popsány žaludeční kryptosporidie *C. muris* a *C. andersoni* s řadou kmenů, které se liší svojí hostitelskou specifitou (Morgan a kol. 2000, Xiao a Ryan 2004a, Kváč a kol. 2008a). V současné době je uznáváno 28 platných druhů rodu *Cryptosporidium* (Šlapeta 2012) (Tabulka 1.) na podkladě hostitelské specifity, molekulárních rozdílů, morfologie oocyst a lokalizace vývojového cyklu. V rámci rodu lze obecně odlišit druhy s různou hostitelskou specifitou. Zatímco některé druhy kryptosporidií se vyznačují širokou hostitelskou specifitou a mohou nakazit velké množství hostitelů napříč řády (*C. parvum*, *C. ubiquitum*), jiné se omezují pouze na skupiny hostitelů, jako jsou hlodavci nebo přežvýkavci (*C. muris* a *C. andersoni*) (Fayer a Xiao 2008b). Primárním místem infekce *C. hominis* a *C. parvum* je tenké střevo. U některých zvířat, jako jsou myši a telata, je predilekčním místem *C. parvum* ileum a caecum. Kryptosporidie mohou infikovat další extraintestinální orgány (Fleta a kol. 1995). Žaludeční kryptosporidie jako je *C. muris* a *C. andersoni* infikují žaludeční sliznici a pozřené oocysty excystují už v žaludku. *Cryptosporidium baileyi* u kuřat je nacházena v kloace.

Obecně se předpokládá, že většina kryptosporidií je úzce hostitelsky specifických (Xiao a Ryan 2004a).

**Tabulka 1.** Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*

<b>DRUH</b>	<b>HOSTITEL</b>	<b>LOKALIZACE</b>
<i>C. andersoni</i> Lindsay a kol., 2000	skot	slez
<i>C. baileyi</i> Current a kol., 1986a	drůbež	bursa Fabricii
<i>C. bovis</i> Fayer a kol., 2005	skot	tenké střevo
<i>C. canis</i> Fayer a kol., 2001	psi	tenké střevo
<i>C. cichlidis</i> Paperna a kol., 1996	ryby	žaludek
<i>C. cuniculus</i> Robinson a kol., 2010	králíci	tenké střevo
<i>C. ducismarci</i> Traversa, 2010	plazi	střevo
<i>C. fayeri</i> Ryan a kol., 2008	klokani	střevo
<i>C. felis</i> Iseki, 1979	kočky	tenké střevo
<i>C. fragile</i> Jirků a kol., 2008	obojživelníci	žaludek
<i>C. galli</i> Pavlásek, 1999	ptáci	žláznatý žaludek
<i>C. hominis</i> Morgan-Ryan a kol., 2002	člověk	tenké střevo
<i>C. macropodum</i> Power a Ryan, 2008	klokani	střevo
<i>C. meleagridis</i> Slavin, 1955	ptáci	tenké střevo
<i>C. molnari</i> Alvarez-Pellitero a Sitjá-Bonadilla, 2002	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. muris</i> Tyzzer, 1907	hlodavci	žaludek
<i>C. natoris</i> Hoover a kol., 1981	ryby	střevo
<i>C. parvum</i> Tyzzer, 1912	savci	tenké střevo
<i>C. reichenbachklinkei</i> Paperna a kol., 1996	ryby	žaludek
<i>C. ryanae</i> Fayer a kol., 2008a	skot	střevo
<i>C. scophthalmi</i> Alvarez-Pellitero a kol., 2004	platýs	střevo
<i>C. serpentis</i> Levine, 1980	plazi	žaludek
<i>C. suis</i> Ryan a kol., 2004	prasata	žaludek, tlusté střevo
<i>C. tyzzeri</i> Ren a kol., 2012	myši	tenké střevo
<i>C. ubiquitousum</i> Fayer a kol., 2010	skot	střevo
<i>C. varanii</i> Pavlásek a kol., 1995	plazi	žaludek, tenké střevo
<i>C. wrairi</i> Vetterling a kol., 1971	morčata	tenké střevo
<i>C. xiaoi</i> Fayer a Santín, 2009	ovce	střevo

#### 1.4 Kryptosporidie a kryptosporidióza nespecifických hostitelů

Hostitelské spektrum, respektive hostitelská specifita parazita představuje soubor hostitelů, které je daný parazit schopen infikovat a ukončit v nich vývojový cyklus. Pro ověření hostitelského spektra jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií se používají

oocysty získané z jednoho přirozeně infikovaného hostitele a jejich experimentální přenos na další hostitelské druhy. V případě, že je v novém hostiteli dokončen vývojový cyklus a oocysty vylučované do prostředí jsou geneticky totožné s těmi, které byly použity pro infekci, je hostitelské spektrum daného druhu/genotypu rozšířeno. Obecně se předpokládá, že izoláty kryptosporidií z jedné třídy obratlovců nejsou infekční pro jiné hostitele z dalších tříd a také, že většina druhů a genotypů kryptosporidií má nízkou hostitelskou specifitu. Nicméně existuje celá řada případů, kdy byla prokázána přítomnost oocyst, respektive specifické kryptosporidiové DNA v trusu celé řady tzv. netypických hostitelů (Fayer 2008b).

U řady druhů kryptosporidií, zejména pak u genotypů je/byl znám pouze jediný hostitel. Například druh *C. wrairi* byl po dlouhou dobu považován za přísně hostitelsky specifický druh, infikující pouze morčata (Graczyk a kol. 1997), avšak v roce 2007 byl tento druh detekován u skotu a člověka (Azami a kol. 2007). *Cryptosporidium meleagridis* původně popsán u krocana (Xiao a Ryan 2004a), byl rozpoznán jako nový lidský patogen, který je odpovědný za téměř 1 % všech infekcí v Anglii (Pedraza-Diaz a kol. 2001, Leoni a kol. 2006), a asi 10 % v Peru, kde je jeho výskyt stejně vysoký jako u *C. parvum* (Cama a kol. 2003). *Cryptosporidium muris* infikuje primárně hlodavce, a také širokou škálu dalších hostitelů včetně damanů, velbloudů, horských koz, žiraf, prasat, tuleňů, lidí a opic (Gatei a kol. 2002, Xiao a Ryan 2004a, Kváč 2009a).

Kromě toho byly hlášeny experimentální infekce *C. muris* u psů, králíků, jehňat a koček (Iseki a kol. 1989, Kváč a kol. 2008b). V České republice, v parazitologické laboratoři Státního veterinárního ústavu v Praze, byla hlášena vůbec první zpráva o přirozené infekci *C. muris* u kočky. Do té doby se myslelo, že kočka může být nakažena jen *C. felis* (Pavlásek 2005, Pavlásek a Ryan 2007). Oocysty *C. muris* byly nalezeny také v trusu žáby rohatky ozdobné (*Ceratophrys ornata*) (Crawshaw a Mehren 1987), užovky červené a užovky černé (*Elaphe guttata*, *Elaphe obsoleta*) a u hroznýše královského (*Boa constrictor*) (Xiao a kol. 2004c). Objevily se také zprávy o oocystách *C. muris* a *C. andersoni* ve výkalech lelkouna sovího (*Podargus strigoides*) a koroptve korunkaté (*Rollulus rouloul*) (Ng a kol. 2006). Některé případy kryptosporidiózy byly popsány u dravých ptáků v zajetí. Roku 2010 byla prvně popsána *C. baileyi* u divokého

výrečka malého (*Otus scops*) (Molina-Lopez a kol. 2010). *Cryptosporidium muris* a *C. tyzzeri* byly detekovány také ve výkalech prasat v České republice (Kváč a kol. 2009b,c) a v Číně (Chen a Huang 2007). U ryb existují dva uznávané druhy a to *C. molnari* u mořana zlatého a morčáka evropského (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*) a *Cryptosporidium scophthalmi* u kambaly velké (*Psetta maxima*) (Alvarez-Pellitero a Sitja-Bodadilla 2002, Alvarez-Pellitero a kol. 2004), avšak u hostitelů ježdíkovce pruhovaného (*Sillago vittata*) a cípala hlavatého (*Mugil cephalus*) byly identifikovány další druhy kryptosporidií: *C. parvum*, *C. xiaoi* a *Cryptosporidium pig* genotype II. Pro *C. andersoni* je typickým hostitelem dobytek (*Bos taurus*), ale *C. andersoni* může také infikovat velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*), sviště stepního (*Marmota bobac*) či zubra (*Bison bonasus*) (Ryan a kol. 2003, Kváč a kol. 2004).

Tento výčet nescifických hostitelů je v rozporu se současným pohledem na hostitelskou specifitu kryptosporidií, kdy se předpokládá, že jednotlivé druhy a genotypy jsou více méně hostitelsky specifické, vyjma *C. parvum* (Xiao a kol. 2004c).

Na základě těchto zjištění, lze předpokládat, že 1) i ostatní druhy či genotypy, u kterých je znám pouze jeden jediný hostitel, budou mít širší hostitelské spektrum než je dosud známo nebo 2) detekce různých druhů a genotypů kryptosporidií v nescifických hostitelích je pouhou pasáží oocyst zaživacím traktem hostitele. Vzhledem k tomu, že většina zmíněných popisů je založena pouze na molekulární detekci DNA získané v průběhu epidemiologických studií, neexistují až na výjimky experimentální studie důkazy, potvrzující rozšíření hostitelského spektra příslušné kryptosporidie. Otázka, zda přítomnost specifické kryptosporidiové DNA nebo oocyst v trusu je nezvratným důkazem o probíhajícím vývojovém cyklu parazita v hostiteli není dodnes jasně vyřešena.

## 1.5 Vývojový cyklus

Životní cyklus kryptosporidií je kompletně ukončen v jednom hostiteli, je tedy monoxenní (Okhuysen 1999, Thompson a kol. 2005), a jejich exogenní infekční vývojová stádia - oocysty, jsou většinou vylučovány výkaly. Výjimkou jsou kryptosporidie z dýchacího traktu (př. *C. baileyi*), které infikují ptáky a jejich oocysty

opouští tělo dýchacími cestami nebo nosním sekretem (Current a Reese 1986b). Oocysty kryptosporidií excystují v gastrointestinálním nebo respiračním traktu uvolněním čtyř pohyblivých, infekčních sporozoitů skrz spojnicí ve stěně oocysty (Reduker a kol. 1985a). Proces excystace je ovlivněn řadou faktorů, jako jsou teplota a pH (Hijjawi a kol. 2001). K dalším mohou patřit ještě oxid uhličitý, pankreatické enzymy a žlučové soli (Fayer a Leek 1984, Reduker a Speer 1985b, Robertson a kol. 1993). Infekční cyklus začíná ve chvíli, kdy oocysty pozře nový hostitel potravou, kontaminovanou vodou či inhalací. K přichycení na hostitelskou buňku slouží kryptosporidiím apikální komplex, což je soubor několika organel na předním pólu stádií životního cyklu, která vnikají částečně či úplně do buněk hostitele (sporozoiti, merozoiti). Do apikálních organel patří kyjovité rhoptrie, početné vláskovité mikronémy a v buňce rozptýlná denzní granula, která jsou neprůhledná v elektronovém mikroskopu (Volf a kol. 2007, Valigurová a kol. 2008).

Sporulované oocysty, jež jsou známy pouze v exogenní fázi, obsahující 4 sporozoity, jsou při defekaci uvolněny z infekčního hostitele do prostředí. Skládají se z třívrstevné stěny s průměrnou tloušťkou 49 nm (Harris a Petry 1999), která obklopuje a udržuje životaschopnost 4 vnitřních sporozoitů při nepříznivých podmínkách prostředí. Komplex ochranné bariéry je složen z proteino-lipido-sacharidového matrix (Fayer 2008b). Tito sporozoiti jsou zdrojem nové infekce.

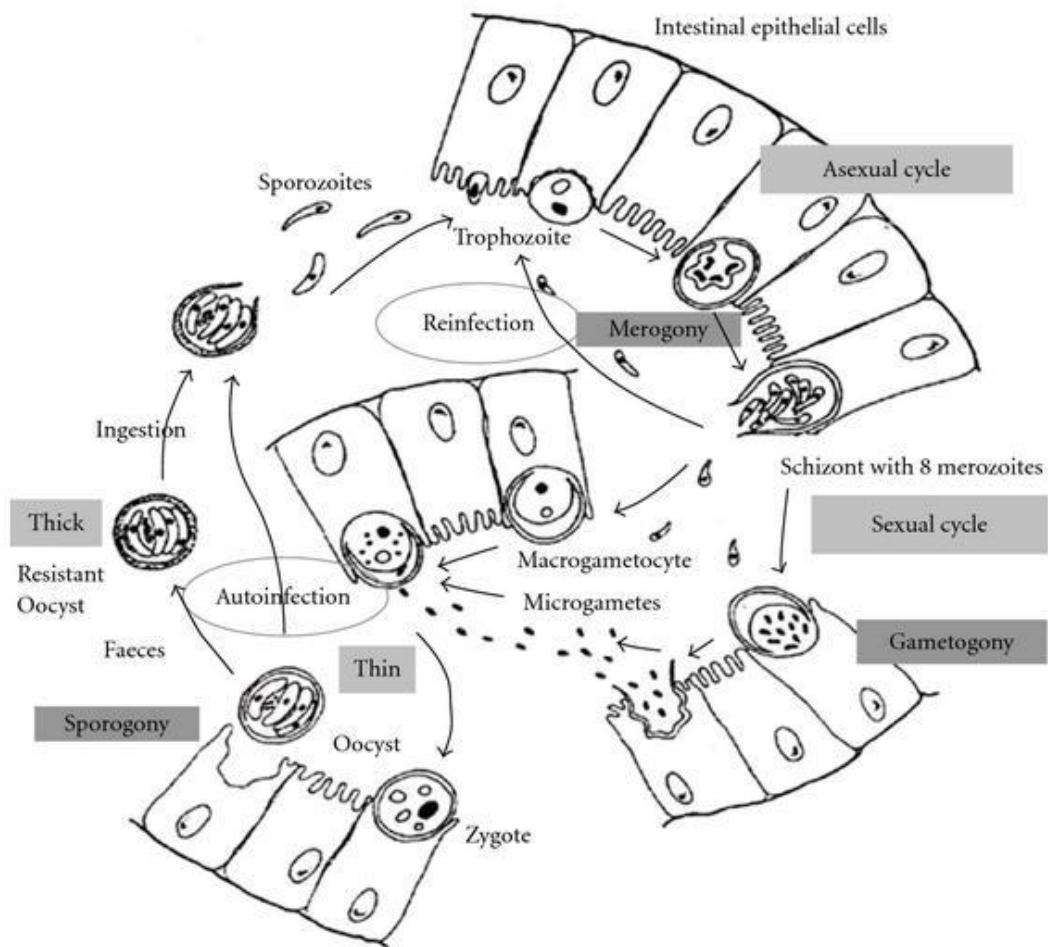
Endogenní fáze začíná požitím oocyst vhodným hostitelem. Jakmile je oocysta uvnitř těla, prvním krokem k infekci je excystace – otevření oocysty podél švu na jednom jejím pólu, jehož prostřednictvím ji mohou opustit 4 infekční sporozoiti.

Sporozoiti, kteří excystují z oocysty, jsou pohybliví, infikují cílové buňky střevního epitelu (Wetzel a kol. 2005), kde tvoří vývojová stádia - trofozoity, uzavřené v parazitoformním vaku. Tato stádia dále prodělávají merogonii (schizogonii) - asexuální, proliferační dělení, jehož výsledkem je rozdělení jádra trofozoita a vznikají 3 typy merontů u *C. baileyi* a 2 typy merontů u *C. parvum*. Podle stávajícího vývojového modelu *C. parvum* máme dva vývojově odlišné druhy merontů a to jsou meront I. typu a meront II. typu, oba produkující merozoity (nepohlavně vzniklé stadium vývoje), kteří jsou morfologicky podobní sporozoitům (Bjorneby 1990). Meronti I. typu uvolňují až 8



merozoitů, jež pak napadají sousední enterocyty. Meronti II. typu podstupují buněčné dělení a výsledkem jsou 4 merozoity, ze kterých se vyvíjí nediferencovaná stádia – gamonti, každý schopný infikovat další enterocyty. Ti se nakonec diferencují na sexuální reprodukční stádia- mikrogamonty a makrogamonty. Až 16 mikrogamontů se vyvíjí uvnitř jednoho makrogamontu. Nebičíkaté, vícejaderné mikrogamonty tvoří mikrogametocyty, které jsou lokalizovány prostřednictvím neznámého mechanismu a nakonec oplodní jednojadernou makrogamontu, která dále vytváří makrogametocyty, což má za výsledek pouze jednu diploidní fázi vývoje. Z mikrogametocytů vznikají pohyblivé mikrogamety, jež migrují, oplodňují makrogamety, které vznikly přeměnou makrogametocytů a výsledkem je diploidní zygota, která podstupuje proces podobný meióze (dělí se sporogonií), následkem čehož jsou 4 haploidní sporozoiti v jedné oocystě (sporulace oocyst). Ze zygoty se tvoří dva výsledné typy oocyst, a to buď tenkostěnné, nebo silnostěnné. Silnostěnné oocysty odcházejí z těla hostitele ven s trusem a vyčkávají, než je v potravě přijme jiný hostitel, zatímco tenkostěnné oocysty excystují ve střevě a proces autoinfekce může znovu začít uvolněním infekčních sporozoitů (Tyzzer 1910, Current 1986a, Current 1988, O'Hara a Chen 2011).

Obecně platí, že ukončení tohoto životního cyklu v buněčné kultuře se těžko prokazuje, což zabraňuje nepřetržité pasáži a brání in vitro analýzám v několika fázích životního cyklu. V posledních letech bylo hlášeno, že k šíření *C. parvum* může docházet extracelulárně (Hijjawi a kol. 2004) podobným způsobem jako u gregarin.



**Obrázek 1.** Životní cyklus kryptosporidií v enterocytech (Putignani a Menichella 2010).

### 1.6 Prepatentní a patentní perioda

Prepatentní perioda je nejkratší čas po požití infekční oocysty, endogenní životní cyklus byl dokončen a první nově vyvinuté oocysty byly vyloučeny. Tato doba se mění s hostitelem a druhem kryptosporidií stejně, jako infekční dávka. Experimentálně stanovená prepatentní perioda se pohybuje u *C. parvum* u lidí od 4 – 22 dnů (DuPont a kol. 1995), od 2 do 9 dní pro *C. suis* u prasat (Enemark a kol. 2003), od 10 do 12 dní pro *C. bovis* u skotu (Fayer a kol. 2005).

Patentní doba je doba trvání infekce a většinou bývá charakterizována ode dne vylučování oocyst. Experimentálně určené patentní období se pohybuje od 1 do 20 dnů pro *C. parvum* u lidí, 9 až 15 dní pro *C. suis* u prasat, 18 dní pro *C. bovis* u skotu.

### 1.7 Průběh a projevy kryptosporidiózy

Onemocnění, které způsobují kryptosporidie, je nazýváno kryptosporidióza. Ta je vážným problémem veřejného zdraví v rozvojových i rozvinutých zemích (Checkley 1998). Obecně je charakterizována těžkými vodnatými, nekrvavými průjmy a u jinak zdravých jedinců je často doprovázena žaludečními nevolnostmi (Fayer 2004). Závažnost a trvání infekcí patogenními druhy jsou také ovlivněny imunitním stavem infikované osoby nebo zvířete (Fayer a kol. 2008a).

Hlavním místem infekce je tenké střevo (jejunum a ileum) a žláznatý žaludek, i když parazit se může rozšířit po celém gastrointestinálním a respiračním traktu. Infekce hostitelských buněk vede ke ztrátě povrchového epitelu, což způsobuje narušení klků a jejich atrofii, a to nakonec vede ke smrti enterocytů (Farthing 2000), zhoršení transportu živin a elektrolytů. Poškození tkáně vyvolává imunologickou zánětlivou odpověď hostitele, navozuje indukci prostaglandinů, které vylučují prozánětlivé buňky. Prostaglandiny zase stimulují sekreci chloridových iontů a inhibují absorpci NaCl. V důsledku narušení střevní absorpce tekutin a živin a narušení normálního toku iontů dochází k průjmu. Extra-gastrointestinální kryptosporidióza byla zaznamenána u imunokompetentních i imunodeficitních jedinců, kde ovlivňovala funkci slinivky, jater a žlučvodů. V závažných případech bývá popisováno tracheo-bronchiální postižení a zánět dutin. Přesné patogenní mechanismy kryptosporidiózy nebyly dosud plně objasněny, ačkoliv pokusy prováděné *in vitro* nasvědčují, že se procesu mohou účastnit enterotoxiny (Guarino a kol. 1995, Carmena 2010). K přenosu dochází fekálně-orální cestou, obvykle spojenou se špatnou hygienou, kdy výkaly, které obsahují infekční oocysty, mohou být spolknuty vnímavým hostitelem. Voda a jídlo jsou nejčastějším zdrojem přenosu, ačkoliv důležitým zdrojem infekce je i přímý kontakt člověka s člověkem nebo zvířetem. Nejvíce ohroženy jsou imunodeficitní osoby (tj. osoby s AIDS, pacienti s rakovinou, velmi mladé nebo staré osoby). Kryptosporidióza

způsobuje značnou sociálně-ekonomickou zátěž v rozvojových zemích a vzhledem k tomu byla v roce 2004 zahrnuta Světovou zdravotnickou organizací jako opomíjené onemocnění (World Health Organization's Neglected Disease Initiative) (Savioli 2006).

### **1.8 Prevence a léčba**

Protože všechny infekce kryptosporidii zahrnují požití nebo vdechnutí oocyst, opatření k zabránění nebo snížení infekce musí být zaměřeno na odstranění nebo šíření infekčních oocyst z kontaminovaného prostředí. V lidské populaci se snažíme minimalizovat přenos z osoby na osobu pomocí dezinfekčních prostředků v domácích i institučních zařízeních a efektivně jednat při kontaminaci vody hlavně v rekreačních zařízeních.

Neexistují žádné všeobecně účinné léky pro profylaxi nebo terapii pro lidi či zvířata, které by zabránily nebo zastavily produkci oocyst infikovanými jedinci. Hygiena, včetně dezinfekce zůstává neúčinnějším nástrojem preventivní péče. Chceme-li zjistit účinnost nějakého prostředku proti oocystám, musíme nejprve stanovit životaschopnost a infekčnost oocyst po léčbě (Fayer a kol. 2008a). Na zmírnění průjmu lze využít kaolin, pektin či loperamid. U pacientů s AIDS se využívá antiretrovirová terapie. Tato podpurná léčba redukuje počet vyloučených oocyst a zlepšuje gastrointestinální klinické příznaky (Thompson a kol. 2005). Další léky, které se dají použít jsou např. paramomycin, azithromycin, nitazoxanid, jejich výsledky ale nejsou zcela uspokojivé. Lze použít i imunoterapii, kdy je podáváno hyperimunitní bovinní kolostrum obsahující protilátky proti *C. parvum* (Ramirez a kol. 2004). Tato léčba ale může vyvolat křeče a zvracení, což je pravděpodobně způsobeno rozdílem imunitních protilátek a střevní fyziologií jednotlivých pacientů (Thompson a kol. 2005).

## 2. CÍLE PRÁCE

Pomocí série experimentálních infekcí provedených na vnímavých a nevnímavých hostitelích ke kryptosporidiové infekci prokázat jednu z následujících hypotéz:

**Hypotéza 1:** Detekcí specifické kryptosporidiové DNA v vzorcích stolice nebo trusu nelze jednoznačně posoudit, zda se jedná o probíhající infekci v hostiteli nebo o pasáž oocyst zaživacím traktem.

**Hypotéza 2:** Specifickou kryptosporidiovou DNA v klinických vzorcích stolice nebo trusu lze detekovat pouze v případě úspěšné infekce hostitele.

### 3. MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 Paraziti

- *Cryptosporidium muris* HZ206 – izolát získaný z divoké myši domácí východoevropské (*Mus musculus musculus*). Oocysty z přirozeně infikované myši jsou dlouhodobě pasážovány v laboratorních podmínkách přes vnímavého hostitele: krysa malá (*Mastomys coucha*).
- *Cryptosporidium muris* TS03 – izolát získán z přirozeně infikovaného hlodouna východoafrického (*Tachyorectes splendens*). Izolát je udržován v laboratorních podmínkách přes vnímavého hostitele: krysa malá (*Mastomys coucha*).
- *Cryptosporidium parvum* HA1 – izolát získaný z přirozeně infikovaného 1,5 měsíců starého telete plemene Hereford. Oocysty jsou dlouhodobě pasážovány v laboratorních podmínkách ve SCID myších (kmen BALB/c-*Igh<sup>b</sup> scid*, C.B-17 *scid*; Charles River, Germany).
- *Cryptosporidium tyzzeri* HZ117– izolát získaný z divoké myši domácí západoevropské (*Mus musculus domesticus*). Oocysty z přirozeně infikované myši jsou dlouhodobě pasážovány v laboratorních podmínkách ve SCID myších.

##### 3.1.2 Zvířata použitá pro experiment

- myši BALB/c: kmen BALB/cJ (Charles River, Germany)
- myši SCID: kmen BALB/c-*Igh<sup>b</sup> scid*, C.B-17 *scid* (Charles River, Germany); v současné době dlouhodobě udržováno v chovech PaÚ BC AVČR, v.v.i.)
- krysa malá (*Mastomys coucha*; vlastní chovy PaÚ BC AVČR, v.v.i.)

##### 3.1.3 Chovatelské podmínky

Zvířata byla chována ve sterilním prostředí v individuálně ventilovaných chovných nádobách (IVC, Air Handling Solutions, Tecnoplast, Italy) vždy po 5 zvířatech v jedné chovné nádobě při teplotě 21 °C, vlhkosti 50 % a dvanáctihodinovém denním režimu:

12 h světlo a 12 h tma. Výměna sterilní podestýlky (Geschäftsbereich Tierhygiene, Germany) byla prováděna ob den. Všechna zvířata byla krmena sterilní komerční směsí (Top-Velaz, ČR) a napájena sterilní vodou *ad libitum*.

## 3.2 Metodika

### 3.2.1 Sběr parazitů a jejich příprava na purifikaci

Trus experimentálně infikovaných vnímavých hostitelů (viz 3.1.2) sloužících k pomnožování používaných izolátů kryptosporidií byl pravidelně sbírán tak, aby pro infekci experimentálních zvířat byly použity oocysty ne starší víc než jeden měsíc. Trus byl až do purifikace skladován při 4 °C v nadbytku 2,5% dichromanu draselného ( $\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$ ). Nasbíraný trus byl dán do třecí misky a důkladně homogenizován s nadbytkem deionizované vody ( $\text{dH}_2\text{O}$ ). Homogenát trusu byl zbaven hrubých nečistot přecezením přes soustavu sítok s velikostí ok 0,1mm a centrifugován při 1500 g po dobu 15 min. Sediment byl 5× opakovaně ředěn nadbytkem vody a centrifugován, aby došlo k odstranění dichromanu draselného z roztoku. Výsledný sediment byl resuspendován v PBS (phosphate buffered saline). Takto vzniklá suspenze byla použita pro purifikaci oocyst pomocí sacharózového gradientu (3.2.2.1).

### 3.2.2 Purifikace oocyst

#### 3.2.2.1 Sacharózový gradient (Arrowood a Sterling 1987)

*Chemikálie:*

- Sheaterův cukerný roztok (259 ml deionizované vody ( $\text{dH}_2\text{O}$ ), 405 g cukru, 7,29 g fenolu)
- 1% PBS TWEEN (do 1 l PBS přidat 0,5 ml Tween 20)
- PBS (phosphate buffered saline) 1 l  $\text{dH}_2\text{O}$ , 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ , 2,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- $\text{dH}_2\text{O}$

Z těchto zásobních roztoků byly připraveny dva pracovní roztoky:

- pracovní Sheaterův roztok 1+2 (1 díl Sheater+ 2 díly PBS Tween)
- pracovní Sheaterův roztok 1+4 (1 díl Sheater+ 4 díly PBS Tween)

*Pracovní postup:*

Do 4 skleněných zkumavek byl navrstven sacharózový gradient (vrstva 30 ml Sheater 1+2 a 30 ml Sheater 1+4) a 15 ml homogenátu vzorku v PBS (3.2.1), centrifugováno 20 min při 1370 g, 4 °C. Supernatant byl přenesen do čistých zkumavek doplněn dH<sub>2</sub>O a centrifugován 20 min při 1370 g, 4 °C. Tento promývací krok byl opakován ještě dvakrát. Oocysty byly uchovávány v PBS při 4 °C.

### **3.2.2.2 Cesium chloridový gradient**

*Chemikálie:*

- roztok cesium chloridu: 21,07 g CsCl + 100ml dH<sub>2</sub>O
- 10× ředěný PBS (pH 7,2)

*Pracovní postup:*

Suspenze přečištěných oocyst na sacharózovém gradientu (3.2.2.1) byla centrifugována 10 min při 1450 g, 4 °C a poté převedena do PBS. Do mikrozkušavky byl napipetován 1 ml CsCl, převrstven 0,5 ml roztoku oocyst v PBS a centrifugován 3 min při 16 000 g, 4 °C. Prsteneček mezi roztoky CsCl a PBS obsahující oocysty byl odebrán a naředěn nadbytkem PBS a opět centrifugována 3 min při 16 000 g, 4 °C. Poté byl vzorek ještě 2× promyt a centrifugován v nadbytku PBS stejným postupem pro odstranění zbytků roztoku CsCl. Oocysty byly uchovávány v dH<sub>2</sub>O při 4 °C.

### **3.2.3 Zjištění koncentrace oocyst**

Celkem 10 µl čisté suspenze oocyst bylo napipetováno do Bürkerovy komůrky a spočítáno celkové množství oocyst ve 25 středních čtvercích. Počítány byly oocysty, které se dotýkaly levé strany čtverce, spodního okraje čtverce a všechny uvnitř čtverce, naopak oocysty, které se dotýkaly pravého a horního kraje čtverce nebyly počítány. Vynásobením počtu oocyst 10<sup>4</sup> byl získán počet oocyst v 1 ml roztoku.



### **3.2.4 Test životaschopnosti oocyst**

Chemikálie:

- propidium jodid (PI, 1 mg/1 ml 0,1 M PBS)

*Pracovní postup:*

Ke 100  $\mu$ l suspenze přečištěných oocyst (počet oocyst  $1 \times 10^6$ ) bylo přidáno 10  $\mu$ l zásobního roztoku PI. Směs byla promíchána a poté 30 min barvena ve tmě při laboratorní teplotě. Následně byla centrifugována 3 min při 16 000 g, 20 °C. Vzorek byl nakonec promyt ještě 2 $\times$  v nadbytku dH<sub>2</sub>O centrifugací stejným postupem. Oocysty byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem s filtrem o vlnové délce 590 nm a zvětšením 40 $\times$  (Olympus IX 70). Takto zjištěná životaschopnost byla využita pro spočítání skutečného množství oocyst použitelných pro infekci experimentálních zvířat.

### **3.2.5 Design experimentů**

#### **3.2.5.1 Infekční dávka**

Všechna experimentální zvířata použitá v následujících pokusech byla perorálně infikována jícní sondou dávkou  $1 \times 10^6$  purifikovaných životaschopných oocyst ve 200  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O (3.2.2, 3.2.3, 3.2.4). Každé zvíře sloužící jako negativní kontrola bylo perorálně inokulováno 200  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O.

#### **3.2.5.2 Kontrolní zvířata**

Tři krysy malé nebo SCID myši sloužící jako negativní kontrola byly inokulovány dH<sub>2</sub>O a sledovány po celou dobu experimentu na přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu pomocí specifického barvení dle Miláčka a Vítovce (1985) (3.2.6.1). Na konci každého experimentu byla všechna kontrolní zvířata usmrcena cervikální dislokací šíje a vyšetřena na přítomnost oocyst a specifickou DNA kryptosporidií shodnými metodami jako experimentálně infikovaní jedinci.

### **3.2.5.3 Průběh infekce u hostitelů infikovaných žaludečnými kryptosporidii**

#### **3.2.5.3.1 Odběr biologického materiálu**

Po infekci bylo vždy utraceno jedno zvíře v následujících intervalech: 1 h, 3h, 6 h, 12 h, 24 h a dále každých 24 h až do konce experimentu. Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací šíje.

Okamžitě po usmrcení byla provedena pitva zvířete a byl odebrán vzorek sliznice žaludku, obsah žaludku, sliznice duodena a vzorek trusu pro PCR analýzu (3.2.7.3) a obsah žaludku, obsah duodena a trus pro detekci oocyst pomocí specifického barvení dle Miláčka a Vítovce (3.2.6.1).

#### **3.2.5.3.2 Detekce *Cryptosporidium muris* HZ206 v průběhu prepatentní periody u dospělých krys malých**

Pro experiment č. 1 bylo použito celkem 27 dospělých krys malých. Všechna zvířata byla perorálně nakažena dávkou  $1 \times 10^6$  životaschopných, purifikovaných (3.2.2) oocyst *C. muris* HZ206. Průběh infekce byl sledován po dobu 20 DPI. Jako kontrolní zvířata byly použity krysy malé.

#### **3.2.5.3.3 Detekce *Cryptosporidium muris* TS03 v průběhu prepatentní periody dospělých krys malých**

Pro experiment č. 2 bylo použito celkem 27 dospělých krys malých. Všechna zvířata byla perorálně infikována dávkou  $1 \times 10^6$  životaschopných, purifikovaných (3.2.2) oocyst *C. muris* TS03. Průběh infekce byl sledován po dobu 20 DPI. Jako kontrolní zvířata byly použity krysy malé.

#### **3.2.5.3.4 Detekce *Cryptosporidium muris* HZ206 v průběhu prepatentní periody u dospělých SCID myši**

Pro experiment č. 3 bylo celkem použito 16 dospělých myši SCID. Všechna zvířata byla perorálně nakažena dávkou  $1 \times 10^6$  životaschopných, purifikovaných (3.2.2) oocyst

*C. muris* HZ206. Průběh infekce byl sledován po dobu 10 DPI. Jako kontrolní zvířata byly použity SCID myši.

#### **3.2.5.3.5 Detekce *Cryptosporidium muris* TS03 v průběhu prepatentní periody u dospělých SCID myší**

Pro experiment č. 4 bylo celkem použito 16 dospělých SCID myší. Všechna zvířata byla perorálně nakažena dávkou  $1 \times 10^6$  životaschopných, purifikovaných (3.2.2) oocyst *C. muris* TS03. Průběh infekce byl sledován po dobu 15 DPI. Jako kontrolní zvířata byly použity SCID myši.

#### **3.2.5.4 Průběh infekce u hostitelů infikovaných střevními kryptosporidii**

##### **3.2.5.4.1 Odběr biologického materiálu**

Po nakažení bylo vždy utraceno jedno zvíře v následujících intervalech: 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h a dále každých 24 h, výjimkou byly neonatální BALB/c myši, kdy bylo zvíře utraceno v intervalu: 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, a dále každých 12 h až do konce experimentu. Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací šíje. Ihned po usmrcení byla provedena pitva každého zvířete a byl odebrán vzorek duodena, jejuny, ilea a trusu pro PCR analýzu (3.2.7.3) a obsah duodena, jejuny, ilea a trusu pro detekci oocyst pomocí specifického barvení dle Miláčka a Vítovce (3.2.6.1).

##### **3.2.5.4.2 Detekce *Cryptosporidium parvum* HA1 v průběhu prepatentní periody u neonatálních BALB/c myší**

Pro experiment č. 5 bylo celkem použito celkem 20 neonatálních myší BALB/c. Všechna zvířata byla perorálně infikována dávkou  $1 \times 10^6$  životaschopných, purifikovaných (3.2.2) oocyst *C. parvum* HA1. Průběh infekce byl sledován po dobu 10 DPI. Jako kontrolní zvířata byl použit jeden vrh neonatálních BALB/c myší.

#### ***3.2.5.4.3 Detekce *Cryptosporidium parvum* HA1 v průběhu prepatentní periody u dospělých BALB/c myši***

Pro experiment č. 6 bylo použito celkem 5 dospělých myši BALB/c. Každé zvíře bylo po dobu tří dnů inokulováno dávkou  $1 \times 10^6$  životaschopných, purifikovaných (3.2.2) oocyst *C. parvum* HA1 v rozmezí 8 hodin (celkem 9 dávek). Při každé inokulaci byl odebrán vzorek trusu pro PCR analýzu (3.2.7.3) a trus pro detekci oocyst pomocí specifického barvení dle Miláčka a Vítovce (3.2.6.1). V tomto experimentu byla na základě předchozích výsledků sledována přítomnost oocyst kryptosporidií pouze v trusu pomocí PCR analýzy (3.2.7.3) a specifického barvení dle Miláčka a Vítovce (3.2.6.1).

#### ***3.2.5.4.4 Detekce *Cryptosporidium parvum* HA1 v průběhu prepatentní periody u dospělých SCID myši***

Pro experiment č. 7 bylo celkem použito 5 dospělých SCID myši. Všechna zvířata byla perorálně infikována dávkou  $1 \times 10^6$  životaschopných, purifikovaných (4.2.2) oocyst *C. parvum* HA1. Průběh infekce byl sledován po dobu 10 DPI. Jako kontrolní zvířata byly použity SCID myši. V tomto experimentu byla na základě předchozích výsledků sledována přítomnost oocyst kryptosporidií pouze v trusu pomocí PCR analýzy (3.2.7.3) a specifického barvení dle Miláčka a Vítovce (3.2.6.1).

#### ***3.2.5.4.5 Detekce *Cryptosporidium tyzzeri* v průběhu prepatentní periody u dospělých SCID myši***

Pro experiment č. 8 bylo celkem použito 5 dospělých SCID myši. Všechna zvířata byla perorálně infikována dávkou  $1 \times 10^6$  životaschopných, purifikovaných (3.2.2) oocyst *C. tyzzeri* HZ117. Průběh infekce byl sledován po dobu 10 DPI. Jako kontrolní zvířata byly použity SCID myši. V tomto experimentu byla na základě předchozích výsledků sledována přítomnost oocyst kryptosporidií pouze v trusu pomocí PCR analýzy (3.2.7.3) a specifického barvení dle Miláčka a Vítovce (3.2.6.1).

#### **3.2.5.4.6 Detekce *Cryptosporidium tyzzeri* v průběhu prepatentní periody u dospělých BALB/c myší**

Pro experiment č. 9 bylo celkem použito 5 dospělých BALB/c myší. Všechna zvířata byla perorálně infikována dávkou  $1 \times 10^6$  životaschopných, purifikovaných (3.2.2) oocyst *C. tyzzeri* HZ117. Průběh infekce byl sledován po dobu 10 DPI. Jako kontrolní zvířata byly použity BALB/c myši. V tomto experimentu byla na základě předchozích výsledků sledována přítomnost oocyst kryptosporidií pouze v trusu pomocí PCR analýzy (3.2.7.3) a specifického barvení dle Miláčka a Vítovce (3.2.6.1).

#### **3.2.6 Parazitologické vyšetření nasbíraného materiálu**

Obsah žaludku, duodena, jejunu, ilea a trus odebraný z rekta byl použit k určení přítomnosti oocyst *C. muris*, *C. parvum* nebo *C. tyzzeri*.

##### **3.2.6.1 Barvení dle Miláčka a Vítovce (1985)**

*Chemikálie:*

- Roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml ethanolu- EtOH, 70 ml dH<sub>2</sub>O)
- Roztok tartrazinu (1% tartrazin v 1% kyselině octové)
- 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

*Pracovní postup:*

Obsah žaludku, duodena, jejunu, ilea a trusu byl natřen na podložní sklíčko v tenké vrstvě a po zaschnutí při laboratorní teplotě fixován methanolem v plameni. Poté bylo sklíčko barveno 30 min v roztoku methylvioleti, dále opláchnuto tekoucí vodovodní vodou a diferencováno 1 min v 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, znovu opláchnuto vodou a dobarveno roztokem tartrazinu po dobu 2 min, následovalo další opláchnutí vodou, usušení sklíčka při laboratorní teplotě. Skla byla prohlédnuta mikroskopem za použití imerzního oleje a při zvětšení 1000×.

### **3.2.7 Molekulární analýzy**

Molekulární analýzou byla prokázána přítomnost specifické kryptosporidiové DNA ve sliznici, obsahu žaludku, duodena, jejunu, ilea a trusu daného druhu a izolátu použitého pro experimentální infekci.

#### **3.2.7.1 Izolace DNA z trusu**

Izolace DNA byla provedena pomocí kitu QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany)

*Chemikálie:* součástí soupravy

- ASL pufr, inhibiční EX tablety, AL pufr, AW1 a AW2 promývací pufr, proteináza K, AE eluční pufr, QIAamp kolony se sběrnými zkumavkami

*Pracovní postup:*

Do šroubovací 2 ml mikrozkušavky (BIOplastics, Landgraaf, The Netherlands) bylo odebráno cca 200 mg vyšetřovaného vzorku (trus, obsah žaludku) a byly přisypány skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm (BioSpec Products, Inc., USA). K takto připravenému vzorku byl připipetován 1 ml pufru ASL a obsah byl homogenizován pomocí vortexu 1 min. Oocysty byly rozbíjeny 1 minutu přístrojem (FastPrep® -24, M.P. Biomedicals, USA) při rychlosti 5 500 kmitů/min. Poté byly vzorky inkubovány po dobu 5 min při 70 °C v inkubačním bloku. Vzorky byly homogenizovány po dobu 15 s a centrifugovány 1 min při 16 000 g.

Maximum supernatantu bylo přeneseno do čisté mikrozkušavky a byla přidána ½ inhibiční EX tablety, vortexováno 1 min (dokonale rozpustit), inkubováno 1 min při laboratorní teplotě a centrifugováno 3 min při 16 000 g .

Veškerý supernatant byl přepipetován do nové eppendorfky, znovu centrifugován 3 min při 16 000 g. Napipetováno 15 µl proteinase k do čisté mikrozkušavky a přidáno 200 µl supernatantu a 200 µl pufru AL, homogenizováno 15 s a inkubováno 10 min při 70 °C v inkubačním bloku. Připipetováno 200 µl 96% ethanolu, homogenizováno. Lyzát byl přepipetován na QIAamp kolonu opatřenou sběrnou zkumavkou, centrifugován 1 min při 16 000 g a sběrná zkumavka byla vyprázdněna. Přidáno 500 µl

pufu AW1, centrifugováno 1 min při 16 000 g a sběrná zkumavka byla vyprázdněna. Přidáno 500 µl pufu AW2, centrifugováno 3 min při 16 000 g.

Kolona byla přenesena na čistou mikrozkušavku, napipetováno 200 µl pufu AE přímo na membránu, inkubováno 1 min při laboratorní teplotě a centrifugováno 1 min při 16 000 g. Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

### ***3.2.7.2 Izolace DNA z tkáně (DNeasy Blood and Tissue Kit)***

Izolace DNA byla provedena pomocí DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Germany).

*Chemikálie:* součástí soupravy

- ATL pufr, inhibiční EX tablety, AL pufr, AW1 a AW2 promývací pufry, proteináza K, AE eluční pufr, QIAamp kolony se sběrnými zkumavkami

*Pracovní postup:*

Do eppendorfky bylo nastříháno 10 mg tkáně a přidáno malé množství skleněných kuliček 0,5 mm (BioSpec Products, Inc., USA) a jedna velká keramická kulička (Zirconia Beads II.), připipetováno 180 µl ATL pufu a vortexováno. Následně byly oocysty a tkáň zhomogenizovány pomocí (FastPrep® -24, M.P. Biomedicals, USA) 1 min při 16 000 g, centrifugováno (Eppendorf, MANEKO, miniSpin) 10 s a připipetováno 20 µl proteinase k a inkubováno s pravidelným mícháním při 56 °C/ 1 h. Centrifugováno 10 s a připipetováno 200 µl AL pufu, zhomogenizováno a připipetováno 200 µl 96% ethanolu, homogenizováno a centrifugováno 10 s při 6 000 g. Veškerý supernatant napipetován na QIAamp kolonu opatřenou sběrnou zkumavkou byl centrifugován 1 min při 6 000 g a odstraněn odpad ze sběrné zkumavky. Připipetováno 500 µl AW1 pufu, centrifugováno 1 min při 8 000 rpm, znovu odstraněn odpad ze sběrné zkumavky. Napipetováno 500 µl AW2 pufu, centrifugováno 1 min při 16 000 g a odstraněn odpad ze sběrné zkumavky. Sběrné zkumavky byly nahrazeny novými mikrozkušavkami. Přímou na membránu kolony bylo napipetováno 200 µl AE pufu, inkubováno 1 min při laboratorní teplotě a centrifugováno 1 min při 6 000 g. Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

### 3.2.7.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro detekci specifické DNA kryptosporidií byla použita druhově specifická nested PCR amplifikující variabilní část genu SSU kódujícího rRNA malé ribozomální podjednotky s použitím setů primerů uvedených v tabulce 2. (Jiang a kol. 2005). Protokol pro amplifikaci primární a sekundární PCR je uveden v tabulce 3.

*Chemikálie:*

- PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, ČR)
- MgCl<sub>2</sub> (25mM, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- deoxyribonukleotid trifosfát (dNTPs, 10 mM, Top-Bio, ČR)
- primery forward a reverse (10 μM, Generi Biotech, ČR, Tabulka x.)
- bovinní sérový albumin (BSA, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)
- Taq polymeráza (1 U/1 μl)

**Tabulka 2.** Set primerů pro amplifikaci SSU rRNA

#### **primární reakce**

---

**reverse 5` CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3`**

---

#### **sekundární reakce**

---

**forward 5` GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3`**

**reverse 5` CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT a 3`**

---



**Tabulka 3.** PCR protokol pro amplifikaci SSU rRNA

<b>primární reakce</b>		<b>55 °C</b>	<b>sekundární reakce</b>		<b>55 °C</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-----	11,3 µl	<b>H<sub>2</sub>O</b>	-----	12,1 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1,2 µl	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1,2 µl
<b>10× buffer</b>	-----	2,0 µl	<b>10× buffer</b>	-----	2,0 µl
<b>dNTP</b>	10 mM	0,4 µl	<b>dNTP</b>	10 mM	0,4 µl
<b>forward</b>	10 µM	0,4 µl	<b>forward</b>	10 µM	0,4 µl
<b>reverse</b>	10 µM	0,4 µl	<b>reverse</b>	10 µM	0,4 µl
<b>BSA</b>	10 g/l	0,8 µl	-----	-----	0,8 µl
<b>taq</b>	1 U/1µl	0,5 µl	<b>taq</b>	1 U/1µl	0,5 µl
<b>DNA</b>	-----	3,0 µl	<b>DNA</b>	-----	3,0 µl
<b>celkem</b>	-----	<b>20,0 µl</b>	<b>celkem</b>	-----	<b>20,0 µl</b>

*Pracovní postup:*

Celkový objem jednotlivých reakčních směsí pro primární i sekundární reakci byl 20 µl. Požadované úseky SSU rRNA (cca 830 bp) byly amplifikovány v termocykleru (Bioer, P. R. China) při použití následujícího programu: počáteční denaturace 3 min při 94 °C, 35 cyklů zahrnujících denaturaci 45 s při 94 °C, annealing 45 s při 55 °C a extenze 60 s při 72 °C, a finální extenze 10 min při 72 °C. Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 3 µl primárního PCR produktu. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA vyizolovaná ze suspenze oocyst *C. andersoni* získaných z trusu tura domácího. Vzorky byly posléze vizualizovány na agarózovém gelu s přidavkem ethidium bromidu.

**3.2.7.4 Gelová elektroforéza**

Výsledné vzorky z PCR byly detekovány na 1 % agarózovém gelu s přidaným ethidium-bromidem a vizualizovány pomocí UV záření (302nm) transluminátoru (Ultra-Lum Inc, USA) a zdokumentovány (Hight Performance UV Transilluminator, Biotech, ČR)

*Chemikálie:*

- 50× TAE pufr (242 g Tris báze, 457,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,00)

- agaróza (Serva Electrophoresis, Germany)
- ethidium-bromid (EtBr, 10mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)
- 100 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc., Canada)

*Pracovní postup:*

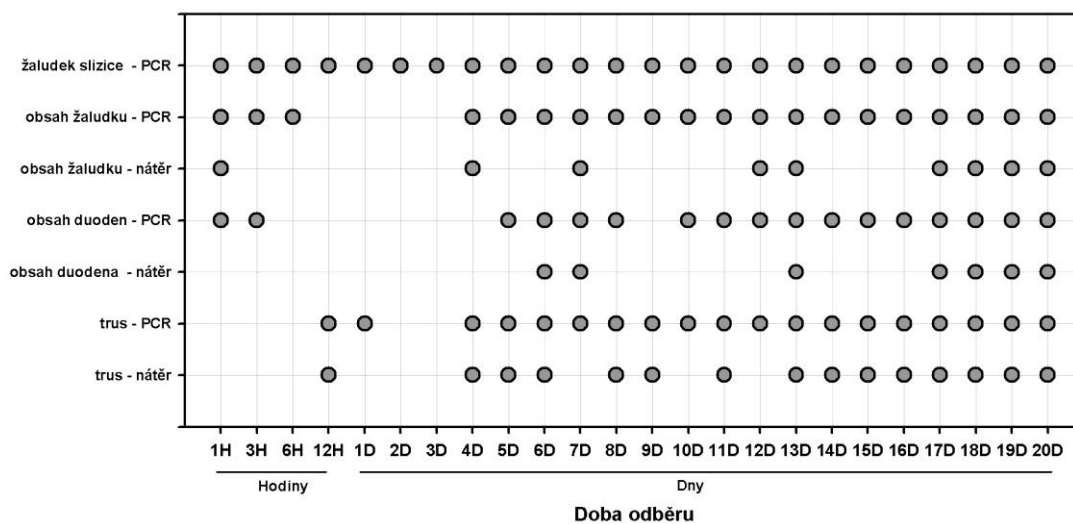
Do skleněné baňky bylo dáno 100 ml TAE pufru a přidán 1 g sacharózy. Roztok byl promíchán a dal se vařit do mikrovlnky. Uvařený gel byl ochlazen na přibližně 50 °C, byly přidány 2 µl EtBr a směs nalita do nosiče, kam se daly hřebeny a gel se nechal ztuhnout. Po vytáhnutí hřebenů byl gel vložen do elektroforetické vany, která byla naplněna TAE pufrem. Do první a poslední jamky bylo napipetováno 5 µl DNA Ladder a do každé další potom 20 µl sekundárního PCR produktu. Potom byl gel vyvíjen ve vaně až do úplné separace všech fragmentů při napětí 75 V a prohlížen pomocí UV záření na transiluminátoru.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Experimentální infekce dospělých krys malých *Cryptosporidium muris* HZ206

Experimentální infekce dospělých krys malých prokázala, že zvířata jsou vnímavá k infekci *Cryptosporidium muris* HZ206. Specifická DNA kryptosporidií, včetně záchytu oocyst v trusu infikovaných zvířat byla poprvé detekována 12-24 hodin po infekci. Nicméně prepatentní perioda tohoto izolátu v krysách malých byla 4 dny. Zatímco specifická DNA kryptosporidií různých vývojových stádií izolátu HZ206 byla ve sliznici žaludku zachycena pomocí PCR již od 1 h po infekci a následně po celou dobu trvání experimentu, v obsahu žaludku byly oocysty, respektive specifická DNA detekovány pouze v prvních 12 hodinách po infekci a následně od 4 DPI, kdy bylo prokázáno kontinuální vylučování oocyst v trusu hostitele. Záchyt oocyst nebo specifické DNA v tenkém střevě hostitelů byl do 4 DPI sporadický a od začátku patentní periody kontinuální s výjimkou 9 dne (Graf 1.).

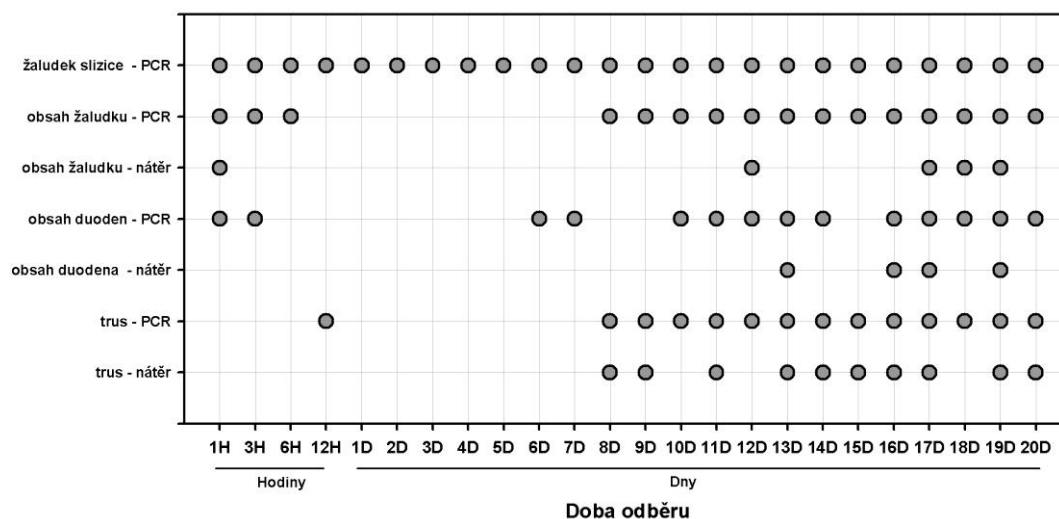
**Graf 1.** Detekce *Cryptosporidium muris* HZ206 u dospělých krys malých v průběhu prepatentní a patentní periody



## 4.2 Experimentální infekce dospělých krys malých *Cryptosporidium muris* TS03

Experimentální infekce dospělých krys malých prokázala, že zvířata jsou vnímavá k infekci *Cryptosporidium muris* TS03. Specifická DNA kryptosporidií v trusu infikovaných zvířat byla poprvé detekována 12 hodin po infekci. Nicméně prepatentní perioda tohoto izolátu v krysách malých byla 8 dní. Zatímco specifická DNA kryptosporidií různých vývojových stádií izolátu TS03 byla ve sliznici žaludku zachycena pomocí PCR již 1 h po infekci a následně po celou dobu trvání experimentu, v obsahu žaludku byly oocysty, respektive specifická DNA detekovány pouze v prvních 6 hodinách po infekci a následně od 8 DPI, kdy bylo prokázáno kontinuální vylučování oocyst v trusu hostitele. Záchyt oocyst nebo specifické DNA v tenkém střevě hostitelů byl do 5 DPI sporadický a od začátku patentní periody kontinuální s výjimkou 15 dne (Graf 2.).

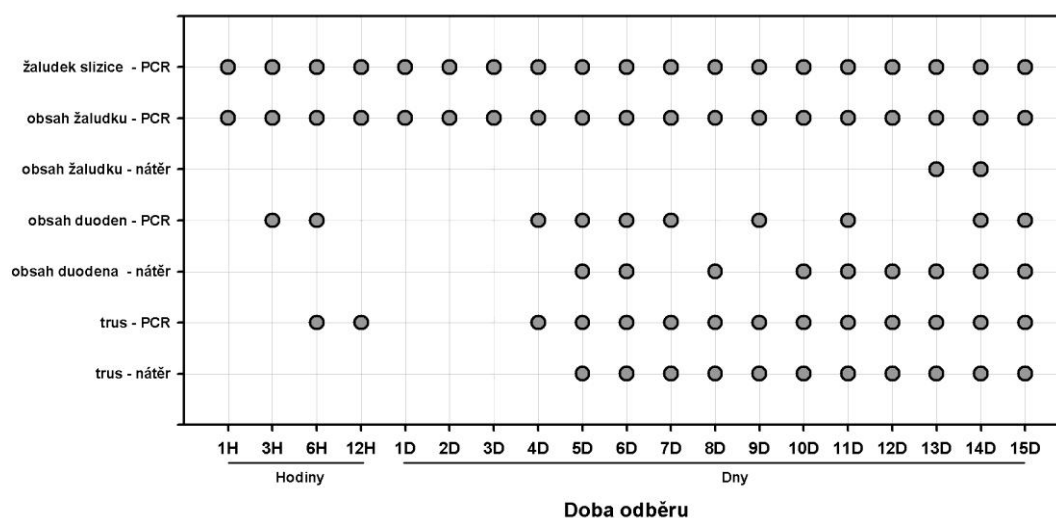
**Graf 2.** Detekce *Cryptosporidium muris* TS03 u dospělých krys malých v průběhu prepatentní a patentní periody



### 4.3 Experimentální infekce dospělých SCID myší *Cryptosporidium muris* HZ206

Experimentální infekce dospělých SCID myší prokázala, že zvířata jsou vnímavá k infekci *Cryptosporidium muris* HZ206. Specifická DNA kryptosporidií v trusu infikovaných zvířat byla poprvé detekována 6 - 12 hodin po infekci. Avšak prepatentní perioda tohoto izolátu ve SCID myších byla 4 dny. Specifická DNA kryptosporidií různých vývojových stádií izolátu HZ206 byla ve sliznici žaludku zachycena pomocí PCR již 1 h po infekci a následně po celou dobu trvání experimentu, stejně jako v obsahu žaludku. Záchyt oocyst nebo specifické DNA v tenkém střevě hostitelů byl do 3 DPI sporadický a od začátku 4. dne kontinuální (Graf 3.).

**Graf 3.** Detekce *Cryptosporidium muris* HZ206 u dospělých SCID myší v průběhu prepatentní a patentní periody

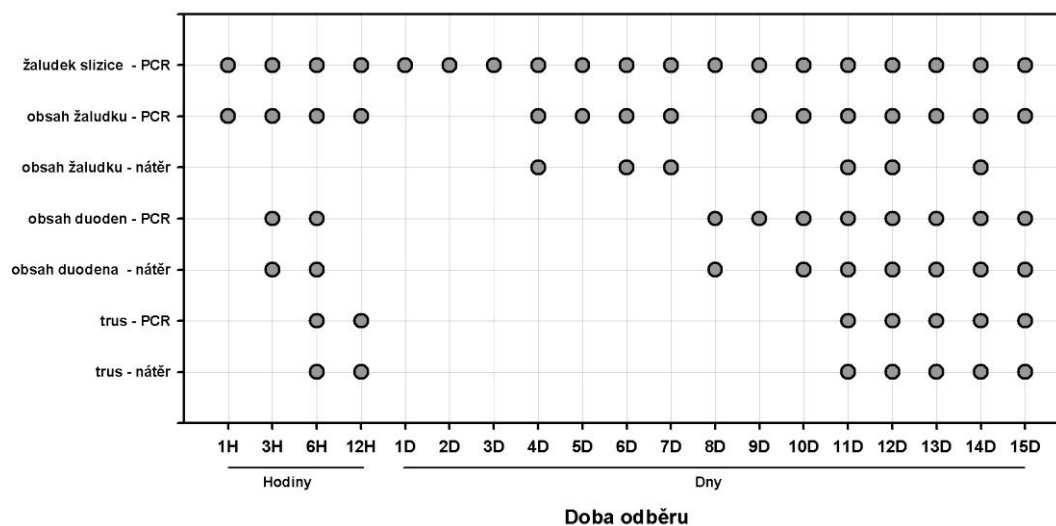


### 4.4 Experimentální infekce dospělých SCID myší TS03 *Cryptosporidium muris* TS03

Experimentální infekce dospělých SCID myší prokázala, že zvířata jsou vnímavá k infekci *Cryptosporidium muris* TS03. Specifická DNA kryptosporidií, včetně záchytu oocyst v trusu infikovaných zvířat byla poprvé detekována 6-12 hodin po infekci. Nicméně prepatentní perioda tohoto izolátu ve SCID myších byla 11 dnů. Zatímco specifická DNA kryptosporidií různých vývojových stádií izolátu TS03 byla ve sliznici

žaludku zachycena pomocí PCR již 1 h po infekci a následně po celou dobu trvání experimentu, v obsahu žaludku byly oocysty, respektive specifická DNA detekovány pouze v prvních 12 hodinách po infekci a následně od 4 DPI. Záchyt oocyst nebo specifické DNA v tenkém střevě hostitelů byl do 7 DPI sporadický a od začátku 8. dne kontinuální (Graf 4.).

**Graf 4.** Detekce *Cryptosporidium muris* TS03 u dospělých SCID myši v průběhu prepatentní a patentní periody

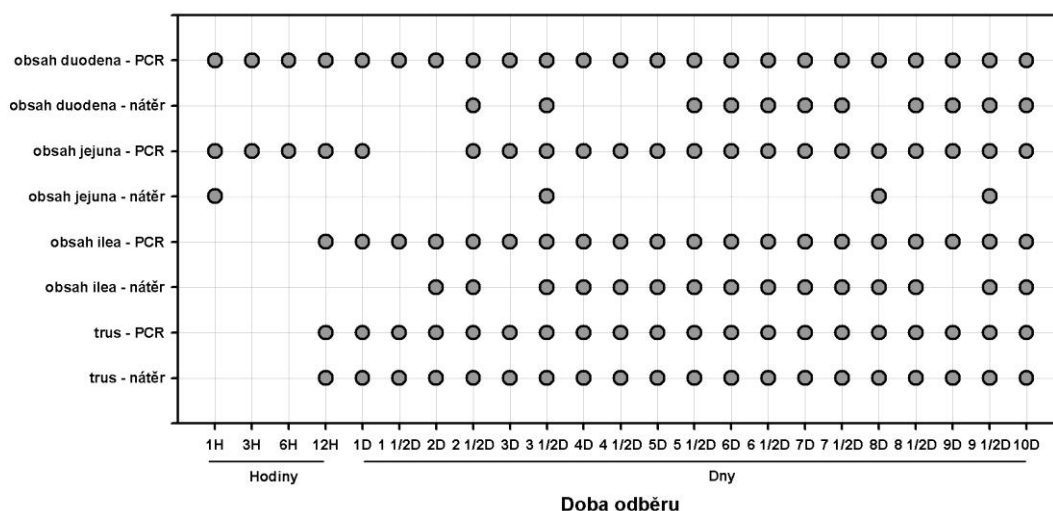


#### 4.5 Experimentální infekce neonatálních BALB/c myši *Cryptosporidium parvum* HA1

Experimentální infekce neonatálních BALB/c myši prokázala, že zvířata jsou vnímavá k infekci *Cryptosporidium parvum* HA1. Specifická DNA kryptosporidií, včetně záchytu oocyst v trusu infikovaných zvířat byla poprvé detekována 12 hodin po infekci a následně po celou dobu trvání experimentu. Zatímco specifická DNA kryptosporidií různých vývojových stádií izolátu HA1 byla v obsahu duodena zachycena pomocí PCR již 1 h po infekci a následně po celou dobu trvání experimentu, v obsahu jejunu byly oocysty, respektive specifická DNA detekovány 1 hodinu – 1 den po infekci a následně od 2 ½ DPI. Oocysty, respektive specifická DNA z obsahu ilea

byly prvně zachyceny 12 hodin po infekci a následně po celou dobu trvání experimentu (Graf 5.).

**Graf 5.** Detekce *Cryptosporidium parvum* HA1 u neonatálních BALB/c myši v průběhu prepatentní a patentní periody

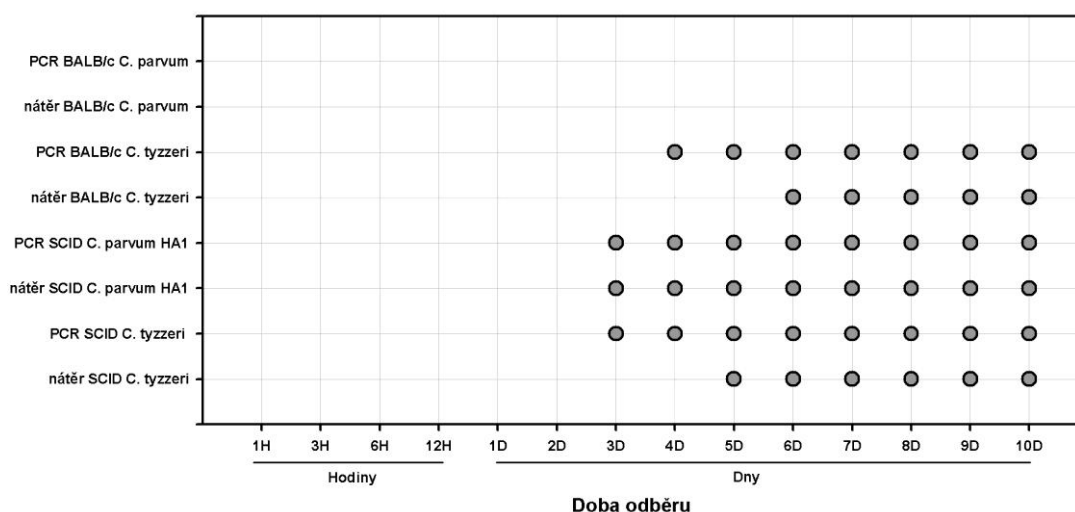


#### 4.6 Experimentální infekce dospělých BALB/c myši *Cryptosporidium parvum* HA1

Dospělé BALB/c myši inokulované jednorázovou dávkou  $1.10^6$  oocyst *Cryptosporidium parvum* HA1 nevylučovali v průběhu 10 DPI žádné oocysty kryptosporidií, ani nebyla detekována specifická kryptosporidiová infekce v trusu sledovaných zvířat. Navíc nebyla v průběhu prvních hodin, respektive dnů po infekci zjištěna přítomnost pasáže oocyst v trusu.

Obdobně v navazujícím experimentu, kdy byly BALB/c myši opakovaně každých 8 hodin inokulovány dávkou  $1.10^6$  oocyst *C. parvum* HA1, nebyla ani mikroskopickými ani molekulárními metodami zjištěna přítomnost oocyst či specifické DNA v průběhu 5 po sobě jdoucích dnů (Graf 6.).

**Graf 6.** Detekce *Cryptosporidium parvum* HA1 a *Cryptosporidium tyzzeri* u dospělých BALB/c a SCID myši v průběhu prepatentní a patentní periody



#### 4.7 Experimentální infekce dospělých SCID myši *Cryptosporidium parvum* HA1

Na rozdíl od výše uvedeného, v případě experimentální infekce vnímavého hostitele – dospělých SCID myši byla specifická DNA kryptosporidií *Cryptosporidium parvum* HA1, včetně záhytu oocyst detekována od 3. dne po infekci a následně až do konce trvání experimentu (Graf 6.).

#### 4.8 Experimentální infekce dospělých SCID myši *Cryptosporidium tyzzeri*

Experimentální infekce dospělých SCID myši prokázala, že zvířata jsou vnímavá k infekci *Cryptosporidium tyzzeri*. Specifická DNA kryptosporidií infikovaných zvířat byla v trusu zvířat poprvé detekována 3. den po infekci a následně až do konce trvání experimentu (Graf 6.).

#### 4.9 Experimentální infekce dospělých BALB/c myši *Cryptosporidium tyzzeri*

V případě infikovaných dospělých BALB/c myši druhem *C. tyzzeri* byla specifická DNA kryptosporidií zachycena od 4. dne po infekci a dále až do konce trvání experimentu (Graf 6.).



## 5. DISKUZE

Kryptosporidie jsou jednobuněční, monoxenní paraziti, jejichž kompletní vývojový cyklus ve většině případů probíhá v zažívacím traktu obratlovčího hostitele. Infekční exogenní stádium, oocysta, opouští tělo hostitele spolu s trusem nebo stolicí a to i v případě, že vývojová stádia jsou lokalizována mimo zažívací trakt (Fayer a Xiao 2008b). Na rozdíl od cyst *Giardia intestinalis*, oocysty kryptosporidií jsou vylučovány nepřetržitě a mohou být detekovány v průběhu celého období patentní periody.

Až do konce minulého století panoval názor, že kryptosporidie mají širokou hostitelskou specifitu, nicméně na základě dnešních poznatků se většina odborné veřejnosti přiklání k názoru, že jednotlivé druhy a genotypy kryptosporidií jsou úzce hostitelsky specifické (Xiao a kol. 2004b). S rozvojem molekulárních metod bylo v posledních několika letech popsáno velké množství nových genotypů kryptosporidií a řada z nich byla následně ustanovena jako samostatný druh (Fayer a Xiao 2008b). U velkého množství genotypů je na základě molekulární epidemiologie znám pouze jediný hostitel, ačkoliv není jisté zda byl hostitel opravdu infikován nebo se jednalo o pouhou pasáž oocyst či specifické DNA zažívacím traktem hostitele. Použití citlivějších metod, jako je PCR nebo qPCR je výhodné, ale pozitivní výsledek pouze potvrdí přítomnost kryptosporidiové specifické DNA ve vzorku, což ovšem nemusí nutně znamenat infekční proces. Cílem této práce je posoudit, zda přítomnost oocyst, respektive specifické DNA ve vzorcích trusu odpovídá probíhající infekci v hostiteli nebo se může jednat o pasáž oocyst zažívacím traktem.

S rozšířením citlivých molekulárních metod se v odborné literatuře stále častěji objevují popisy výskytu kryptosporidií v nespecifických hostitelích, aniž by vnímavost hostitele byla potvrzena dalšími metodami (histologie, experimentální infekce). Jedním z mnoha případů je výskyt „hlodavčích“ kryptosporidií u hadů, ještěrek, ryb či savců (Crawshaw and Mehren 1987, Upton 1990, Graczyk a kol. 1996a, Gatei a kol. 2002, , Xiao a Ryan 2004a, Xiao a kol. 2004c, Fayer 2008b, Kváč 2009a).

Výsledky této práce naznačují, že v případě, kdy je hostitel infikován hostitelsky specifickou kryptosporidií, dochází v zažívacím traktu k excystaci většiny,

pravděpodobně životaschopných oocyst a uvolnění sporozoiti iniciují infekci hostitele. Oproti tomu, mrtvé oocysty prochází pravděpodobně jako pasáž, která může být detekována jako celé oocysty nebo specifická DNA v trusu bezprostředně po inokulaci. U myších hostitelů se tato doba, kdy bylo možné detekovat pasáž inokula pohybovala od 6 do 24 hodin po inokulaci. Toto zjištění podporují i výsledky pasáže oocyst *C. muris*, *C. tyzzeri* nebo *C. andersoni* u ptáků, plazů, obojživelníků či prasat.

Například oocysty *C. muris* byly zjištěny v trusu užovky červené a černé (*Elaphe guttata*, *Elaphe obsoleta*), hroznýše královského (*Boa constrictor*) (Xiao a kol. 2004c) a žáby rohatky ozdobné (*Ceratophrys ornata*) (Crawshaw a Mehren 1987). V těchto případech se jednalo o pouhou pasáž (Xiao a kol. 2004c). Přítomnost kryptosporidiové DNA v trusu hostitelů byla zapříčiněna kmením hostitelů hlodavci, kteří byly přirozeně infikováni kryptosporidii. V případě vyřazení infikovaných hlodavců z krmné diety došlo k „vyléčení“ nespecifických hostitelů (Xiao a kol. 2004c). Navíc neinfekčnost *C. muris*, *C. andersoni*, *C. wrairi*, *C. baileyi* či *C. meleagridis* pro hady byla experimentálně prokázána (Graczyk a Cranfield 1996b). Podobného původu můžou být i oocysty *C. muris* a *C. andersoni* detekované ve stolici lelkouna soviho (*Podargus strigoides*) a koroptve korunkaté (*Rollulus rouloul*) (Ng a kol. 2006).

Dalším příkladem je detekce oocyst *C. muris* a *C. tyzzeri* ve výkalech prasat v České republice (Kváč a kol. 2009a), v Číně (Chen a Huang 2007) a v odpadních kalojemech z chovů prasat (Xiao a kol. 2006, Jenkins a kol. 2010). Nevnímavost prasat k těmto druhům kryptosporidií, jejichž hostitelé jsou hlodavci (Feng a kol. 2011, Ren a kol. 2012), byla nedávno potvrzena sérií experimentálních infekcí (Kváč a kol. 2012). Je více než pravděpodobné, že zjištění kryptosporidií z hlodavců ve vzorcích trusu prasat bylo způsobeno mechanickou pasáží. Taktéž přítomnost specifické DNA druhů *C. muris* a *C. tyzzeri* v kalojemu vepřínů (Jenkins a kol. 2010) byla nejspíše způsobena kontaminací trusem hlodavců žijících v jejich okolí. Vzhledem k bohaté přítomnosti synantropních hlodavců a občasné detekci kryptosporidií u nespecifických hostitelů, by tyto nálezy neměly být žádným překvapením (Kváč a kol. 2009b, 2012).

Dalším z významných zjištění této práce je, že v případě infekce neonatálních myší druhem *C. parvum*, kryptosporidie s nejnižší známou hostitelskou specifitou, byly

oocysty detekovány již od 12 hodin po infekci, tedy dříve než je délka kompletního vývoje tohoto parazita v tomto hostiteli (4 DPI). Tento výsledek lze vysvětlit tak, že pasáž zaživacím traktem neonatálních zvířat je výrazně odlišná od dospělých a také proces trávení, tedy případné destrukce uvolněných sporozoitů, je výrazně limitován oproti dospělým jedincům. Tato naše teorie byla následně potvrzena sérií experimentů. U dospělých BALB/c myši, které nejsou vnímavé k infekci *C. parvum*, jsme v průběhu 10 DPI nedetekovali žádné oocysty v trusu a to ani mikroskopickými, ani molekulárními metodami. Navíc ani v případě, kdy byly dospělé BALB/c myši v 8 hodinových intervalech inokulovány, nebyly oocysty nebo specifická DNA detekovány. Tento výsledek naznačuje, že prakticky většina oocyst excystovala a uvolnění sporozoiti byli následně destruováni. Naopak ve studii provedené Graczykem a kol. (1998) bylo prokázáno, že oocysty *C. parvum* pasážové přes zaživací trakt bernešek (*Branta canadensis*) byly infekční pro neonatální BALB/c myši, nicméně více jak 60 % oocyst prošlých zaživacím traktem excystovalo. Rozdíl mezi Graczykovými výsledky a naším pozorování může být v hostitelské specifitě jednotlivých kryptosporidií. Zatímco námi použité druhy kryptosporidií jsou schopny vyvolat infekci u testovaných modelových hostitelů, v případě *C. parvum* pouze u neonatálních či imunosuprimovaných jedinců, druh *C. parvum* není pravděpodobně pro ptáky infekční. Z výše uvedeného lze vyvozovat, že kryptosporidie excystují při průchodu zaživacím traktem nezávisle na druhu hostitele, ale s tím, že v typických či potenciálně vnímavých hostitelích dochází k excystaci prakticky všech oocyst, zatímco v netypických hostitelích excystuje pouze část.

Za zásadní výsledek této práce mimo jiné považujeme fakt, že se nám podařilo prokázat, že detekce oocyst v trusu infikovaných zvířat koresponduje s přítomností vývojových stádií v místě infekce a s přítomností oocyst v trusu zvířat. Jinými slovy řečeno, do doby než je ukončen vývojový cyklus a jsou produkovány oocysty, není až na výjimky (pasáž inokula) možné detekovat specifickou kryptosporidiovou DNA v trusu zvířat. Předpokládáme, že DNA uvolněných zoitů, kteří neinternalizovali nové hostitelské buňky je v důsledku trávení velmi rychle degradována.

## 6. ZÁVĚR

Na základě provedené studie lze konstatovat, že nelze vyvrátit hypotézu 1: Detekcí specifické kryptosporidiové DNA ve vzorcích stolice nebo trusu nelze jednoznačně posoudit, zda se jedná o probíhající infekci v hostiteli nebo o pasáž oocyst zaživacím traktem. Nicméně tyto závěry lze vztahovat pouze na hlodavčí hostitele, v jejichž případech jsme dospěli k poznání, že pasáž oocyst zaživacím traktem je možné detekovat v rozmezí pouze 6-24 hodin po infekci, a to ne ve všech případech. Z tohoto zjištění lze učinit doporučení pro epidemiologické studie zabývající se diverzitou kryptosporidií volně žijících hlodavců. Odchycená volně žijící zvířata je nutné chovat minimálně po dobu 48 hodin na sterilní podestýlce a krmit a napájet je sterilním krmivem a vodou. V případě detekce specifické DNA v trusu můžeme takovýto záchyt považovat za projev probíhající infekce, neboť výsledky práce potvrdily, že detekovatelná DNA pochází vždy z oocyst, tedy konečného stádia vývojového cyklu.

Hypotézu 2: Specifickou kryptosporidiovou DNA v klinických vzorcích stolice nebo trusu lze detekovat pouze v případě úspěšné infekce hostitele, lze zamítnout.

## 7. LITERATURA

**Alvarez-Pellitero P., Sitja-Bodadilla A., 2002:** *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Spartus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. Int. J. Parasitol. 32: 1007-1021.

**Alvarez-Pellitero P., Quiroga M.I., Sitja-Bodadilla A., Redondo M.J., Palenzuela O., Padros F., Vazquez F., Nieto J.M., 2004:** *Cryptosporidium scophalmi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. Dis. Aquat. Organ. 62: 133-145.

**Azami M., Moghaddan D.D., Salehi R., Salehi M., 2007:** The identification of *Cryptosporidium* species (protozoa) in Isfahan, Iran by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene. Appl. Mol. Biol. 41: 851-856.

**Bjorneby J.M., Riggs M.W., Perryman L.E., 1990:** *Cryptosporidium parvum* merozoites share neutralization-sensitive epitopes with sporozoites. J. Immun. 145: 298-304.

**Cama V.A., Bern C., Sulaiman I.M., Gilman R.H., Ticona E., Vivar, 2003:** *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. J. Eukaryot. Microbiol. 50: 531-533.

**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.

- Carmena D., 2010:** Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection, surveillance and implications for public health. In Méndez-Vilas A. (Eds.), Formatex press, Current Research, Technology and Education Topics in Appl. Microbiol. Microbial. Biotech. pp. 3-14.
- Checkley W., Epstein D.L., Gilman H.R., Black E.R., Cabrera L., Sterling R.C., 1998:** Effects of *Cryptosporidium parvum* infection in Peruvian children: growth faltering and subsequent catch-up growth. Am. J. Epidemiol. 148: 497-506.
- Chen F., Huang, K., 2007:** Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* in pigs in eastern China. Zoon. Pub. Health. 54: 393-400.
- Cimon Y.K., Oberst D.R., J.S., Mosier A.D., 1996:** Biliary cryptosporidiosis in two corn snakes (*Elaphe guttata*). J. Vet. Diagn. Invest. 8: 398-399.
- Corliss J.O., 1994:** An interim utilitarian ('user friendly') hierarchical lymphocytes classification and characterization of the protozoa. Acta Protozool. 33: 1-51.
- Crawshaw G.J., Mehren K.G., 1987:** Cryptosporidiosis in zoo and wild animals, in Erkrankungen der Zootiere, Verhandlungsbericht des 29. Int. Symp. über die Erkrankungen der Zootiere von 20. Ippen R., and Schroder, H. D. (Eds.), Akad. Verlag, Berlin, pp. 353-362.
- Current W.L., Upton S.J., Haynes T.B., 1986a:** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. J. Protozool. 33: 289-296.
- Current W.L., Reese N.C., 1986b:** A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. J. Protozool. 33: 98-108.

- Current, W.L., 1988:** The biology of *Cryptosporidium*. ASM News. 54: 605-611.
- 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., Leek R.G., 1984:** The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. J. Protozool. 31: 567-569.
- Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P., 1997:** The general biology of *Cryptosporidium*. In Fayer R. (Ed.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRP Press, Boca Raton, FL, pp. 2-33.
- Fayer R., Trout J.M., Xiao L., Morgan U., Lal A.A., Dubey J.P., 2001:** *Cryptosporidium canis* n. sp. From domestic dogs. J. Parasitol. 87: 1415-1422.
- Fayer, R., 2004:** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 126: 37-56.
- Fayer R., Santín M., Xiao L., 2005:** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). J. Parasitol. 91: 624-629.
- Fayer R., Santín M., Trout J.M., 2008a:** *Cryptosporidium ryane* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). Vet. Parasitol. 156: 191-198.

- Fayer R., Xiao L., 2008b:** General biology. in: R. Fayer, L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-42.
- Fayer R., Santín M., 2009:** *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). Vet. Parasitol. 164: 192-200.
- Fayer R., Santín M., Macarisin D., 2010:** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. Vet. Parasitol. 172: 23-32.
- Farthing M.J.G., 2000:** Clinical aspects of human cryptosporidiosis. In: Petry F, ed. Cryptosporidiosis and Microsporidiosis. Contribut. Microbiol. 6: 50-74.
- Feng Y., Lal A.A., Li N., Xiao L., 2011:** Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. Exp. Parasitol. 127: 238-242.
- Fleta, J., Sanchez-Acedo, C., Clavel, A., Quilez, J. 1995:** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extraintestinal tissues of sheep and pigs. Vet. Parasitol. 59: 201-205.
- Gatei W., Ashford R.W., Beeching N.J., Kamwati S.K., Greensill J., Hart C.A., 2002:** *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. Emerg. Infect. Dis. 8: 204-206.
- Graczyk T. K., Cranfield M.R., Fayer R., Anderson M.S., 1996a:** Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3234-3237.
- Graczyk T.K., Cranfield M.R., 1996b:** Assessment of the conventional detection of fecal *Cryptosporidium serpentis* oocysts in subclinically infected captive snakes. Vet. Res. 27: 185-192.



- Graczyk T. K., Cranfield M.R., Fayer R., Trout J., Goodale H. J., 1997:** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts is retained upon intestinal passage through a migratory water-fowl species (Canada goose, *Branta canadensis*). Trop. Med. Int. Health. 2: 341-347.
- Graczyk T.K., Fayer R., Trout J.M., Lewis E.J., Farley C.A., Sulaiman I., Lal A.A., 1998:** *Giardia* sp. cysts and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada geese (*Branta canadensis*). Appl. Environ. Microbiol. 64: 2736-2738.
- Guarino A, Canani RB, Casola A, Pozio E, Russo R, Bruzzese E, Fontana M, Rubino A., 1995:** Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhoea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. J. Infect. Dis. 171: 976-983.
- Harris J.R., Petry F., 1999:** *Cryptosporidium parvum*, structural components of the oocyst wall. J. Parasitol. 85: 839-849.
- Hijjawi N.S, Meloni B.P., Morgan U.M., Thompson R.C., 2001:** Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. Int. J. Parasitol. 31: 1048-1055.
- Hijjawi N.S, Meloni B.P., Ng'anzo M., Ryan U.M., Olson M.E., Cox P.T., Monis P.T., Thompson R.C., 2004:** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. Int. J. Parasitol. 34: 769-777.
- Hoover D.M., Hoerr F.J., Carlton W.W., Hinsoman E.J., Ferguson H.W., 1981:** Enteric cryptosporidiosis in nasotang, *Naso liturata*. J. Fish Dis. 4: 425-8.
- Iseki M., 1979:** *Cryptosporidium felis* sp. N. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. J. Parasitol. 28: 285-307.

- Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S., Takada, S., 1989:** Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. Parasitol. Res. 75: 218-222.
- Jenkins M.B., Liotta J.L., Lucio-Forster A., Bowman D.D., 2010:** Concentrations, viability, and distribution of *Cryptosporidium* genotypes in lagoons of swine facilities in the Southern Piedmont and in coastal plain watersheds of Georgia. Appl. Environ. Microbiol. 76: 5757-5763.
- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Krížek J., Modrý D., Šlapeta J., 2008:** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. Folia Parasitol. 55: 81-98.
- Jiang J., Alderisio K.A., Xiao L., 2005:** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm ebony water samples from three watersheds in New York. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4446-4454.
- Kváč M., Ditrich O., Kouba M., Sak B., Vítovec J., Květoňová D., 2004:** Failed Attempt of *Cryptosporidium andersoni* infection on lambs. Folia Parasitol. 51: 373-374.
- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Hofmannová L., Modrý D., Vítovec J., Xiao L., 2008a:** Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. Vet. Parasitol. 153: 363-367.
- Kváč M., 2008b:** Žaludeční kryptosporidie a kryptosporidíóza savců. Habilitační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 60 pp.

- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Secor W.E., 2009a:** Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet. Parasitol.* 163: 33-38.
- Kváč M., Hanzlíková D., Sak B., Květoňová D., 2009b:** Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 160: 319-322.
- Kváč M., Sak B., Hanzlíková D., Kotilová J., Květoňová D., 2009c:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. *Parasitol. Res.* 104: 425-428.
- Kváč M., Kestřánová M., Květoňová D., Kotková M., Ortega Y., McEvoy J., Sak B., 2012:** *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Exp Parasitol.* In press.
- Leander B.S., Clopton R.E., Keeling P.J., 2003:** Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 345-354.
- Leoni F., Amar C., Nichols G., Pedraza-Diaz S., McLauchlin J., 2006:** Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.* 55: 703-707.
- Levine N.D., 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., Blagburn B.L., 2000:** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apikomplexa: Cryptosporiidae) from cattle (*Bos taurus*). J. Eukar. Microbiol. 47: 91-95.

**Molina-Lopez R.A., Ramis A., Martin-Vazquez S., Gomez-Couso H., Ares-Mazas E., Caccio S.M., Leiva M., Darwich L., 2010:** *Cryptosporidium baileyi* infection associated with an outbreak of ocular and respiratory disease in otus owls (*Otus scops*) in a rehabilitation centre. Avian Pathol. 39: 171-176.

**Morgan U.M., Monis P.T., Xiao L., Sulaiman I., Pavlásek I., Blagmbum B., Olson M., Upton S.J., Kramtsov N.V., Lal A.A., Elliot A., Thompson R.C.A., 2000:** Molecular and phylogenic analysis of *Cryptosporidium* from variol hosts. Parasitol. 120: 457-464.

**Morgan-Ryan U.M., Fall A., Ward L.A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R.C.A., Olsen M., Lal A.A., Xiao L., 2002:** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. J. Eukaryot. Microbiol. 49: 433-440.

**Nagamani K., Pavuluri P.R.R., Gyaneshwari M., Prasanthi K., Rao M.I.S., Saxena N.K., 2007:** Molecular characterisation of *Cryptosporidium*: An emerging parasite. Dep. Microbiol. 25: 133-136.

**Ng J., Pavlásek I., Ryan U., 2006:** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. Appl. Environ. Microbiol. 72: 7548-7553.

**O'Hara S.P., Chen X.M., 2011:** The cell biology of cryptosporidium infection. Microb. Infect. 13: 721-730.

- Okhuysen P.C., Chappell C.L., Crabb J.H., Sterling C.R., DuPont H.L., 1999:** Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. J. Infect. Dis. 180: 1275-1281.
- Palacios M.J., Barbosa A., Pedraza-Díaz S., Ortega-Mora M.L., Valera F., Cuervo J.J., Benzal J., Cruz C., 2010:** Apparent absence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Toxoplasma gondii* in three species of penguins along the Antarctic Peninsula. Antarctic Science. 22: 265-270.
- Paperna, I., Vilenken, M., 1996:** Cryptosporidiosis in the gourami *Trichogaster leeri*: description of a new species and a proposal for a new genus, *PisciCryptosporidium*, for species infecting fish. Dis. Aqua. Org. 27: 95-101.
- Pavlásek I., Lávička M., Horák P., Král J., Král B., 1995:** *Cryptosporidium varanii* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus*) Schegel 1893 in captivity at Prague zoo. Gazella 22: 99-108.
- Pavlásek I., 1999:** *Cryptosporidia*, biology diagnosis, host spektrum, specificity and the environmnet. Remedica. Clin. Microbiol. 3: 290-302.
- Pavlásek I., 2005:** První nález oocyst morfometricky podobných druhům *Cryptosporidium muris* a *C. andersoni* u kočky. Veterinářství 55: 480-483.
- Pavlásek I., Ryan U., 2007:** The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. Vet. Parasitol. 144: 349-352.
- Pedraza-Diaz S., Amar C., Nichols G.L., McLauchlin J., 2001:** Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. Emerg. Infect. Dis. 7: 49-56.

- 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.
- Putignani L., Menichella D., 2010:** Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. Interdisciplin. Persp. Infect. Dis. 5: 1-39.
- Ramirez N.E., Ward L.A., Sreevatsan S., 2004:** a review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microb. Infect. 6: 773-785.
- Reduker D.W., Speer C.A., Blixt J.A., 1985a:** Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. J. Protozool. 32: 708-711.
- Reduker D.W., Speer C.A., 1985b:** Factors influencing excystation in *Cryptosporidium* oocysts from cattle. J. Parasitol. 71: 112-115.
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning C., Jian F., Wang R., Lv C., Wang Q., Arrowood M.J., Xiao L., 2012:** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). Exp. Parasitol. 130: 274-281.
- Robertson L.J., Campbell A.T., Smith H.V., 1993:** In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. Parasitology 106: 13-19.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S.J., Katzer F., Bartley P.M., Hunter P.R. Nath M., Innes E.A. Chalmers R.M., 2010:** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa,

Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* 40: 1539-1548.

**Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A.A., Pavlásek I., 2003:** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4302-4307.

**Ryan U.M., Monis P., Enemark H.L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R.C.A., 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.

**Savioli L., Smith H., Thompson A., 2006:** *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Disease Initiative'. *Trend. Parasitol.* 22: 203-208.

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

**Šlapeta J., 2012:** The name *Cryptosporidium tyzzeri* Ren, Zhao, Zhang, Ning, Jian, Wang, Lv, Wang, Arrowood and Xiao, 2012 is permanently invalid. *Exp. Parasitol.* 130: 306-307.

**Thompson R.C., Olson M E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M.S., Hijjawin N.S., 2005:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 59: 77-158.

- Traversa D., 2010:** Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. Parasit. Vectors 25: 3-21.
- Tyzzler E.E., 1907:** a sporozoan found in the peptic flanda of the common mouse. Proc. Doc. Exp. Biol. Med. 5: 12-13.
- Tyzzler, E.E., 1910:** An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glanc 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.
- Upton S.J., 1990:** *Cryptosporidium* spp. in lower vertebrates, in Cryptosporidiosis of Man and Animals, Dubey, J.P., Speer, C.A., and Fayer, R., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, pp.149–156.
- 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.
- Valigurová A., Jirků M., Koudela B., Gelnar M., Modrý D., Šlapeta J., 2008:** *Cryptosporidia*: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. Int. J. Parasitol. 38: 913-922.
- 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: 243-247.
- Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J., Votýpka J., 2007:** Paraziti a jejich biologie. Praha, Triton, pp. 94-96.



- 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.
- World Health Organization, 2006:** *Guidelines for drinking-water quality*. Vol. 1 Recommendations. Geneva, World health Organization. 2006.
- Xiao, L., Ryan, U.M., 2004a:** Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17: 483-490.
- Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J., 2004b:** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 72-97.
- Xiao L., Ryan U.M., Graczyk T.K., Limor J., Li L., Kombert M., Junge R., Sulaiman I.M., Zhou L., Arrowood M.J., Koudela B., Modrý D., Lal A.A., 2004c:** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 891-899.
- Xiao L., Moore J.E., Ukoh U., Gatei W., Lowery C.J., Murphy T.M., Dooley J.S., Millar B.C., Rooney P.J., Rao J.R., 2006:** Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4461-4463.
- Xiao L., 2010:** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 124: 80-89.

## 8. KLÍČOVÁ SLOVA

- kryptosporidie
- pasáž oocyst
- infekce
- hostitel