

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Vnitrodruhová variabilita *Cryptosporidium muris*

Diplomová práce

Bc. Jana Tinavská

Školitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

České Budějovice, 2023

Tinavská, J., 2023: Vnitrodruhová variabilita *Cryptosporidium muris*. [Intraspecific variability of *Cryptosporidium muris*. Mgr. Thesis, in Czech.] – 84 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This work investigated the biological and molecular characteristics of *Cryptosporidium muris* CAT21, originally isolated from a naturally infected cat, and compared it with other isolates of gastric *Cryptosporidium* of mammals. Experimental susceptibility to different model hosts, course of infection, tissue affinity, size, and viability of oocysts were tested.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 12. dubna 2023

.....
Bc. Jana Tinavská

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala především školiteli mé diplomové práce prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za jeho trpělivost, cenné rady a odborné vedení. Dále bych ráda poděkovala školiteli specialistovi RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D., za cenné připomínky a pomoc při práci. Velké poděkování patří také všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitického ústavu BC AVČR, v.v.i. za jejich ochotu a přátelské prostředí. V neposlední řadě děkuji mé rodině a příteli za podporu během celého studia.

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

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GAČR 21-23773S (řešitel prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

Obsah

1. Úvod	6
2. Literární přehled	8
2.1. Rod <i>Cryptosporidium</i>	8
2.1.1. Historie	8
2.1.2. Systematika	11
2.1.3. Vývojový cyklus	12
2.1.4. Zdroj a přenos infekce	14
2.1.5. Klinické příznaky a terapie kryptosporidiózy	14
2.1.6. Prepatentní a patentní perioda	15
2.1.7. Hostitelská specifita	15
2.1.8. Žaludeční kryptosporidie savců	17
3. Cíle práce	21
4. Materiál a metodika	22
4.1. Materiál	22
4.1.1. Paraziti	22
4.1.2. Experimentální zvířata	22
4.2. Metody	23
4.2.1. Barvení kryptosporidií	23
4.2.2. Molekulární vyšetření	25
4.2.3. Purifikace oocyst	32
4.2.4. Morfometrická analýza oocyst	33
4.2.5. Izolace gDNA z oocyst	34
4.2.6. Degradace oocyst	35
4.2.7. Design infekčních experimentů	36
4.2.8. Lokalizace infekce	37
4.2.9. Statistická analýza	41
5. Výsledky	42
5.1. Přirozená infekce <i>Cryptosporidium muris</i> CAT21 u kočky domácí	42
5.1.1. Infektivita <i>Cryptosporidium muris</i> CAT21 pro modelové hlodavce	43
5.2. Morfometrie a morfologie oocyst	44
5.2.1. Diferenciální diagnostika	45
5.3. Molekulární analýzy	46

5.4.	Výtěžnost izolace gDNA z oocyst	49
5.5.	Klinický průběh infekce.....	50
5.6.	Lokalizace infekce	50
5.7.	Vývojový cyklus	53
5.8.	Degradace oocyst.....	55
6.	Diskuse	57
7.	Závěry	63
8.	Seznam použité literatury	64

1. Úvod

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou kosmopolitně rozšíření oportunní paraziti, kteří postihují všechny třídy obratlovců včetně člověka. Kryptosporidie infikují primárně epiteliální buňky gastrointestinálního traktu a způsobují průjemové onemocnění, které nazýváme kryptosporidióza (Nime et al. 1976; Xiao a Cama 2018). Průběh infekce závisí na druhu a genotypu kryptosporidie a druhu, věku a imunitním stavu hostitele (Kváč et al. 2009b; Tinavská 2021; Lamisere et al. 2022). Některé druhy kryptosporidií jako například *C. parvum* a *C. baileyi* infikují více druhů hostitelů, jiné se omezují na skupiny, jako jsou hlodavci (*C. muris*) nebo přežvýkavci (*C. andersoni*) a o dalších je známo, že parazitují pouze u jednoho druhu hostitele, například *C. tyzzeri* nebo *C. apodemi* (Fayer a Xiao 2007; Ren et al. 2012; Čondlová et al. 2018). Člověk je vnímavý k infekci více než 20 druhů a genotypů kryptosporidií, nicméně většina lidských infekcí je způsobena druhem *C. hominis*, který je hostitelsky adaptován na člověka a druhem *C. parvum*, který je charakteristický svou nízkou hostitelskou specifitou (Xiao 2010; Checkley et al. 2015). V rámci rodu rozlišujeme dvě fylogenetické větve kryptosporidií, první skupinu tvoří kryptosporidie s afinitou k enterocytům a druhou s afinitou k žaludečním žlázám (Fayer a Xiao 2007).

Některé druhy jako například *C. parvum*, *C. hominis* nebo *C. galli* jsou patogenní, zatímco u druhů jako jsou *C. muris* nebo *C. andersoni* probíhá infekce ve většině případů asymptomaticky (Díaz et al. 2021).

V současné době je popsáno 11 druhů žaludečních kryptosporidií (Tyzzer 1910; Levine 1980; Paperna a Vilenkin 1996; Lindsay et al. 2000; Alvarez-Pellitero a Sitjà-Bobadilla 2002; Ryan et al. 2003a; Jirků et al. 2008; Ryan et al. 2015; Kváč et al. 2016; Holubová et al. 2019; Bolland et al. 2020), u savců jsou to druhy *C. muris*, *C. andersoni* a *C. proliferans*, jejichž biologické a molekulární vlastnosti se v mnoha ohledech liší od střevních druhů (Lindsay et al. 2000; Kváč et al. 2016).

Typickými hostiteli žaludečních kryptosporidií jsou hlodavci a přežvýkavci (Tyzzer 1910; Lindsay et al. 2000; Xiao et al. 2004a; Kváč et al. 2016). U ostatních skupin savců byly kryptosporidiové infekce v žaludku popsány jen ojediněle. Navíc v řadě případů se jednalo o pasáž zaživacím traktem po tom, co predátor pozřel svou kořist, která byla přirozeným hostitelem žaludečních kryptosporidií (Xiao et al. 2004b; Kváč et al. 2012; 2021).

V roce 2007 popsal Pavlásek a Ryan případ přirozeně infikované kočky domácí druhem *C. muris*. Přestože myši jsou přirozenými hostiteli *C. muris* a kočky jsou přirozenými predátory myší, kočky nesdílí s myšmi stejné druhy kryptosporidií. Nicméně kočky jsou pravděpodobně ojediněle vnímavé k infekci *C. muris*.

V této práci se zabýváme případem a bližší biologickou a genetickou charakteristikou izolátu *C. muris* CAT21 získaného z přirozeně infikované kočky.

2. Literární přehled

2.1. Rod *Cryptosporidium*

2.1.1. Historie

Popis kryptosporidií, které byly původně považovány za vývojová stadia kokcií *Coccidium falciforme* (dnes *Eimeria falciiformis*) (Clarke 1895), se datuje až do roku 1907, kdy Ernest Edward Tyzzer identifikoval první organismus patřící do tohoto rodu. V tomto roce rozpoznal a následně v roce 1910 popsal parazita, který se vyskytoval v žaludečních žlázách laboratorních myší a pojmenoval ho jako nový druh *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907; 1910). Následně v roce 1912 popsal střevní druh kryptosporidií *C. parvum* a v roce 1929 popsal první nález kryptosporidií velmi podobné druhu *C. parvum* v céku kuřat (Tyzzer 1912; 1929). Nicméně tento popis nebyl úplný.

Slavin (1955) popsal kryptosporidii, která parazitovala v epitelu střeva a Fabriciovy burzy krocanů. Způsobovala těžké průjmy, v některých případech i smrt jedince a pojmenoval ji *Cryptosporidium meleagridis*. V roce 2003 byl tento druh popsán jako jediný druh, který běžně infikuje jak ptáky, tak savce (Akiyoshi et al. 2003). V roce 1971 Panciera et al. popsali první případ závažné kryptosporidiózy u telat s těžkými vodnatými průjmy, které se nedařilo léčit žádnými dostupnými chemoterapeutiky a často končily smrtí telete. Tento případ vedl ke zvýšenému zájmu o kryptosporidiové infekce jako takové. Další případy, které přispěly ke zvýšenému zájmu o tyto infekce, byly infekce u lidí (Nime et al. 1976; Meisel et al. 1976; Lasser et al. 1979).

Střevní druh *C. parvum* a žaludeční druh *C. muris* byly v roce 1984 chybně sjednoceny jako jeden druh (Levine 1984). O rok později byly díky popsáním případům kryptosporidiózy skotu tyto dva druhy od sebe odděleny (Upton a Current 1985). Vzhledem k morfologickým podobnostem žaludečních oocyst nalezených u myší a u skotu, byly izoláty ze skotu označovány jako *C. muris*-like (Upton a Current 1985; Anderson 1987).

S rozvojem a všeobecnou dostupností molekulárních metod došlo na přelomu tisíciletí k popisu velkého množství druhů a genotypů kryptosporidií. V současné době je uznáno 49 druhů (Tabulka 1) a známo několik desítek genotypů, které pravděpodobně představují samostatné taxony (Tyzzer 1910; Lindsay et al. 2000; Xiao et al. 2004a; Kváč et al. 2007b; 2008; 2009b; Kodádková et al. 2010).

Tabulka 1. Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*. Žaludeční druhy jsou zvýrazněny.

Druh	Hostitelé	Lokalizace	Reference
<i>C. abrahamseni</i>	ryby	střevo	Zahedi et al. 2021
<i>C. alticolis</i>	hraboš obecný	tenké střevo	Horčíčková et al. 2019
<i>C. andersoni</i>	skot	žaludek	Lindsay et al. 2000
<i>C. apodemí</i>	myšice	střevo	Čondlová et al. 2018
<i>C. avium</i>	ptáci	střevo	Holubová et al. 2016
<i>C. baileyi</i>	drůbež	střevo, dýchací a močové cesty	Current et al. 1986
<i>C. bollandi</i>	ryby	žaludek	Bolland et al. 2020
<i>C. bovis</i>	skot	tenké střevo	Fayer et al. 2005
<i>C. canis</i>	psi	tenké střevo	Fayer et al. 2001
<i>C. cichlidis</i>	ryby	tenké střevo	Paperna a Vilenkin 1996
<i>C. cuniculus</i>	králíci a lidé	tenké střevo	Robinson et al. 2010; Inman a Takeuchi 1979
<i>C. ditrichi</i>	myšice	tenké střevo	Čondlová et al. 2018
<i>C. ducismarci</i>	želvy	střevo	Ježková et al. 2016
<i>C. erinacei</i>	ježci	tenké střevo	Kváč et al. 2014
<i>C. fayeri</i>	klokani	tenké střevo	Ryan et al. 2008
<i>C. felis</i>	kočky	tenké střevo	Iseki 1979
<i>C. fragile</i>	žáby	žaludek	Jirků et al. 2008
<i>C. galli</i>	ptáci	žláznatý žaludek	Pavlásek 1999; Ryan et al. 2003a
<i>C. homai</i>	morče	střevo	Zahedi et al. 2017
<i>C. hominis</i>	lidé	tenké střevo	Morgan-Ryan et al. 2002
<i>C. huwi</i>	ryby	žaludek	Ryan et al. 2015
<i>C. macropodum</i>	klokani	střevo	Power a Ryan 2008
<i>C. meleagridis</i>	drůbež a lidé	střevo	Slavin 1955
<i>C. microti</i>	hraboš obecný	tlusté střevo	Horčíčková et al. 2019
<i>C. molnari</i>	ryby	žaludek	Alvarez-Pellitero a Sitjà-Bobadilla 2002
<i>C. muris</i>	hlodavci	žaludek	Tyzzer 1910; 1907
<i>C. myocastoris</i>	nutrie	tenké střevo	Ježková et al. 2021a
<i>C. nasoris</i>	ryby	střevo	Hoover et al. 1981
<i>C. occultus</i>	potkani	tlusté střevo	Kváč et al. 2018
<i>C. ornithophilus</i>	ptáci	tlusté střevo	Holubová et al. 2020
<i>C. parvum</i>	savci	tenké střevo	Tyzzer 1912
<i>C. proliferans</i>	hlodavci	žaludek	Kváč et al. 2016
<i>C. proventriculi</i>	papoušci	žaludek	Holubová et al. 2019
<i>C. rattí</i>	potkani	tlusté střevo	Ježková et al. 2021
<i>C. reichenbachklinkei</i>	ryby	žaludek	Paperna a Vilenkin 1996
<i>C. rubeyi</i>	veverky	střevo	Li et al. 2015
<i>C. ryanae</i>	skot	tenké střevo	Fayer et al. 2008
<i>C. sciurinum</i>	veverky	střevo	Prediger et al. 2021
<i>C. scophalmi</i>	ryby	střevo	Alvarez-Pellitero et al. 2004

Tabulka 1. Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*. Žaludeční druhy jsou zvýrazněny (pokračování).

Druh	Hostitelé	Lokalizace	Reference
<i>C. scrofarum</i>	prasata	střevo	Kváč et al. 2013
<i>C. serpentis</i>	plazi	žaludek	Levine 1980
<i>C. suis</i>	prasata	střevo	Ryan et al. 2004
<i>C. testudinis</i>	želvy	neznámá	Ježková et al. 2016
<i>C. tyzzeri</i>	myši	tenké střevo	Ren et al. 2012
<i>C. ubiquitum</i>	ovce a kozy	střevo	Fayer et al. 2010
<i>C. varanii</i>	plazi	střevo	Pavlásek a Ryan 2008
<i>C. viatorum</i>	lidé	neznámá	Elwin et al. 2012
<i>C. wrairi</i>	morčata	tenké střevo	Vetterling et al. 1971
<i>C. xiaoi</i>	ovce a kozy	střevo	Fayer a Santín 2009

2.1.1.1. Chronologie popisu žaludečních druhů kryptosporidií

1907 *Cryptosporidium muris*

Cryptosporidium muris je prvním popsáným druhem rodu *Cryptosporidium*, který v roce 1907 popsal E. E. Tyzzer. Tento druh byl detekován v žaludečních žlázách myši. Typickým hostitelem jsou tedy hlodavci, především z čeledi myšovitých (Muridae).

1980 *Cryptosporidium serpentis*

Tento druh kryptosporidie byl objeven již v roce 1977 v žaludeční stěně hada (Brownstein et al. 1977), nicméně své jméno *Cryptosporidium serpentis* dostal tento druh až v roce 1980 Norman D. Levinem (Levine 1980).

1999 *Cryptosporidium galli*

Pavlásek (1999) našel morfologicky identickou kryptosporidii s *C. blagburni* (tento druh není dnes uznáván jako platný) u uhynulé 17. měsíční slepice (*Gallus gallus*) v proventrikulu a pojmenoval tento druh *Cryptosporidium galli*. Vzhledem k tomu, že tento popis měl řadu nedostatků, byl tento druh v roce 2003 redeskribován s dalšími biologickými a molekulárními charakteristikami (Ryan et al. 2003).

2000 *Cryptosporidium andersoni*

Lindsay et al. (2000) na základě molekulárních a biologických vlastností odlišili *C. muris* infikující hlodavce a kryptosporidii parazitující ve slezu tura domácího (*Bos taurus*), která do té doby byla popisována jako *C. muris*-like, a pojmenovali ji *Cryptosporidium andersoni*.

2002 *Cryptosporidium molnari*

Tento druh byl popsán u dvou druhů kostnatých ryb (*Sparus aurata* a *Dicentrarchus labrax*) v roce 2002 (Alvarez-Pellitero a Sitjà-Bobadilla 2002). Oocysty byly lokalizovány v epitelu žaludeční sliznice a jen velmi zřídka v epitelu tenkého střeva.

2008 *Cryptosporidium fragile*

Cryptosporidium fragile bylo nalezeno v žaludeční stěně ropuchy jihoasijské (*Duttaphrynus melanostictus*), která byla dovezena z Malajsie do České republiky (Jirků et al. 2008). Mimo tento popis nebyl tento druh nikdy u žádných jiných hostitelů detekován.

2015 *Cryptosporidium huwi*

Původně *Cryptosporidium* sp. piscine genotyp I byl nalezen v žaludku živorožky duhové (*Poecilia reticulata*). Oocysty *C. huwi* jsou svou velikostí velmi podobné druhu *Cryptosporidium molnari*, nicméně na základě genetické odlišnosti byly v roce 2015 popsány jako samostatný druh (Ryan et al. 2015).

2016 *Cryptosporidium proliferans*

Původně *Cryptosporidium muris* izolát TS03, který byl získán z přirozeně infikovaného hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) v Keni. Na základě biologických a molekulárních charakteristik byl tento izolát v roce 2016 popsán jako nový druh (Kváč et al. 2016).

2019 *Cryptosporidium proventriculi*

Holubová et al. (2019) popsali morfologické, biologické a molekulární vlastnosti tzv. *Cryptosporidium* sp. avian genotyp III a ustanovili tuto kryptosporidii jako samostatný druh.

2020 *Cryptosporidium bollandi*

Bolland et al. (2020) popsali *Cryptosporidium bollandi* jako jméno pro *Cryptosporidium piscine* sp. genotyp II na základě morfologické, biologické a molekulární charakterizace.

2.1.2. Systematika

Rod *Cryptosporidium* je řazen do třídy Apicomplexa, pro který je charakteristickým znakem přítomnost apikálního komplexu sloužícího k infekci hostitelské buňky (Fayer a Xiao 2007). Zařazení rodu *Cryptosporidium* v rámci výtrusovců se v průběhu let několikrát měnilo. Původně byli zástupci rodu *Cryptosporidium* řazeni mezi kokcidie, především na základě podobnosti morfologie a vývojového cyklu (Tyzzer 1907). Zajímavostí je, že již v roce 1910 Tyzzer, který kryptosporidie popsal a přiřadil je ke kokcidiím, vyslovil domněnku, že se pravděpodobně jedná o samostatnou skupinu vyznačující se odlišnostmi od kokcidií (Tyzzer 1910). Dalším z důkazů o nesprávnosti zařazení kryptosporidií ke kokcidiím byla neúčinnost těchto parazitů na léčbu přípravky používanými ke kontrole kokcidiózy (Abrahamsen et al. 2004). Důležitým milníkem ve studii taxonomického zařazení kryptosporidií byly fylogenetické analýzy, které odhalily jejich blízký vztah ke gregarinám (*Gregarinasina*) (Carreno et al. 1999). Příbuznost

kryptosporidií ke gregarinám byl pak potvrzen obdobnou morfologickou stavbou organel sloužících k přichycení k hostitelské buňce (Valigurová et al. 2007). Všechny výše uvedené skutečnosti nakonec vedly k přesunutí kryptosporidií z podtřídy Coccidia do nové podtřídy Cryptogregararia v rámci třídy Gregarinomorpha a řádu Cryptogregarida (Cavalier-Smith 2014; Ryan et al. 2016).

2.1.3. Vývojový cyklus

V současnosti je známo velké množství druhů a genotypů kryptosporidií, ale vývojový cyklus byl popsán pouze u pěti druhů kryptosporidií, a to u tří druhů savčích, *C. parvum* (Tyzzer 1912), *C. muris* (Tyzzer 1907; 1910) a *C. proliferans* (Melicherová et al. 2013).

Životní cyklus kryptosporidií je monoxenní, tedy probíhá pouze v jednom hostiteli a zahrnuje pohlavní i nepohlavní stádia (Fayer a Xiao 2007). K nakažení hostitele dochází fekálně-orální cestou, pozřením oocyst z kontaminované potravy či vody. Vývojový cyklus zahrnuje čtyři fáze, tedy excystaci, merogonii, gamogonii a sporogonii. Zajímavostí vývojového cyklu kryptosporidií je, že sporozoiti se nezanořují do cytoplazmy, ale zůstávají uloženi intracelulárně mimo cytoplazmu, epiplazmaticky (Alvarez-Pellitero a Sitjà-Bobadilla 2002; Ryan et al. 2015; Zahedi et al. 2021).

Nejpodrobněji byl popsán životní cyklus střevního druhu *C. parvum*, ale cykly ostatních druhů, jako například *C. baileyi*, *C. muris* nebo *C. proliferans*, se příliš neliší (Current et al. 1986; Kváč et al. 2016; Melicherová et al. 2013).

Excystace

Po pozření oocysty kryptosporidie vhodným hostitelem je prvním krokem k propuknutí infekce excystace. Stěna oocysty se otevře podél švu (sutura) na jednom pólu oocysty, ze které se uvolní čtyři infekční sporozoiti. Pro excystaci žaludečních kryptosporidií je potřeba pouze zvýšení teploty na teplotu těla hostitele po pozření oocysty, zatímco pro excystaci střevních kryptosporidií je nutné, aby se oocysty dostaly do kontaktu s kyselým prostředím žaludku a následně byly vystaveny pankreatickým enzymům (Smith et al. 2005; Widmer et al. 2007). Jaké jsou podmínky pro excystaci kryptosporidie infikující extraintestinální tkáň, např. tracheu, není známo. Sporozoiti, kteří excystují z oocysty, jsou pohybliví a k hostitelské buňce se přichycují pomocí apikálního komplexu (Wetzel et al. 2005). Sporozoiti se epicelulárně přemění na trofozoity (Valigurová et al. 2008).

Merogonie

Jádro trofozoita se rozdělí a nastává merogonie, což je opakované mnohonásobné nepohlavní dělení. U většiny dosud studovaných vývojových cyklů kryptosporidií byly

popsány dva typy merontů (schizontů), třetí typ meronta byl detekován pouze u ptačího druhu *C. baileyi* (Current et al. 1986).

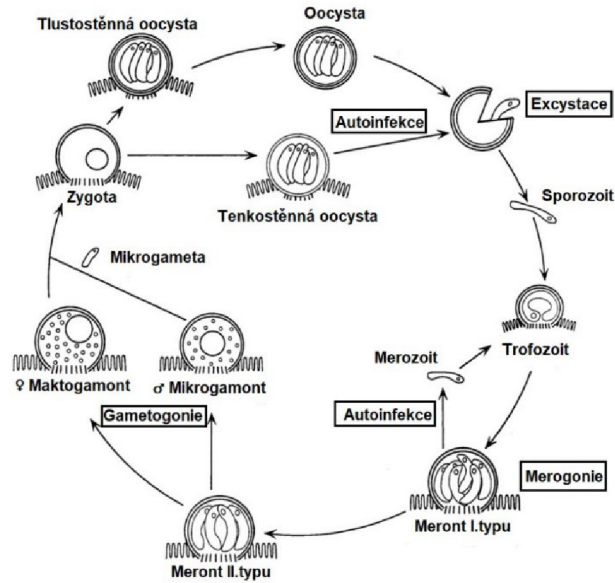
Jako první vznikají meronti I. typu, kteří se dělí na 6–8 merozoitů. Tito merozoiti následně opouští meront, infikují další hostitelské buňky a vyvíjejí se v další meronty I. nebo II. typu. Meronti II. typu se dělí na 4 merozoity, u druhu *C. baileyi* se meronti II. typu dělí na 8 merozoitů. Nedávná studie provedená pomocí transfikovaných sporozoitů *C. parvum* ukázala, že merozoiti II. typu se v *in vitro* nevyvíjejí v pohlavní stádia a pro další vývoj parazita jsou potřebné jen merozoiti I. typu nebo pouze osmi- jaderní merozoiti (English et al. 2022).

Gametogonie

Následuje gametogonie, sexuální rozmnožování, které spouští dle tradičního názoru meronti II. typu. Začnou se diferenciovat do mikrogamontového (samčího) nebo makrogamontového (samičího) stádia. Mikrogamonti jsou vícejaderní a následně z nich vznikají mikrogamety (16). Makrogamonti jsou jednojaderní a vznikají z nich makrogamety (1), ale poměr mikrogamotů a makrogamotů není znám (Fayer a Xiao 2007). Uvolněné mikrogamety splývají s makrogametou a výsledkem je jedno diploidní stádium – zygota. Zygota prodělá proces podobný meióze a vzniká oocysta (Clode et al. 2015).

Sporogonie

Při sporogonii dochází k meiotickému dělení jádra, a vznikají čtyři sporozoiti s redukováným, haploidním počtem chromozomů a reziduální tělísko. Sporulující oocysta je infekční pro další hostitele ihned po vyloučení z hostitele (Fayer et al. 1990; Liu et al. 2009; Fayer 2007). U druhu *C. parvum* byly popsány dva typy oocyst. Většina oocyst má silnou stěnu a opouští tělo hostitele s výkaly (druhy infikující epitel střeva či žaludku) nebo případně hlenem (druhy infikující plicní epitel). Přítomnost tenkostěnných oocyst je prokázána u 20 % z celkového počtu oocyst. Tyto oocysty excystují v těle hostitele a jsou zodpovědné za případy autoinfekce (Aldeyarbi a Karanis 2016). Schéma vývojového cyklu je uvedeno na Obrázku 1 (Slifko et al. 1997).



Obrázek 1. Vývojový cyklus *Cryptosporidium* spp. (Upraveno; Slifko et al. 1997).

2.1.4. Zdroj a přenos infekce

Kryptosporidiové infekce se šíří fekálně-orální cestou. Přenos může probíhat přímým kontaktem, tedy z infikovaného zvířete na člověka a naopak, ale také z člověka na člověka. Mezi nejčastější způsob přenosu patří kontaminovaná voda, která je znečištěná výkaly hospodářských zvířat, ale i volně žijících zvířat nebo člověka (Pohjola et al. 1986; Reif et al. 1989; Cacciò a Widmer 2014). Oocysty kryptosporidií jsou díky své trilaminární struktuře stěny velmi odolné a mohou přežít filtrace i chemické ošetření pitné vody. Dalším zdrojem nákazy mohou být živočišné produkty, zejména mléko a z něj vyrobené mléčné výrobky, které nebyly dostatečně pasterované (Djuretic et al. 1997; Gelletlie et al. 1997).

2.1.5. Klinické příznaky a terapie kryptosporidiózy

Mezi hlavní příznaky kryptosporidiózy řadíme průjem, žaludeční potíže, zvracení či horečku (Mac Kenzie et al. 1994). Dodnes neexistuje žádná 100% účinná léčba kryptosporidiové infekce, jedná se spíše o symptomatickou léčbu založenou na rehydrataci organismu tekutinami a podávání protiprůjmových preparátů (Jokipii a Jokipii 1986; Fayer a Xiao 2007). Navzdory dlouhodobému intenzivnímu zkoumání různých léků, které by byly účinné na terapii kryptosporidiózy, bohužel nejsou v současné době k dispozici žádné univerzální léky s vysokou účinností (Hommer et al. 2003; Mele et al. 2003; Fayer a Xiao 2007). Jediný v USA schválený lék je nitazoxanid, který je možno použít na léčbu dospělých a dětí starších jednoho roku. U tohoto léku nastává problém u léčby

kryptosporidie u pacientů s HIV, kdy ani zvýšené dávky či prodloužená léčba nemá žádný účinek (Amadi et al. 2009).

Vzhledem k vysoké prevalenci infekcí *C. parvum* či *C. hominis* v lidské populaci jsou všechny studie zaměřeny a léky testovány právě na střevní druhy kryptosporidií. Terapeutické účinky testovaných léků proti žaludečním druhům kryptosporidií nejsou zatím známy.

Další známý mechanismus, který je schopen vyléčit hostitele z kryptosporidie, je specifická imunitní odpověď. Studie, které sledovaly imunitní odpověď hostitele na kryptosporidiovou infekci, byly prováděny pouze na druhu *C. parvum*, což je střevní druh kryptosporidie (McDonald et al. 2013; Tyzzer 1912).

2.1.6. Prepatentní a patentní perioda

V průběhu infekce rozlišujeme prepatentní a patentní periodu. Prepatentní perioda je doba od inokulace/infekce po objevení se prvních vývojových stádií – oocyst. Délka prepatentní periody závisí na druhu kryptosporidie, druhu a věku hostitele a jeho imunitním stavu (Champelle et al. 1999). Prepatentní perioda byla popsána u mnoha druhů kryptosporidií na základě experimentálních infekcí. U střevních druhů kryptosporidií je délka prepatentní periody většinou v rozmezí 2–7 dnů. U žaludečních druhů je doba od nakažení do začátku vylučování oocyst delší, pohybující se v rozmezí 7–21 dnů (Tzipori 1983; DuPont et al. 1995).

Patentní perioda je naproti tomu označení pro dobu, kdy je kryptosporidie přítomna v hostiteli (Svobodová et al. 2013). Délky patentních period se výrazně liší u různých hostitelů v závislosti na jejich věku a imunitním stavu. Experimentálně byla prokázána patentní perioda u řady střevních druhů, například u *C. parvum* se patentní perioda pohybuje od 1 do 12 dní u telat (Tzipori 1983), ale například u *C. scrofarum* je patentní perioda delší než 30 dní u experimentálně infikovaných prasat (Kváč et al. 2013). Žaludeční kryptosporidie probíhá jako chronická infekce, kdy patentní perioda je výrazně delší oproti střevním druhům a v mnoha případech u hostitelů přetrvává jako celoživotní infekce (Lindsay et al. 2000; Masuno et al. 2006; Kváč et al. 2008).

2.1.7. Hostitelská specifita

Hostitelská specifita vyjadřuje schopnost parazita infikovat a dokončit svůj vývojový cyklus v jednom či ve více druzích hostitelů. K zjištění hostitelského spektra se využívají experimenty, kdy se infekčními oocystami kryptosporidií infikují odlišné druhy zvířat, než ze kterých byl izolát získán. V případě, že hostitel začne vylučovat oocysty, které jsou

geneticky shodné s oocystami z infekční dávky, lze považovat daného hostitele za vnímavého pro daný druh či genotyp kryptosporidií.

V rámci rodu *Cryptosporidium* můžeme rozlišit dvě skupiny kryptosporidií dle hostitelské specifity. První skupina je početně málo zastoupená a řadíme sem druhy s nízkou hostitelskou specifitou, tedy druhy, které jsou přirozeně infekční pro široké spektrum hostitelů. Do této skupiny můžeme zařadit například druhy *C. parvum*, *C. ubiquitum*, *C. baileyi* a *C. meleagridis* (Tyzzer 1912; Slavin 1955; Li et al. 2014).

Druhou skupinu tvoří druhy, které jsou specifické pro určité skupiny hostitelů. Do této skupiny můžeme zařadit například druhy *C. andersoni*, pro který je typickým hostelem skot (Anderson 1991; 1998; Esteban a Anderson 1995; Lindsay et al. 2000; Kváč a Vítovec 2003; Kváč et al. 2008), ale také druh *C. muris*, pro který jsou typickým hostitelem hlodavci (Anderson 1991; Fayer et al. 1991; Kváč et al. 2008; Ryan et al. 2003b). V rámci této skupiny můžeme ještě odlišit druhy, u kterých byl dosud popsán pouze jediný hostitel. Takovýmto případem je například *C. myocastoris*, druh parazitující u nutrií (Ježková et al. 2021a) nebo *C. huwi* parazitující u ryb (Ryan et al. 2015).

2.1.7.1. Kryptosporidie a kryptosporidióza koček

U koček byly kryptosporidiové infekce poprvé popsány v Japonsku, identifikovány a popsány jako druh *Cryptosporidium felis* (Iseki 1979), ale geneticky charakterizován byl tento druh až v roce 1998 (Sargent et al. 1998). Od první nákazy koček bylo popsáno mnoho dalších případů, ať už asymptomatických, tak symptomatických a mezi hlavní symptomy patřily přetrvávající průjem a úbytek na váze (Poonacha a Pippin 1982; Monticello et al. 1987).

Mtambo et al. (1991) uvádí, že prevalence kryptosporidií u koček je jak u domácích, tak u divokých koček velmi malá (8,1%). Všechny studie, které popisovaly kryptosporidiové infekce u koček, identifikovaly pouze druh *C. felis* (např. Morgan et al. 1998; Gasser et al. 2001; Ryan et al. 2003b; Hajdušek et al. 2004; Kváč et al. 2017). Vyjímkou jsou dva případy, kdy byly v trusu koček detekovány oocysty druhu *C. muris* (Santín et al. 2006; Pavlásek a Ryan 2007).

Ve studii, kterou provedli Santín et al. (2006) v Columbi, se jednalo o jednoletou kočku. S ohledem na vyšetření pouze jednoho vzorku, nebyla vyloučena možná pasáž oocyst pocházejících z infikovaného hlodavce (kořist). O rok později Pavlásek a Ryan (2007) popsali další případ přirozeně infikované kočky druhem *C. muris*. Zde byla pasáž vyloučena z důvodu dlouhodobého vylučování oocyst kočkou. Byly popsány morfologické a genetické

vlastnosti izolátu kryptosporidie, který byl identifikován jako *C. muris*. Oocysty, které byly získány z infikované kočky zakoupené ve zverimexu, byly životaschopné a infekční a byly přeneseny do laboratorních myší. U kočky se sedm dní od zakoupení objevily gastrointestinální problémy, na které nezabíraly žádné veterinární léčivé preparáty. I přes neúspěšnou léčbu se po 2 měsících zdravotní stav kočky vrátil do normálu.

Cryptosporidium muris infikuje především hlodavce, ale byly popsány také přirozené infekce u celé řady dalších hostitelů jako například u křečka, veverky, sibiřské veverky (*Eutamias sibiricus*), myšice lesní (*Apodemus sylvaticus*), hraboše polního (*Clethrionomys glareolus*), nebo také člověka (Chalmers et al. 1997; Torres et al. 2000; Hůrková et al. 2003; Xiao et al. 2004a).

Mimo výše uvedené, byl druh *C. muris* experimentálně přenesen do psů, králíků, jehňat a koček (Iseki et al. 1989). Ve zmíněné studii byly kočky (n=3) experimentálně infikovány *C. muris* RN66. U všech koček byla zjištěna masivní infekce s intezitou odpovídající až 10×10^6 oocyst za jeden den. Prepatentní doba byla 15–21 DPI. Nicméně i přes velmi vysokou intenzitu infekce nebyly u experimentálně infikovaných koček pozorovány žádné klinické příznaky (Iseki et al. 1989).

2.1.8. Žaludeční kryptosporidie savců

Jak již bylo výše zmíněno, savci jsou parazitováni třemi druhy žaludečních kryptosporidií, které se od sebe liší geneticky a biologicky. V rámci jednotlivých druhů byla popsána řada izolátů, které se od sebe odlišují biologickými vlastnostmi a jsou považovány za izoláty příslušného druhu. Níže je uveden přehled a charakteristika jednotlivých izolátů.

CRYPTOSPORIDIUM MURIS

Morfologie: *Cryptosporidium muris* měří přibližně 6,3–8,1 (průměr = 7,5) × 5,0–6,6 (průměr = 5,7) μm s poměrem délky k šířce 1,35 (Kváč et al. 2016). Oocysty jsou oválné a větší než oocysty *C. parvum* (Uni et al. 1987).

Hostitelská specifita: *Cryptosporidium muris* je infekční pro hlodavce, především z čeledi myšovitých (*Muridae*) a křečkovitých (*Criceridae*). Experimentálně byly prokázány infekce i u jiných druhů zvířat jako například u veverky, myšice lesní (*Apodemus sylvaticus*), hraboše polního (*Clethrionomys glareolus*), morčete, králíka, psa, kočky nebo také člověka (Iseki et al. 1989; Xiao et al. 2004a).

Lokalizace: *Cryptosporidium muris* infikuje pouze žaludeční žlázy (Tyzzer 1907; 1910).

Klinické příznaky: Infekce *C. muris* probíhá obvykle asymptomaticky a nebyly prokázány ani výrazné zánětlivé procesy v žaludeční sliznici (Iseki et al. 1989; Özkul a Aydin 1994).

***CRYPTOSPORIDIUM MURIS* (izolát CB03)**

Morfologie: Oocysty tohoto izolátu mají elipsoidní tvar a měří $7,49 \pm 0,13 \times 5,70 \pm 0,10 \mu\text{m}$ s indexem tvaru 1,32 (Kváč et al. 2008; Wang et al. 2021).

Hostitelská specifita: Přirozeně byl tímto izolátem infikován velbloud dvouhrbý (*Camelus bactrianus*). Experimentálně se podařila prokázat infekčnost tohoto izolátu pro laboratorní myši (Kváč et al. 2008; Wang et al. 2021).

Lokalizace: *Cryptosporidium muris* izolát CB03 byl detekován ve žláznaté části žaludku experimentálně infikovaných hlodavců (Kváč et al. 2008). Obdobné izoláty pocházející z velbloudů dvouhrbých byly u těchto hostitelů nalezeny ve slezu (Anderson 1991).

Klinické příznaky: U experimentálně inokulovaných myší infekce probíhá asymptomaticky. Prepatentní perioda se u myší pohybuje mezi 7 a 8 DPI a patentní 27 DPI (Kváč et al. 2008; Wang et al. 2021).

***CRYPTOSPORIDIUM MURIS* (izolát RN66)**

Morfologie: Oocysty tohoto izolátu byly naměřeny ve dvou velikostních formách. Malá forma měří $5,3 \times 4,8$ ($5,0\text{--}6,0 \times 4,0\text{--}5,5$) μm a velká forma měří $8,4 \times 6,3$ ($7,5\text{--}9,8 \times 5,5\text{--}7,0$) μm (Iseki 1986).

Hostitelská specifita: Izolát byl získán z přirozeně infikovaného potkana obecného (*Rattus norvegicus*), ale experimentálně inokulované různé kmeny myší byly k infekci tímto izolátem také vnímavé (Iseki et al. 1989; Iseki 1986).

Lokalizace: Tento izolát infikuje také pouze žláznatou část žaludku (Iseki et al. 1989).

Klinické příznaky: Prepatentní perioda se pohybuje okolo 5 DPI a patentní perioda přibližně 34–75 DPI. U žádné experimentálně infikované myši nebyly pozorovány žádné klinické příznaky (Iseki et al. 1989).

***CRYPTOSPORIDIUM MURIS* (izolát MCR)**

Morfologie: Velikost oocyst *C. muris* izolát MCR je menší než *C. muris* izolát RN66 a měří $7,80 \pm 0,56 \times 5,89 \pm 0,36 \mu\text{m}$ (Rhee et al. 1991).

Hostitelská specifita: Tento izolát byl získán z korejské myši (*Apodemus peninsulae*) a následně byl dlouhodobě udržován v SPF laboratorních myších. Experimentálně byla prokázána také vnímavost křečka zlatého (*Mesocricetus auratus*), kozy nebo také ovce (Rhee et al. 1998; 1999).

Lokalizace: Oocysty infikují žláznatou část žaludku myši (Rhee et al. 1991).

Klinické příznaky: U experimentálně infikovaných myši byla prepatentní perioda 5–6 DPI a patentní perioda se pohybovala od 62 DPI do 65 DPI, nicméně infekce probíhala asymptomaticky a u myši se neprojeví žádné klinické příznaky (Rhee et al. 1991).

***CRYPTOSPORIDIUM MURIS* (izolát z kočky – bez označení)**

Morfologie: Oocysty tohoto izolátu měří $8,0 \times 4,8 \mu\text{m}$ s indexem tvaru 0,6 (Pavlásek a Ryan 2007).

Hostitelská specifita: Tento izolát byl získán z přirozeně infikované kočky, která byla zakoupená ve zverimexu. Experimentálně se podařilo oocysty přenést do laboratorních myši, tedy do typického hostitele *C. muris*.

Lokalizace: *Cryptosporidium muris* získané z kočky je taktéž lokalizováno v žaludku (Pavlásek a Ryan 2007).

Klinické příznaky: U kočky se infekce *C. muris* projevila gastroenteritidou a zvracením. U experimentálně inokulovaných myši se infekce projevila asymptomaticky s prepatentní periodou 11 DPI a patentní periodou 42 dní (Pavlásek a Ryan 2007).

***CRYPTOSPORIDIUM MURIS* (izolát Kawatabi)**

Morfologie: Oocysty tohoto izolátu mají velikost $5,70 \pm 0,59 \times 7,66 \pm 0,64 \mu\text{m}$ s indexem tvaru 1,36 (Hikosaka a Nakai 2005).

Hostitelská specifita: *Cryptosporidium muris* Kawatabi byl vyizolován z myšice východní (*Apodemus speciosus*) v Japonsku. Experimentálně byl tento izolát infekční také pro laboratorní myši (Hikosaka a Nakai 2005).

Lokalizace: Oocysty jsou lokalizované v žaludečních žlázách, které jsou zvětšené (Hikosaka a Nakai 2005).

Klinické příznaky: Ani u přirozeně infikovaných myšic východních ani u laboratorních myši nebyly pozorovány žádné klinické příznaky (Hikosaka a Nakai 2005).

***CRYPTOSPORIDIUM PROLIFERANS* (izolát TS03)**

Morfologie: *Cryptosporidium proliferans* měří 6,8–8,8 (průměr = 7,7) \times 4,8–6,2 (průměr = 5,3) μm s poměrem délky k šířce 1,48 (Kváč et al. 2016).

Hostitelská specifita: Typovým hostitelem tohoto izolátu je hlodoun východoevropský (*Tachyoryctes splendens*). Další přirozeně infikovaní hostitelé jsou například osel africký (*Equus africanus*; Laatanma et al. 2015), veverka východní (*Sciurus carolinensis*; Feng et al. 2007), buvol africký (*Syncerus caffer*; Sak et al. 2013) nebo také kůň (*Equus caballus*; Kváč et al. 2016). Mezi experimentální hostitele, kteří jsou vnímaví k tomuto

izolátu, můžeme zařadit například mastomyš (*Mastomys coucha*), myš domácí (*Mus musculus*) - kmen BALB/c a SCID, ale také hraboše syslího (*Lasiopodomys brandtii*) (Kváč et al. 2008; 2009a; Jalovecká et al. 2010; Modrý et al. 2012).

Lokalizace: *Cryptosporidium proliferans* infikuje žaludek, konkrétně žláznatou část (Kváč et al. 2016).

Klinické příznaky: Patentní perioda u imunokompetentních myši BALB/c se výrazně neliší od infekce *C. muris*. Nicméně patentní perioda u mastomyši infikovaných *C. proliferans* je mnohem delší a vylučují oocysty s větší intenzitou než u infekce *C. muris*. Infekce *C. proliferans* způsobuje významné klinické a patologické změny, konkrétně úbytek hmotnosti a masivní zvětšení žaludeční sliznice (Kváč et al. 2016).

CRYPTOSPORIDIUM ANDERSONI (izolát VS 1742)

Morfologie: Oocysty jsou strukturálně podobné oocystám *C. muris* a měří $8,4 (\pm 0,3) \times 6,2 (\pm 0,2) \mu\text{m}$ s indexem tvaru 1,35 (Lindsay et al. 2000).

Hostitelská specifita: *Cryptosporidium andersoni* bylo poprvé popsáno z trusu tura domácího (*Bos taurus*). Tento izolát *C. andersoni* není infekční pro laboratorní myši (Koudela et al. 1998; Lindsay et al. 2000).

Lokalizace: Oocysty *C. andersoni* infikují především žlázy slezu skotu (Lindsay et al. 2000).

Klinické příznaky: Infekce tímto druhem bývá ve většině případů asymptomatická, nicméně u infikovaného skotu byl pozorován pokles produkce mléka a menší váhový přírůstek (Esteban a Anderson 1995).

CRYPTOSPORIDIUM ANDERSONI (izolát Kawatabi)

Morfologie: Oocysty tohoto izolátu mají vejčitý tvar a měří $7,4\text{--}7,6 \times 5,1\text{--}5,9 \mu\text{m}$ (Satoh et al. 2003).

Hostitelská specifita: *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi byl poprvé popsán u volně se pasoucího skotu na farmě v Japonsku (Satoh et al. 2003). Experimentálně bylo prokázáno, že tento izolát *C. andersoni* je infekční také pro imunodeficitní SCID myši (Satoh et al. 2003; Matsubayashi et al. 2005).

Lokalizace: Stejně jako u *C. andersoni* získaného ze skotu v USA je infekce lokalizovaná ve sliznici slezu nebo žláznaté části žaludu myši (Satoh et al. 2003).

Klinické příznaky: Infekce tímto druhem probíhá asymptomaticky, jak u přirozeně infikovaného skotu domácího, ale také nebyly pozorovány klinické příznaky u žádné experimentálně inokulované myši (Satoh et al. 2003; Masuno et al. 2014).

3. Cíle práce

- Zpracovat literární rešerši o tématu.
- Studovat biologické a molekulární charakteristiky izolátu *Cryptosporidium muris* CAT21 získaného z přirozeně infikované kočky domácí.
- Porovnat výsledky s literaturou.
- Porovnat tento izolát s dalšími izoláty *C. muris*, které přirozeně infikují myši, potkany a velbloudy.

4. Materiál a metodika

4.1. Materiál

4.1.1. Paraziti

- *Cryptosporidium muris* CAT21: získán z přirozeně infikované kočky domácí (*Felis catus*).
- *Cryptosporidium proliferans* TS03: získán z hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*). Izolát je dlouhodobě udržován v imunodeficitních SCID myších a mastomyších (*Mastomys coucha*) na Parazitologickém ústavu BC AVČR, v.v.i., Česká republika.
- *Cryptosporidium muris* RN66: získán z potkana obecného (*Rattus norvegicus*). Izolát je dlouhodobě udržován v imunodeficitních SCID myších na Parazitologickém ústavu BC AVČR, v.v.i., Česká republika.
- *Cryptosporidium muris* CB03: získán z velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*). Izolát je dlouhodobě udržován v imunodeficitních SCID myších na Parazitologickém ústavu BC AVČR, v.v.i., Česká republika.

4.1.2. Experimentální zvířata

- imunodeficientní myši SCID (*Mus musculus*) (Charles River, Germany)
- imunokompetentní myši BALB/c (*Mus musculus*) (Charles River, Germany)
- INTERFERON- γ -KO myši (INF- γ -KO, *Mus musculus*) (Charles River, Germany)
- Mastomyš (*Mastomys coucha*, vlastní chov PaÚ BC AV ČR, v.v.i.)

Myši byly chovány za standardních podmínek v oddělených plastových boxech ve zvířinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i. v Českých Budějovicích. Režim ve zvířinci byl 12 hodin světla a 12 hodin tmy při teplotě 22 °C, relativní vzdušná vlhkost 50–55 %, krmena byla komerční granulovanou směsí pro hlodavce (Altromin 1314) a napájena vodou *ad libitum*.

4.2. Metody

4.2.1. Barvení kryptosporidií

Na podložní sklo byl proveden tenký nátěr trusu, zafixován pomocí methanolu a protažený plamenem. Vzorky byly obarveny metodou anilin-karbol-methylvioletí (Miláček a Vítovec 1985), metodou dle Ziehl-Neelsena (Henriksen a Pohlenz 1981) a auramin-fenolem (Casemore et al. 1985). Dále byly využity *Cryptosporidium* specifické protilátky konjugované s FITC značící stěnu oocysty (IFA; Cryptosporidium IF Test, Cryptocel, Cellabs Pty Ltd., Brookvale, Austrálie).

4.2.1.1. Barvení nátěru trusu anilin-karbol-methyl-violetí

Detekce oocyst kryptosporidií ve vzorcích trusu byla provedena metodou specifického barvení nátěru (Miláček a Vítovec 1985). Pro následnou kvantifikaci infekce byla podložní sklička před a po nátěru zvážena s přesností na 3 desetinná místa.

Roztoky a chemikálie:

- roztok methylvioletí: 0,6 g methyl violetí, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml ethanolu, 70 ml deionizované vody (dH₂O)
- roztok 2% kyseliny sírové
- tartrazin: 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

Pracovní postup:

1. Sklo před nátěrem zvážit na 3 desetinná místa.
2. Špejlí rozetřít trus do slabého nátěru na podložní skličko.
3. Sklo s nátěrem trusu opět zvážit na 3 desetinná místa.
4. Zafixovat skličko methanolem v plameni.
5. Zafixovaná sklička barvit v roztoku methylvioletí po dobu 30 minut.
6. Opláchnout pod tekoucí vodou.
7. Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 30 sekund.
8. Opláchnout pod tekoucí vodou.
9. Dobarvit v tartrazinu po dobu 5 minut.
10. Opláchnout pod tekoucí vodou a nechat sušit.
11. Sklička prohlížet světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Vyhodnocení: Oocysty kryptosporidií se barví temně fialově na žlutém, žlutohnědém nebo světle fialovém pozadí.

4.2.1.2. Barvení Ziehl-Neelsen v modifikaci dle Henriksena a Pohlenze (1981)

Roztoky a chemikálie:

- roztok karbolfuchsinu: 2,5 ml rozpuštěných fenolových krystalů, 5 ml 100% ethanolu, 0,5 g práškového basického fuchsinu, 50 ml dH₂O
- 1% kyselý alkohol: 1 ml HCl, 100 ml 70% ethanolu
- 0,8% fast green zeleň: 0,8 g prášku light green, 100 ml dH₂O

Pracovní postup:

1. Sklo před nátěrem zvážit na 3 desetinná místa.
2. Špejlí rozetřít trus do slabého nátěru na podložní sklíčko.
3. Sklo s nátěrem trusu opět zvážit na 3 desetinná místa.
4. Zafixovat sklíčko methanolem v plameni.
5. Do roztoku karbolfuchsinu vložit zafixované sklíčko na 45 minut.
6. Opláchnut pod tekoucí vodou.
7. Odbarvit v 1% kyselém alkoholu, dokud nepřestane z nabarveného sklíčka odtékat červená barva.
8. Opláchnut pod tekoucí vodou.
9. Barvit světlou zelení po dobu 1 minuty.
10. Opláchnut pod tekoucí vodou a nechat sušit.
11. Sklíčka prohlížet světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Vyhodnocení: Oocysty kryptosporidií se barví sytě červeně na zeleném pozadí.

4.2.1.3. Fluorescenční mikroskopie po značení stěny oocyst *Cryptosporidium* rodově specifickými protilátkami konjugovanými s FITC

Roztoky a chemikálie:

- Crypto Cell reagent – fluorescenčně značené specifické monoklonální protilátky proti stěně oocysty
- Mounting fluid, které jsou součástí komerčního kitu (*Cryptosporidium* IF Test, Cryptocel)

Pracovní postup:

1. Na jamkové sklo kápnout 20 µl vzorku s oocystami a nechat zaschnout.
2. Fixovat 5 minut v methanolu a následně nechat zaschnout při laboratorní teplotě.
3. Přidat 10 µl Crypto Cell Reagentu.
4. Sklíčko inkubovat v temnu ve vlhké komůrce při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.
5. Sklíčko omýt 1 minutu v PBS.

6. Sklíčko osušit (může být uchováno 24 hodin při 2–8 °C).
7. Před prohlížením kápnout na sklíčko 10 µl mounting fluid, překrýt krycím sklíčkem.
8. Prohlížet skla fluorescenčním mikroskopem s filtrem WB 515 nm při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Vyhodnocení: Oocysty kryptosporidií mají zelenou fluorescenci na tmavém pozadí.

4.2.1.4. Barvení auramin-fenolem (Casemore et al. 1985)

Roztoky a chemikálie:

- 0,5% roztok auramin-fenolu: 0,5 g o-auramin, 3,2 g fenolu, 32 ml ethanolu, doplnit do 100 ml dH₂O
- roztok 3% kyseliny chlorovodíkové v 70% methanolu
- 0,1% manganistan draselný

Pracovní postup:

1. Špejlí rozetřít trus do slabého nátěru na podložní sklíčko.
2. Fixovat v methanolu – nakapat methanol na vzorek a nechat zaschnout při laboratorní teplotě.
3. Barvit 0,5% auramin-fenolem po dobu 10 minut.
4. Opláchnut pod tekoucí vodou.
5. Odbarvit 3% HCl v 70% methanolu po dobu 5 minut.
6. Opláchnut pod tekoucí vodou.
7. Dobarvit 0,1% manganistanem draselným po dobu 30 sekund.
8. Prohlížet skla fluorescenčním mikroskopem s filtrem WB 515 nm při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Vyhodnocení: Oocysty kryptosporidií mají zeleno-žlutou fluorescenci na tmavém pozadí.

4.2.2. Molekulární vyšetření

4.2.2.1. Izolace DNA z trusu

Z trusu byla vyizolovaná DNA pomocí komerčně dodávaného kitu GeneAll[®] Exgene[™] Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology, co., Ltd., Soul, Jižní Korea).

Materiál a chemikálie:

- 1,5 ml mikrozkuhavky Safe-Lock Tube
- skleněné kuličky (0,5 mm) a zirkonové kuličky (2 mm)
- FL pufr
- 0,7 ml mikrozkuhavky s kolonkami EzPass
- 0,7 ml mikrozkuhavky s mini spin kolonkami

- EB pufr
- PB pufr
- NW pufr

Pracovní postup:

1. 200 mg trusu dát do Safe-Lock Tube, přidat 0,5 ml skleněných kuliček a 5 zirkonových kuliček.
2. Napipetovat 1 ml FL pufru.
3. Zvortexovat a zhomogenizovat vzorek pomocí BeadBeateru (FastPrepTM Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
4. Po homogenizaci nechat vzorek inkubovat při laboratorní teplotě 5 minut.
5. Centrifugovat 5 minut při 14 000 g.
6. Veškerý supernatant přepipetovat na mikrozkušavku EzPass, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
7. Vylít odpad ze sběrné části EzPass mikrozkušavky, napipetovat 100 µl EB pufru na kolonku, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
8. Vyhodit kolonku, do sběrné mikrozkušavky napipetovat 500 µl PB pufru, promíchat pipetováním, přenést všechnen obsah na mini spin kolonku, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
9. Vylít obsah ze sběrné mikrozkušavky a na střed kolony napipetovat 500 µl NW pufru, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
10. Vylít obsah ze sběrné mikrozkušavky a opět centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
11. Přenést kolonku na čistou mikrozkušavku a napipetovat 200 µl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
12. Vyzolovanou DNA v mikrozkušavce skladovat při teplotě -20 °C.

4.2.2.2. Izolace DNA z tkáně

Pro prokázání přítomnosti specifické DNA kryptosporidií v konkrétních orgánech byla ze vzorků orgánů vyzolovaná DNA pomocí DNeasy Blood & Tissue kitu (QIAGEN).

Materiál a chemikálie:

- 1,5 ml mikrozkušavky
- skleněné kuličky (0,5 mm) a zirkonové kuličky (2 mm)
- mini spin kolonka
- ATL pufr

- proteináza K
- AL pufr
- EtOH
- AW 1 pufr
- AW 2 pufr
- AE pufr

Pracovní postup:

1. Do mikrozkušavky nastříhat přibližně 200 mg tkáně.
2. Přidat 0,5 ml skleněných kuliček a 5 zirkonových kuliček.
3. Připipetovat 180 µl ATL pufru a vortexovat.
4. Homogenizovat vzorek pomocí BeadBeateru (FastPrep™ Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
5. Centrifugovat přibližně 10 sekund při 6 000 g, připipetovat 20 µl proteinázy K.
6. Inkubovat 1 hodinu při 56 °C, během inkubace pravidelně míchat.
7. Centrifugovat 10 sekund při 6 000 g.
8. Připipetovat 200 µl AL pufru, vortexovat.
9. Připipetovat 200 µl 96 % EtOH, vortexovat, centrifugovat 10 sekund při 6 000 g.
10. Veškerý supernatant přepipetovat na Mini spin kolonku, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.
11. Vylít odpad ze sběrné zkumavky.
12. Připipetovat 500 µl AW1 pufru, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g, odstranit odpad ze sběrné zkumavky.
13. Připipetovat 500 µl AW2 pufru, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g, odstranit odpad ze sběrné zkumavky.
14. Sběrné zkumavky vyhodit, nahradit je novými mikrozkušavkami, přímo na membránu kolony napipetovat 200 µl AE pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.
15. Vyizolovanou DNA v mikrozkušavce skladovat při teplotě -20 °C.

4.2.2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost specifické DNA kryptosporidií byla ve vyizolované DNA stanovena pomocí amplifikace fragmentů genu kódujícího malou podjednotku rRNA (*SSU*; ~830 bp; Xiao et al. 1999; Jiang et al. 2005), aktin (~ 1066 bp; Sulaiman et al. 2002), 70 kDA Heat Shock Protein (*HSP70*; ~ 515 bp; Kváč et al. 2016), a Thrombospondin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium*-1 (*TRAP-C1*; ~ 955 bp; Kváč et al. 2016).

DNA byla amplifikována v termocykleru za použití programu:

1. Počáteční denaturace po dobu 3 minuty při 94 °C.
2. 35 cyklů zahrnující denuraci 45 s při 94 °C, nasedací teploty primerů (Tabulka 2) a extenzi 60 s při 72 °C.
3. Finální extenze 7 minut při 72 °C.

Sekundární reakce byla shodná s primární, ale bylo použito 2 µl produktu primární PCR jako templátová DNA. Jako negativní kontrola byla použita PCR voda a jako pozitivní kontrola byla použita DNA *C. parvum*. Protokoly pro reakční směsi PCR jsou uvedeny v Tabulce 2. Sety primerů pro amplifikaci části genu jsou uvedeny v Tabulce 3–6.

Tabulka 2. Rozpis koncentrací reagensií primární a sekundární reakce PCR reakce.

PRIMÁRNÍ REAKCE			SEKUNDÁRNÍ REAKCE		
Reagencie	Koncentrace	Objem (µl)	Reagencie	Koncentrace	Objem (µl)
H ₂ O	----	19,35	H ₂ O	----	19,35
buffer	1×	3,00	buffer	1×	3,00
MgCl ₂	2,5 mM	3,00	MgCl ₂	2,5 mM	3,00
BSA	10 mg / ml	1,20	BSA	10 mg / ml	1,20
DNTPs	200 µM	0,60	DNTPs	200 µM	0,60
F1	100 nM	0,30	F2	100 nM	0,30
R1	100 nM	0,30	R2	100 nM	0,30
taq	1,25 U	0,25	taq	1,25 U	0,25
DNA	----	2	DNA	----	2
Celkem		30	Celkem		30

Tabulka 3. Sety primerů a nasedací teploty pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku *Cryptosporidium* spp. (Xiao et al. 1999; Jiang et al. 2005).

SSU										
PRIMÁRNÍ REAKCE 50 °C										
F1	TTC	TAG	AGC	TAA	TAC	ATG	CG			
R1	CCC	ATT	TCC	TTC	GAA	ACA	GGA			
SEKUNDÁRNÍ REAKCE 55 °C										
F2	GGA	AGG	GTT	GTA	TTT	ATT	AGA	TAA	AG	
R2	AAG	GAG	TAA	GGA	ACA	ACC	TCC	A		

Tabulka 4. Sety primerů a nasedací teploty pro amplifikaci části genu kódujícího aktin *Cryptosporidium* spp. (Sulaiman et al. 2002).

AKTIN										
PRIMÁRNÍ REAKCE 50 °C										
F1	ATG	RGW	GAA	GAA	GWA	RYW	CAA	GC		
R1	AGA	ARC	AYT	TTC	TGT	GKA	CAA	T		
SEKUNDÁRNÍ REAKCE 45 °C										
F2	CAA	GCW	TTR	GTT	GTT	GAY	AA			
R2	TTT	CTG	TGK	ACA	ATW	SWT	GG			

Tabulka 5. Sety primerů a nasedací teploty pro amplifikaci části genu kódujícího *HSP70* *Cryptosporidium* spp. (Kváč et al. 2016).

HSP70										
PRIMÁRNÍ REAKCE 52 °C										
F1	GCT	CGT	GGT	CCT	AAA	GAT	AA			
R1	ACG	GGT	TGA	ACC	ACC	TAC	TAA	T		
SEKUNDÁRNÍ REAKCE 50 °C										
F2	ACA	GTT	CCT	GCC	TAT	TTC	A			
R2	GCT	AAT	GTA	CCA	CGG	AAA	TAA			

Tabulka 6. Sety primerů a nasedací teploty pro amplifikaci části genu kódujícího *TRAP-C1* *Cryptosporidium* spp. (Kváč et al. 2016)

TRAP-C1										
PRIMÁRNÍ REAKCE 55 °C										
F1	GGA	GAT	CCT	TTA	TGT	GTT	G			
R1	CCT	GTA	CAA	ATT	CTT	CTG	AT			
SEKUNDÁRNÍ REAKCE 53 °C										
F2	GCT	CAG	AAG	ATC	CAA	GTA				
R2	GAT	TGC	TCT	GAA	CTA	GGA				

4.2.2.4. Gelová elektroforéza

Výsledný sekundární PCR produkt byl detekován na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu (EtBr) a vizualizován pomocí UV záření (302 nm) transiluminátorem (Ultra-Lum Inc, USA) a dokumentován (High Performance UV Transilluminator, Biotech, Česká republika).

Roztoky a chemikálie:

- 50× TAE pufr: 242 g tris báze, 47,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA
- agaróza (Biotech, Heidelberg, Německo)
- ethidium-bromid (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne, Tartu, Estonia)

Příprava agarózového gelu:

1. V Erlenmeyerově baňce navážit agarózu a následně smíchat s 1× TAE pufrém:
 - nosič malý: 0,4 g agarózy / 40 ml 1× TAE pufru
 - nosič střední: 0,8 g agarózy / 80 ml 1× TAE pufru
 - nosič velký: 1,2 g agarózy / 120 ml 1× TAE pufru
2. Vložit do mikrovlnné trouby a zahřívát, dokud se všechna agaróza nerozpustí.
3. Erlenmeyerovu baňku s gelem ochladit pod tekoucí vodou na teplotu cca 50 °C (baňka je udržitelná v ruce).
4. Přidat 1 µl EtBr (0,2 µg/ml) a roztok promíchat.
5. Nalít agarózový gel do nosiče, vložit hřeben a gel nechat 5–10 minut ztuhnout.
6. Po ztuhnutí vložit gel do elektroforetické vany tak, aby starty ležely u záporné elektrody.
7. Po vyjmutí hřebenu nanést do první jamky 10 µl ladderu (100 bp) do následujících jamek 20 µl sekundárního PCR produktu.
8. Nechat gel vyvíjet při 70 V dokud nedojde k separaci všech fragmentů.
9. Gel vložit do UV transiluminátoru a vyhodnotit pozitivní a negativní vzorky.

4.2.2.5. Izolace z gelu

Fragmenty DNA po elektroforetické separaci vhodné k osekvenování byly vyizolovány pomocí kitu Gen Elute (Sigma) podle doporučení výrobce.

Součásti kitu:

- Column Preparation solution
- Gel Solubilization Solution
- Wash Solution Concentrate G

- Elution Solution

Pracovní postup:

1. Fragment DNA vyříznout z gelu čistým skalpelem a přendat do připravené eppendorfky.
2. Do eppendorfky s fragmentem gelu přidat 500 µl Gel Solubilization Solution.
3. Eppendorfku ponechat v termobloku po dobu 10 minut při 50 °C a každé 2–3 minuty zkontrolovat rozpuštění gelu promícháním.
4. Do termobloku vložit PCR vodu na eluci a zahřát na teplotu 65 °C.
5. Na již sestavenou kolonu (Binding Column G) napipetovat 500 µl Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
6. Ke vzniklému žlutému roztoku připipetovat 150 µl isopropanolu a promíchat.
7. Na kolonu přenést veškerý objem vzorku pomocí pipety a kolonu centrifugovat po dobu 1 minuty při 16 000 g.
8. Vylít odpad ze sběrné zkumavky.
9. Na kolonu připipetovat 700 µl Wash Solution G a centrifugovat po dobu 1 minuty při 16 000 g.
10. Vylít odpad ze sběrné zkumavky.
11. Kolonu centrifugovat 1 minutu při 16 000 g bez jakýchkoli přidaných roztoků.
12. V centrifuze otočit kolonu o 180 ° a znovu centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
13. Přendat kolonu na 1,5 ml eppendorfku a provést eluci napipetováním 30 µl PCR vody predehřáté na 65 °C přímo na střed kolony.
14. Eppendorfku inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a poté centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.

4.2.2.6. Sekvenování vzorků a fylogenetické analýzy

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány pomocí sekundárních PCR primerů komerční firmou SeqMe, s.r.o. (Dobříš, Česká republika).

Získané nukleotidové sekvence byly analyzovány v programu Chromas Pro 2.4.1. (Technelysium, Pty, Ltd., SouthBrisbane, Austrálie). Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank pomocí programu MAFFT verze 7 (Mafft, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

4.2.3. Purifikace oocyst

Před samotným čištěním bylo zapotřebí trus rozmělnit a zbavit větších částic.

Pracovní postup:

1. Trus zhomogenizovat v třecí misce a zředit dH₂O.
2. Přepasírovat pomocí tloučku nebo špachtle přes sítko do kádinky. V průběhu sítko promývat dH₂O, aby nedocházelo k velkým ztrátám oocyst.
3. Sítko několikrát promývat vodou a získanou suspenzi dvakrát přecedit. Takto připravený materiál použit na čištění na sacharózovém gradientu (Arrowood a Sterling 1987) a dočistit pomocí cesium chloridového gradientu.

4.2.3.1. Sacharózový gradient

Roztoky a chemikálie:

- Sheaterův roztok: 405 g cukru v 259 ml dH₂O
- PBS (Phosphate Buffered Saline): rozpustit 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄×12 H₂O, 2,4 g KH₂PO₄ do 1000 ml dH₂O a upravit pH 7,2–7,4
- 1 % T-PBS (PBS Tween): 0,5 ml Tween 20 + 999,5 ml PBS

Pracovní postup:

1. Navrstvit gradient do skleněných kyvet:
 - Dolní vrstva: 30 ml Sheater 1+2 (1 díl Sheater + 2 díly 1% PBS Tween).
 - Střední vrstva: 30 ml Sheater 1+4 (1 díl Sheater + 4 díly 1% PBS Tween).
 - Horní vrstva: 15 ml homogenizovaného vzorku.
2. Centrifugovat 20 minut při 1000 g a teplotě 4 °C.
3. Odsát horní čirou vrstvu.
4. Přemístit prstenec na rozhraní dolní a střední vrstvy do nových kyvet.
5. Doplnit kyvety dH₂O do původního objemu.
6. Centrifugovat 20 minut při 1500 g a teplotě 4 °C.
7. Odsát supernatant nad sedimentem, znovu naředit sediment (obsahuje oocysty) nadbytkem dH₂O a centrifugovat 20 minut při 1500 g a teplotě 4 °C.
8. Předchozí krok 2× opakovat a následně přenést sediment do čistých zkumavek.
9. Skladovat vzorky v PBS při teplotě 4 °C.

4.2.3.2. Cesium chloridový gradient

Roztoky a chemikálie:

- roztok cesium chloridu: 21,07 g CsCl do 100 ml dH₂O, (výsledný roztok $\rho = 1,15$ g/ml)
- PBS: rozpustit 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄×12 H₂O, 2,4 g KH₂PO₄ do 1000 ml dH₂O a upravit pH 7,2–7,4

Pracovní postup:

1. Napipetovat do čisté 2 ml mikrozkušavky 1 ml CsCl.
2. Do zkumavky s CsCl navrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
3. Centrifugovat 3 minuty při 16000 g při teplotě 20 °C.
4. Přepipetovat supernatant do 50 ml zkumavek a sediment vyhodit.
5. Zkumavku doplnit dH₂O a centrifugovat 20 minut při 1370 g při teplotě 4 °C.
6. Odsát supernatant na objem 5 ml.
7. Doplnit zkumavku dH₂O, vortexovat a centrifugovat při teplotě 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g (opakovat 3×).
8. Oocysty uchovat v dH₂O při teplotě 4 °C.

4.2.3.3. Počítání koncentrace oocyst

Pracovní postup:

1. Do Bürkerovy komůrky přidat suspenzi s oocystami.
2. Komůrku prohlížet světelným mikroskopem (Olympus BX51) při zvětšení 400×.
3. Oocysty spočítat v 25 různých čtvercích.
4. Konečnou koncentraci oocyst v 1 ml suspenze stanovit součtem všech oocyst v 25 čtvercích vynásobených 10⁴.

4.2.4. Morfometrická analýza oocyst

Morfologie a morfometrie purifikovaných oocyst *C. muris* CAT21 byla zkoumána pomocí diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie (DIC), barvení anilin-karbol-methyl violetí (MV; Miláček a Vítovec 1985) a barvení dle Ziehl-Neelsena (ZN; Henriksen a Pohlenz 1981). Morfometrie byla měřena pomocí digitální analýzy obrazu (Olympus cell Sens Entry 2.1; Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japonsko) získaných pomocí Olympus Digital Colour Camera DP73. Délka a šířka oocyst ($n = 100$) byla měřena při zvětšení 1000× a byl vypočítán index tvaru oocyst. Dále byla změřena velikost oocyst *C. proliferans* ($n = 100$), *C. muris* CB03 ($n = 100$) a *C. muris* RN66 ($n = 100$). Měření prováděla stejná osoba za použití stejného mikroskopu.

4.2.5. Izolace gDNA z oocyst

Izolace gDNA (genomová DNA) z oocyst byla provedena pomocí protokolu s cetyltrimethylamoniumbromidem (CTAB; Doyle a Doyle 1987).

Materiál a chemikálie:

- 2 ml mikroskopické zkumavky
- CTAB extrakční pufr (2%): 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA (pH 8,0), 1,4 M NaCl
- β -mercaptoethanol (β -ME)
- proteináza K
- chloroform
- RNase A
- 7,5 M octan amonný ($C_2H_7NO_2$)
- isopropanol
- 75% EtOH
- DNA a RNA-free voda

Pracovní postup:

1. Do CTAB extrakčního pufru přidat β -ME a roztok ve vodní lázni přehřát na 55 °C.
2. Oocysty centrifugovat a odstranit supernatant.
3. K peletu přidat 1 ml CTAB pufru (s 20 μ l β -ME) a resuspendovat pipetováním.
4. Přidat 2 μ l proteinázy K a inkubovat při 65 °C po dobu 1 hodiny a občas promíchat otočením zkumavky.
5. Poté snížit teplotu na 55 °C (optimální teplota pro proteinázu K je 55 °C), přidat 2 μ l proteinázy K a opět inkubovat 1 hodinu.
6. Poté přidat stejné množství chloroformu (1 ml) a promíchat jemnou inverzí mikroskopické zkumavky po dobu 5 až 10 minut.
7. Centrifugovat 10 minut při 5500 g.
8. Vrchní fázi přenést pomocí pipety s širokou špičkou do čisté mikroskopické zkumavky (horní fáze je vodný roztok obsahující DNA, spodní je organická fáze fenolu či chloroformu a mezi vodnou a organickou fází se hromadí proteiny).
9. Přidat 5 μ l RNase A a inkubovat při 37 °C po dobu 1 hodiny.
10. Zopakovat extrakci pomocí chloroformu a opět vrchní fázi přenést do čisté mikroskopické zkumavky.
11. Přidat 125 μ l octanu amonného a jemně promíchat.

12. Přidat 1 ml studeného isopropanolu a opět jemně promíchat.
13. Pelet gDNA dvakrát opláchnout pomocí 75% EtOH a nechat lehce vyschnout.
14. Následně pelet jemně rozsuspendovat v DNA a RNA-free vodě.

4.2.6. Degradace oocyst

4.2.6.1. Testování životaschopnosti oocyst

Životaschopnost oocyst byla stanovena barvením pomocí propidium jodidu (PI) a fluorescein diacetátem (FDA) (Jones a Senft 1985). Barvivo PI proniká přes narušenou cytoplazmatickou membránu, a proto se využívá pro vizualizaci mrtvých oocyst, které svítí jasně červeně. Vlnová délka excitace pro PI je 536 nm a vlnová délka emise je 617 nm. FDA se využívá pro přibližné stanovení počtu živých buněk ve vzorku. FDA je schopné proniknout přes neporušenou cytoplazmatickou membránu, kde je následně metabolizován na fluorescein, který není schopen proniknout zpět přes cytoplazmatickou membránu. Fluorescein následně vyzařuje zelený signál typický pro živé buňky. Excitační vlnová délka FDA je 490 nm a emisní vlnová délka 521 nm.

Roztoky a chemikálie:

- Fluorescein diacetate (FDA):
 - zásobní roztok: 5 mg fluoresceinu v 1 ml acetonu
 - pracovní roztok: 40 μ l zásobního roztoku v 10 ml PBS
- Propidium iodide (PI): Pracovní roztok 1 mg PI v 50 ml PBS
- PBS: rozpustit 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 KH_2PO_4 do 1000 ml dH_2O a upravit pH 7,2–7,4

Pracovní postup:

1. Rozsuspendovat $0,5 \times 10^6$ oocyst v 1 ml PBS.
2. Připipetovat 100 μ l pracovního roztoku FDA a 30 μ l PI.
3. Nechat inkubovat v temnu při laboratorní teplotě minimálně 15 minut.
4. Centrifugovat vzorek 3 minuty při 14000 g při teplotě 20 °C.
5. Odsát supernatant a zkumavku doplnit dH_2O .
6. Centrifugovat 3 minuty při 14000 g při teplotě 20 °C.
7. Krok číslo 5 a 6 opakovat minimálně 2 \times .
8. Jako kontrolu použít devitalizované oocysty, které byly před použitím inkubovány ve vodní lázni s vroucí vodou po dobu alespoň 10 minut.
9. Oocysty pozorovat fluorescenčním mikroskopem s filtrem o vlnové délce 590 nm při zvětšení 40 \times nebo 100 \times (Olympus IX70).

Vyhodnocení: Pokud oocysty svítí červeně, oocysty jsou již mrtvé. Pokud oocysty nesvítí nebo svítí zeleně jsou životaschopné.

4.2.6.2. Kvantifikace oocyst pomocí průtokové cytometrie

Pro stanovení změny počtu oocyst *C. muris* CAT21 (degradace) v průběhu času bylo 20 ml roztoku purifikovaných oocyst o koncentraci 2×10^6 /ml rozděleno do dvou 50 ml šroubovacích zkumavek po 10 ml. Do každé zkumavky bylo přidáno 100 μ l směsi antibiotik (Sigma Aldrich, 100 U/ml penicilin, 100 mg/ml streptomycin, 2.5 mg/ml amphotericin). Toto ředění bylo provedeno také u oocyst *C. proliferans*, které sloužily jako kontrola. Vzorky byly uloženy v chladničce při teplotě 4 °C. Změna počtu oocyst v čase byla sledována 0., 14., 30. a 60. den experimentu. Vzorky byly před použitím zvortexovány a z každé zásobní suspenze bylo vždy odpipetováno a měřeno 450 μ l ($0,5 \times 10^6$ oocyst) v 5 opakováních.

Ke vzorku, který obsahoval 450 μ l suspenze s oocystami bylo připipetováno 50 μ l referenčních fluorescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA) a jako medium byla použita dH₂O. Principem průtokové cytometrie je průchod buněk nebo částic v unášejícím médiu procházejícím měřícím přístrojem – průtokovým cytometrem (BD FACSCanto II, BD Biosciences, USA). Bylo zjišťováno procento zdegradovaných oocyst v porovnání s kontrolou a nultým dnem. Získané hodnoty byly zapisovány do tabulek a následně přečítány na procenta.

4.2.7. Design infekčních experimentů

Přirozeně infikovaná kočka domácí byla sledována po dobu 110 dnů a pravidelně vyšetřována na přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu. Odebraný trus byl následně purifikován na sacharózovém gradientu a na cesium chloridovém gradientu (viz. 4.2.3.). Získaná infekční dávka (1×10^6 oocyst/myš v 10 μ l dH₂O) byla podána experimentálními skupinám myši.

Myši kmene BALB/c, SCID a IFN- γ -KO a mastomyši byly perorálně infikovány dávkou 1×10^6 oocyst *C. muris* CAT21 v 200 μ l dH₂O (z každé skupiny vždy 5 myši). Jako negativní kontrola sloužila skupina tří stejně starých myši inokulovaných 200 μ l dH₂O. U všech skupin zvířat byl v průběhu celého experimentu denně kontrolován zdravotní stav a konzistence trusu. Od 5. dne po infekci (DPI) byl každému zvířeti odebrán individuálně vzorek trusu a vyšetřován na přítomnost oocyst a specifické DNA *C. muris*. Z každého získaného vzorku byl proveden nátěr trusu na sklo a obarveno metodou dle Miláčka a Vítovce (1985) (viz. 4.2.1.1.), izolace DNA (viz. 4.2.2.1.) a zjištěna intenzita infekce

(viz. 4.2.7.1.). Z každé experimentální skupiny byl 40 DPI vybráni dva jedinci, kteří byli humánně usmrceni a byla provedena pitva. Vzorky tkání byly použity pro PCR (viz. 4.2.2.3) a histologické metody a SEM a TEM zobrazení (viz. 4.2.8.). Experimenty byly ukončeny po 60 dnech.

4.2.7.1. Hodnocení intenzity infekce

U mikroskopicky pozitivních vzorků byla intenzita infekce stanovena jako počet oocyst na gram trusu (OPG; Kváč et al. 2007b).

Pracovní postup:

1. Z rozdílu hmotností podložního sklíčka s nátěrem a čistého sklíčka vypočítat hmotnost nátěru.
2. Spočítat počet oocyst na skle obarv
3. eném anilin-karbol-methyl violetí.
4. Vypočítat počet oocyst na 1 gram trusu.

Při nízké intenzitě infekce byly počítány všechny oocysty nalezené na preparátu, při vysoké intenzitě infekce byl počítán počet oocyst ve 30 náhodných zorných polích. Ze zjištěných údajů (hmotnost trusu, počet zorných polí a počet oocyst na sklíčku) byla spočítána intenzita infekce a vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu (OPG, oocysts per gram) (Kváč et al. 2007b).

4.2.8. Lokalizace infekce

Z každé skupiny experimentálně infikovaných zvířat byly vybrány 2 myši, které byly humánně usmrceny 40 DPI a byla provedena pitva. Vzorky tkáně (jícen, žláznatý žaludek, svalnatý žaludek, duodenum, jejunum, ileum, cékum a kolon) od každého zvířete byly získány za použití sterilních pitevních nástrojů pro každé místo.

Z každého orgánu byly odebrány vzorky pro PCR a následné sekvenování, histologii, skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) a transmisní elektronovou mikroskopii (TEM). Ze stěny žaludku byly provedeny seškraby, které byly následně barveny pomocí barvení Wright podle Tyzzer (1910). Histologické řezy byly obarveny hematoxylinem a eosinem (HE) a periodic acid schiff (PAS), prohlíženy při zvětšení 100–400× a dokumentovány pomocí softwaru Olympus cell Sens Entry 2.1 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japonsko) a digitálního fotoaparátu (Olympus DP73). Vzorky pro SEM byly prohlíženy pomocí JEOL JSM-7401F-FE SEM vybaveného digitálním fotoaparátem. Vzorky pro TEM byly prohlíženy pomocí JEM-1400 JEOL.

4.2.8.1. Příprava histologických preparátů

Roztoky a chemikálie:

- I. vzestupná alkoholová odvodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; aceton; xylen)
- parafinová řada (4 následné roztoky parafínu v xylenu 1:3, 1:1, 3:1, 100 % parafín)
- alkoholová sestupná řada, odparafinovací řada (xylen; alkohol 96%, alkohol 80%, alkohol 70%; dH₂O)
- II. vzestupná odvodňovací alkoholová řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; karboxylen; xylen)
- kanadský balzám

Pracovní postup:

1. Vzorky odvodňovat I. vzestupnou řadou, po 60 minutách vyměnit roztok (v posledním roztoku nechat 90 minut).
2. Prosytit parafinem (2–4 hodiny v parafínu I; 4–6 hodin v parafínu II; 8–12 hodin v parafínu III, 8–12 hodin ve 100 % parafínu).
3. Vzorky zalít do čistého parafínu a vytvořit bločky.
4. Zhotovit 5 µm silné histologické řezy a připravit preparáty na podložní sklíčko.
5. Nechat 24 hodin na plotně o teplotě 42 °C.
6. Preparáty odparafinovat alkoholovou sestupnou odvodňovací řadou vždy po 5 minutách.
7. Vzorky nabarvit a po barvení pokračovat v odvodňování II. alkoholovou vzestupnou řadou vždy po 5 minutách, v karboxylenu a xylenu ponechat 1 minutu.
8. Vzorky zamontovat do kanadského balzámu a ponechat k sušení při teplotě 37 °C.
9. Poté prohlížet mikroskopem (Olympus BX51) při vhodném zvětšení.

BARVENÍ HEMATOXYLIN-EOSIN

Roztoky a chemikálie:

- hematoxylin: 0,5 g hematoxylinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 500 ml dH₂O + 25 g síranu hlinito-amonného + 0,1 g jodičnanu sodného + 20 ml kyseliny octové
- dH₂O
- síran hlinito-amonný
- jodičnan sodný
- kyselina octová

- eosin: 0,5 g eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 250 ml dH₂O + 10 ml kyseliny octové)

Pracovní postup:

1. Připravit odparafinované řezy.
2. Vzorčky barvit 10 minut v hematoxylinu.
3. 10 minut oplachovat pod tekoucí vodou.
4. 5 minut barvit vzorky v eosinu.
5. 10 minut oplachovat pod tekoucí vodou.

BARVENÍ PERIODIC ACID SHIFF (PAS)

Roztoky a chemikálie:

- Schiffovo reagens: 100 ml dH₂O, 1 g basický fuchsin, 10 ml 1N kyselina chlorovodíková, 1 g pyrosiřičitan draselný, 0,5 g aktivní uhlí
- siřičitá voda: 5 ml 1N kyseliny chlorovodíkové, 0,5 g pyrosiřičitan draselný, 100 ml dH₂O
- roztok kyseliny jodisté: 0,8 g ve 100 ml dH₂O
- hematoxylin
- 96% alkohol
- butylalkohol
- xylene

Pracovní postup:

1. Připravit odparafinované řezy.
2. Řezy vložit do roztoku kyseliny jodisté na 10 minut.
3. Oplachovat 10 minut pod tekoucí vodou.
4. Vložit do Schiffova reagens na 30 minut.
5. Oplachovat 5 minut v lázni siřičité vody.
6. Oplachovat 15 minut pod tekoucí vodou.
7. Ponořit do roztoku hematoxylinu na 1–2 minuty.
8. Opláchnout v 96% alkoholu, butylalkoholu a xylenu.

MONTOVÁNÍ NABARVENÝCH ŘEZŮ

Pracovní postup:

1. Na preparát na podložním skle kápnout kapku kanadského balzámu.
2. Přiložit krycí sklíčko tak, aby se nevytvořily vzduchové bubliny.
3. Případné bublinky vytlačit mírným tlakem na krycí sklíčko.
4. Hotový preparát vložit do termostatu (37 °C), kde zaschne montovací medium.

4.2.8.2. Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii

Roztoky a chemikálie:

- 3 % glutaraldehyd
- 0,1 M kakodylátový pufr
- 2 % oxid osmičelý
- acetonová řada (25 %, 75 % a 100 % roztok)

Pracovní postup:

1. Fixovat vzorky orgánů v glutaraldehydu v kakodylátovém pufru při 4 °C přes noc.
2. Promýt vzorky v kakodylátovém pufru 3× 15 minut.
3. Fixovat vzorky v oxidu osmičelém v kakodylátovém pufru po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě.
4. Promýt vzorky v kakodylátovém pufru 3× 15 minut.
5. Po dehydrataci vzestupnou acetonovou řadou vzorky vysušit metodou kritického bodu (CPD).
6. Vysušené vzorky nalepit pomocí oboustranné lepicí pásky na hliníkový terčík.
7. Nalepené vzorky pozlatit a prohlížet pomocí elektronového mikroskopu JOEL JSM7401F-FE SEM.

4.2.8.3. Barvení Wright podle Tyzzer (1910)

K vizualizaci vývojových stádií kryptosporidií bylo použito Wrightovo barvení.

Roztoky a chemikálie:

- PBS (Phosphate Buffered Saline): rozpustit 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 KH_2PO_4 do 1000 ml dH_2O a upravit pH 7,2–7,4
- 2 % oxid osmičelý
- Methanol
- Barvivo Wright (směs eosinu a methylenové modři): 0,16% roztok v metanolu

Pracovní postup:

1. Vzorky tkáně žaludku promýt studeným PBS.
2. Na stěnu žaludku nakapat sérum z myši negativní na kryptosporidie a nechat působit 5 minut.
3. Sliznici jemně seškrábnout skalpelem a rozetřít na podložní sklo.
4. Skla fixovat 30 minut v parách 2 % oxidu osmičelého (na hrdlo nádoby s roztokem oxidu osmičelého umístit preparát se vzorkem směrem dolů a nechat fixovat v parách).
5. Fixovaný vzorek opláchnout methanolem (odstranění zbytků kyselin před barvením).
6. Na vzorek pomocí pipety nanést barvivo Wright naředěné s destilovanou vodou v poměru 1:1 a nechat barvit 9 minut.
7. Barvivo opláchnout pod tekoucí vodou.
8. Sklíčka prohlížet světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

4.2.9. Statistická analýza

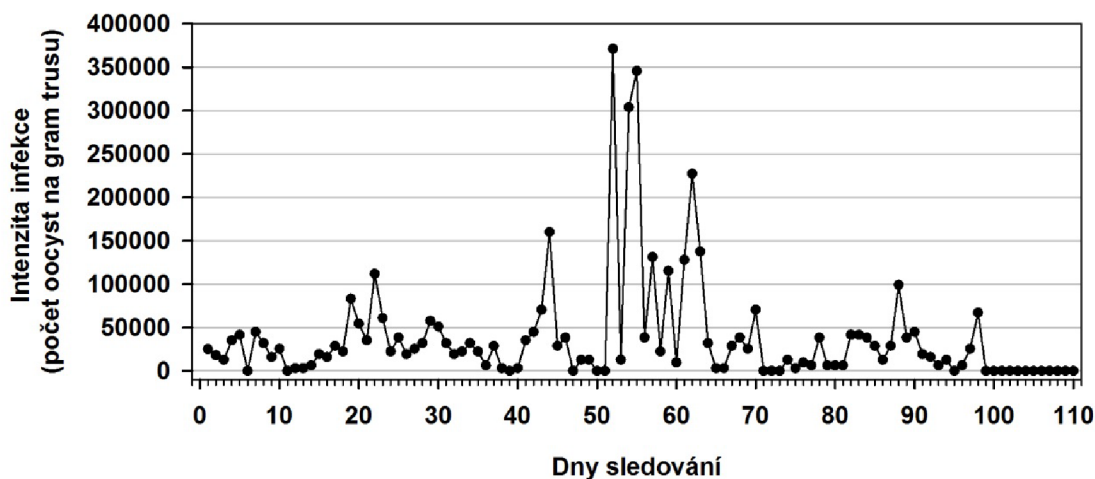
Rozdíly ve velikosti oocyst *C. muris* CAT21 získaných z různých hostitelů a ve velikosti oocyst *C. muris* CAT21 a dalších izolátů *C. muris* a *C. proliferans* byly testovány pomocí Hotellingovy vícerozměrné verze dvouvýběrového t-testu v balíček ICSNP: Tools for Multivariate Nonparametrics v programu R 4.2.2. Testovanou hypotézou bylo, zda dvourozměrné střední vektory měření jsou ve srovnávaných populacích stejné.

5. Výsledky

5.1. Přirozená infekce *Cryptosporidium muris* CAT21 u kočky domácí

V rámci výzkumu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie Parazitologického ústavu BC AVČR byly mimo jiné druhy domácích zvířat vyšetřovány kočky domácí na přítomnost různých druhů parazitů. U jedné z koček byla detekována středně silná intenzita infekce kryptosporidiiemi ($3-4 \times 10^4$ /gram trusu). Na základě morfologie oocyst (větší oocysty s oválným tvarem) bylo předpokládáno, že se jedná o oocysty žaludečního druhu *C. muris*. Molekulární analýzy založené na sekvenaci části genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU) prokázaly, že oocysty získané z kočky patří k druhu *C. muris* (viz. 5.3.). Získaná částečná sekvence (820 bp) SSU byla 100 % identická se sekvencemi uloženými v GenBank (MN038146). Opakovaná koprologická vyšetření kočky ukázala přítomnost oocyst *C. muris* v trusu, čímž byla vyloučena možnost pasáže oocyst zažívacím traktem. Získaný izolát byl pracovníčně označen *C. muris* CAT21.

Infikovaná kočka byla sledována po dobu 110 dnů od prvního vyšetření. Výsledky mikroskopického vyšetření trusu ukázaly intermitentní vylučování oocyst *C. muris* po celou dobu sledování, a to s intenzitou infekce dosahující až 371 000 OPG, která byla detekována 52. den sledování (Graf 1).



Graf 1. Průběh infekce *Cryptosporidium muris* CAT21 u přirozeně infikované kočky domácí (*Felis catus*) vyjádřený jako počet oocyst na gram trusu.

Oocysty *C. muris* získané z přirozeně infikované kočky domácí byly dále použity pro experimentální infekce a další laboratorní analýzy.

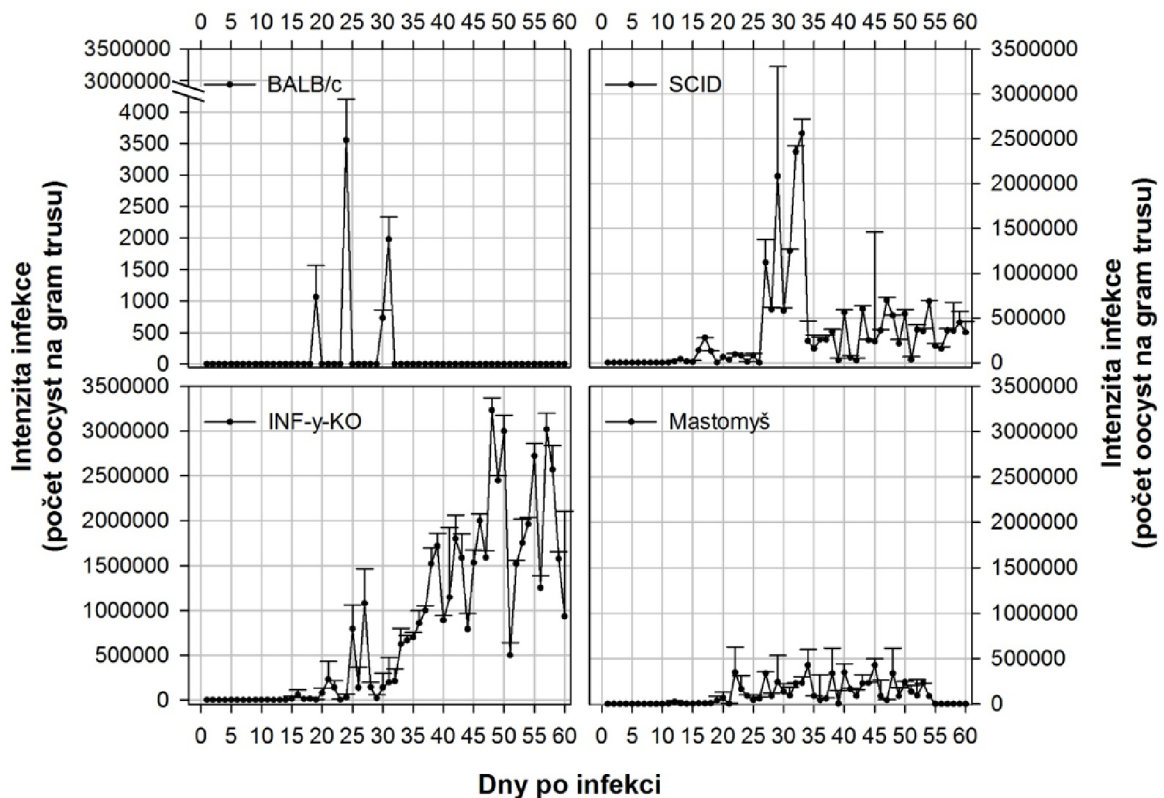
5.1.1. Infektivita *Cryptosporidium muris* CAT21 pro modelové hlodavce

Experimentální infekce různých kmenů myši (BALB/c, SCID a INF- γ -KO) a mastomyši izolátem *C. muris* CAT21 prokázaly vnímavost všech použitých modelových hostitelů k infekci. Nicméně u jednotlivých hostitelů byla zaznamenána odlišná délka patentní a prepatentní periody a intenzita infekce.

Imunokompetentní myši kmene BALB/c začaly vylučovat oocysty *C. muris* CAT21 od 11. dne po infekci. Nicméně intenzita infekce byla pod detekčním limitem mikroskopického vyšetření a byla detekována pouze přítomnost specifické DNA. Mikroskopicky detekovatelné množství oocyst bylo pozorováno pouze 19, 24, 30 a 31 DPI s intenzitou 700–3 600 OPG. Od 42 DPI byly všechny myši až do konce experimentu (60 DPI) jak mikroskopicky, tak PCR negativní (Graf 2).

U imunodeficitních SCID a INF- γ -KO myši byla detekována prepatentní perioda od 11, respektive 12 dne po infekci. Všechny infikované myši vylučovaly mikroskopicky detekovatelné množství oocyst. Intenzita infekce u SCID myši se pohybovala v rozmezí 7 000–2 600 000 OPG (Graf 2), kdy maxima dosáhla 33 DPI. Počínajíc 40 DPI klesla intenzita infekce na přibližnou hodnotu okolo 200 000 OPG a tato hodnota se udržela až do konce experimentu (60 DPI). U myši kmene INF- γ -KO byl pozorován postupný nárůst intenzity infekce s vrcholem 48 DPI (3 200 000 OPG), a oproti SCID myši nedošlo k výraznému poklesu intenzity infekce na konci experimentu.

Mastomyši začaly vylučovat oocysty i specifickou DNA ve stejný den a to od 11 DPI. Intenzita infekce se v průběhu pokusu pohybovala v rozmezí 2 000–300 000 OPG, kdy nejvyšší hodnota byla detekována 34 DPI. Od 55 DPI došlo k samovyléčení a až do konce experimentu nebyla u žádné z mastomyši detekována přítomnost ani oocyst, ani specifické DNA v trusu (Graf 2).



Graf 2. Průběh infekce *Cryptosporidium muris* CAT21 u experimentálně infikovaných myši kmene BALB/c, SCID, INF- γ -KO a mastomyši. Hodnoty představují průměr a směrodatnou odchylku získaných z měření intenzity infekce vyjádřené jako počet oocyst na gram trusu.

5.2. Morfometrie a morfologie oocyst

Byla porovnána morfometrie a morfologie oocyst *C. muris* CAT21 získaných z přirozeně infikované kočky domácí a oocyst získaných z experimentálně infikovaných myši a mastomyši (Tabulka 7). Statistické analýzy prokázaly, že původní izolát z kočky se morfometricky neliší od oocyst získaných z experimentálně infikovaných myši a mastomyši ($T^2 = 4,32$, $df_1 = 2$, $df_2 = 24,62$, $P = 0,2208$). Oocysty získané z kočky měřily $8,43 \times 6,22 \mu\text{m}$ s indexem tvaru 1,37 ($n = 90$). Statistická analýza prokázala, že oocysty *C. muris* CAT21 nejsou velikostně odlišitelné od oocyst *C. muris* RN66 ($T^2 = 12,32$, $df_1 = 2$, $df_2 = 25,63$, $P = 0,1907$) *C. muris* CB03 ($T^2 = 13,25$, $df_1 = 2$, $df_2 = 23,45$, $P = 0,1875$) a *C. proliferans* ($T^2 = 32,56$, $df_1 = 2$, $df_2 = 32,27$, $P < 0,0001$).

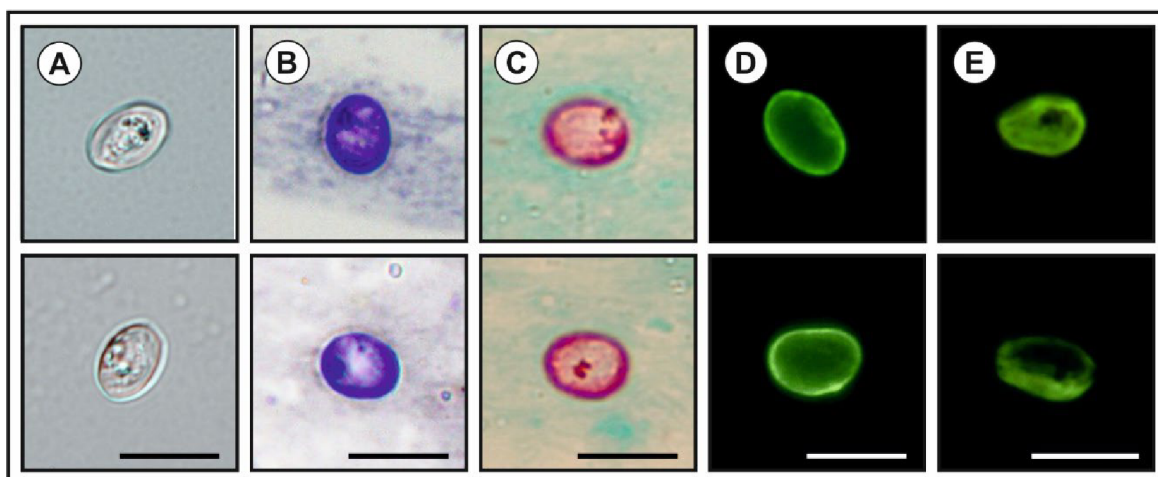
Oocysty byly z hostitele vylučovány plně infekce schopné obsahující 4 sporozoity a jedno velké reziduální tělíčko. Stěna oocysty byla tenká, bezbarvá bez zřetelné sutury.

Tabulka 7. Porovnání velikosti oocyst různých izolátů *Cryptosporidium muris* a *Cryptosporidium proliferans*.

Druh/Izolát	Hostitel	Délka (μm)	Šířka (μm)	Délka/šířka poměr
<i>C. muris</i> CAT21	kočka	8,43 (7,21–9,55)	6,22 (4,84–8,33)	1,37
<i>C. muris</i> CAT21	SCID	8,11 (6,05–9,66)	5,59 (4,52–8,81)	1,37
<i>C. muris</i> CAT21	INF-γ-KO	8,40 (7,48–8,98)	6,06 (5,29–6,56)	1,39
<i>C. muris</i> CAT21	mastomyš	8,48 (7,52–9,16)	6,05 (5,58–7,14)	1,39
<i>C. proliferans</i>	mastomyš	7,77 (6,80–8,80)	5,30 (4,80–6,20)	1,48
<i>C. muris</i> RN66	SCID	8,40 (7,50–9,80)	6,30 (5,50–7,00)	1,31
<i>C. muris</i> CB03	SCID	8,50 (8,20–9,30)	5,90 (5,50–6,60)	1,32

5.2.1. Diferenciální diagnostika

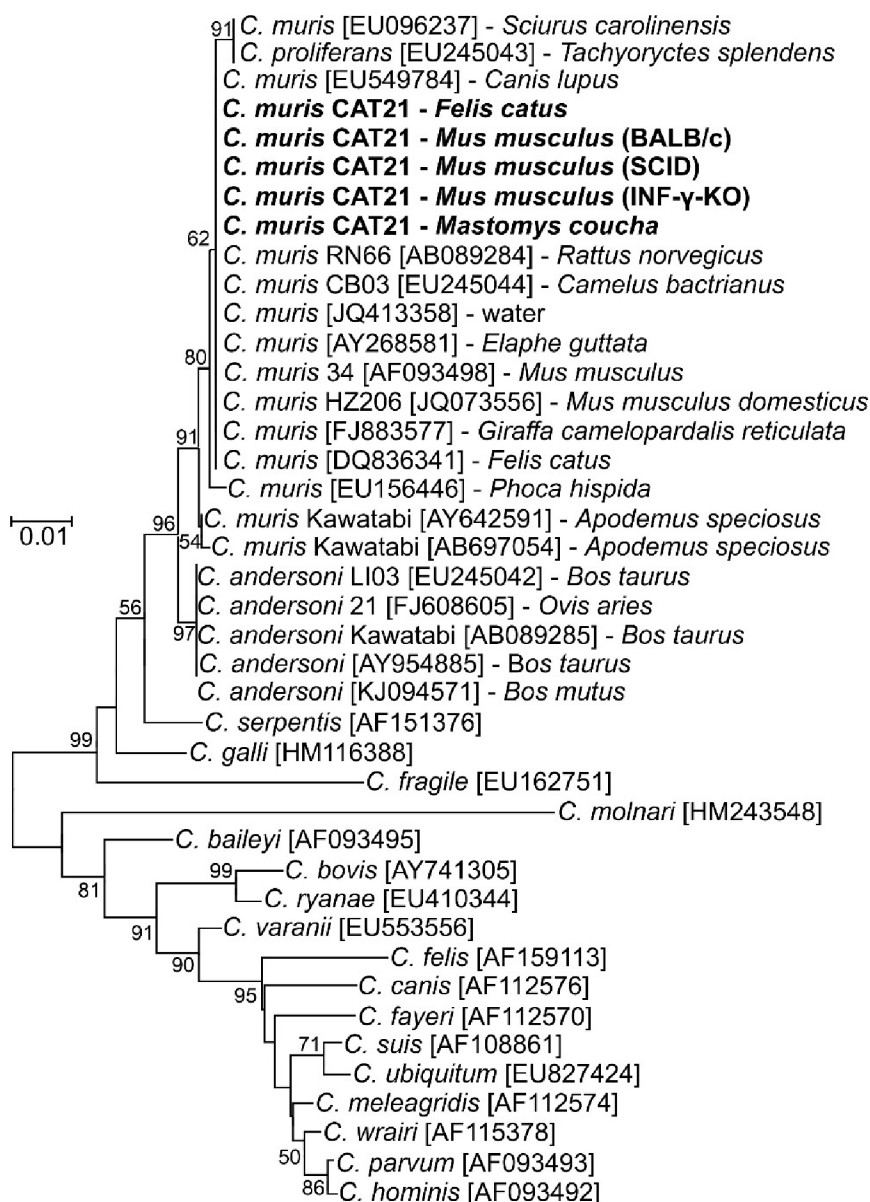
Oocysty *C. muris* izolát CAT21 získané z přirozeně infikované kočky domácí a experimentálně infikovaných modelových hostitelů bylo možné detekovat v nátěru trusu pomocí standardních barvicích technik pro detekci kryptosporidií. Oocysty *C. muris* CAT21 se barvily pomocí anilin-karbol-methylvioletí (Obrázek 2B), pomocí karbolfuchsinu (Obrázek 2C) a pomocí auramin-fenolu (Obrázek 2E) obdobně jako oocysty dalších druhů a genotypů rodu *Cryptosporidium*. Oocysty *C. muris* CAT21 značené FITC konjugovanými polyklonálními protilátkami proti stěně oocyst kryptosporidií měly typickou zelenou fluorescenci (Obrázek 2D).



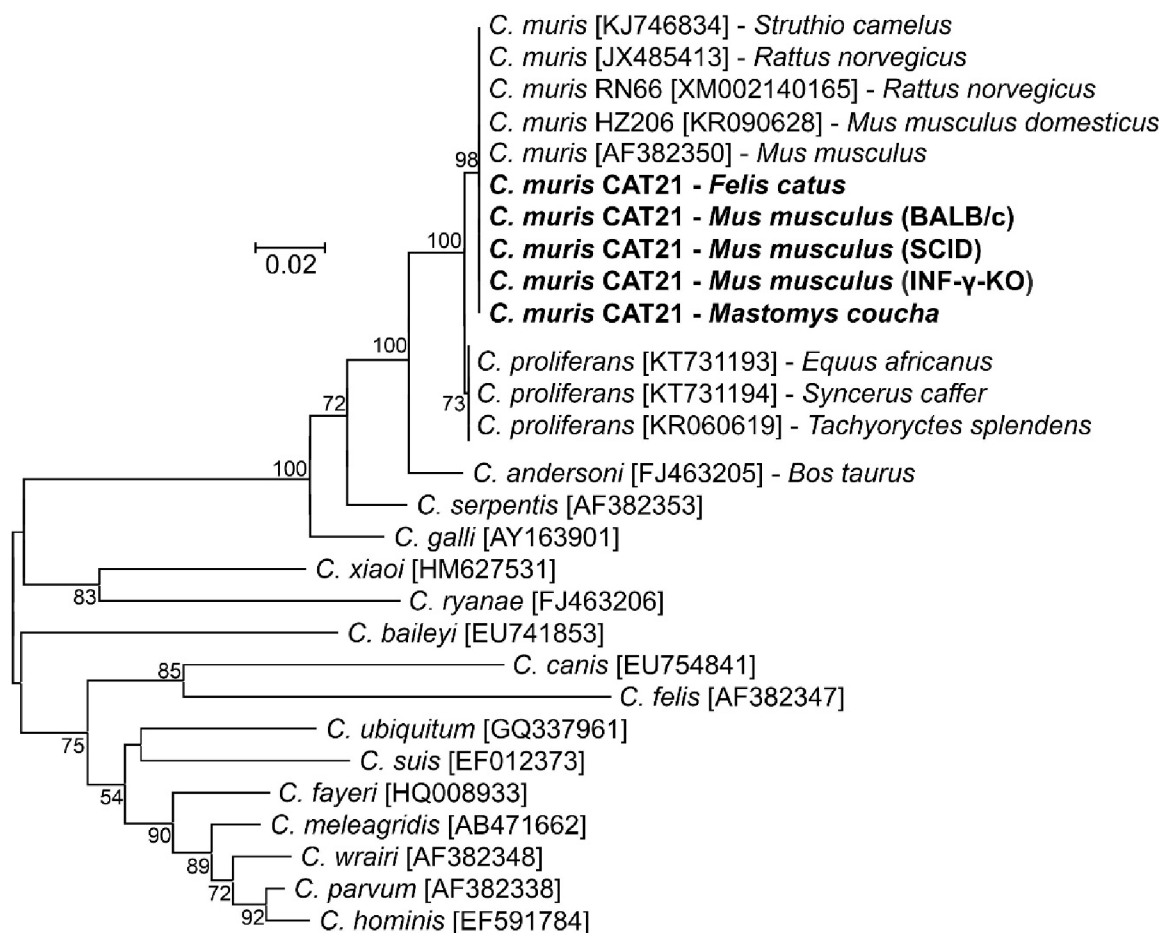
Obrázek 2. Oocysty *Cryptosporidium muris* CAT21 **A)** v diferenciální interferenční kontrastní mikroskopii, **B)** obarvené anilin-karbol-methylvioletí, **C)** obarvené Ziehl-Nielsenovým barvením, **D)** značené FITC konjugovanými polyklonálními protilátkami proti stěně oocyst *Cryptosporidium* spp. a **E)** obarvené auramin-fenolem. Měřítko = 5 μm.

5.3. Molekulární analýzy

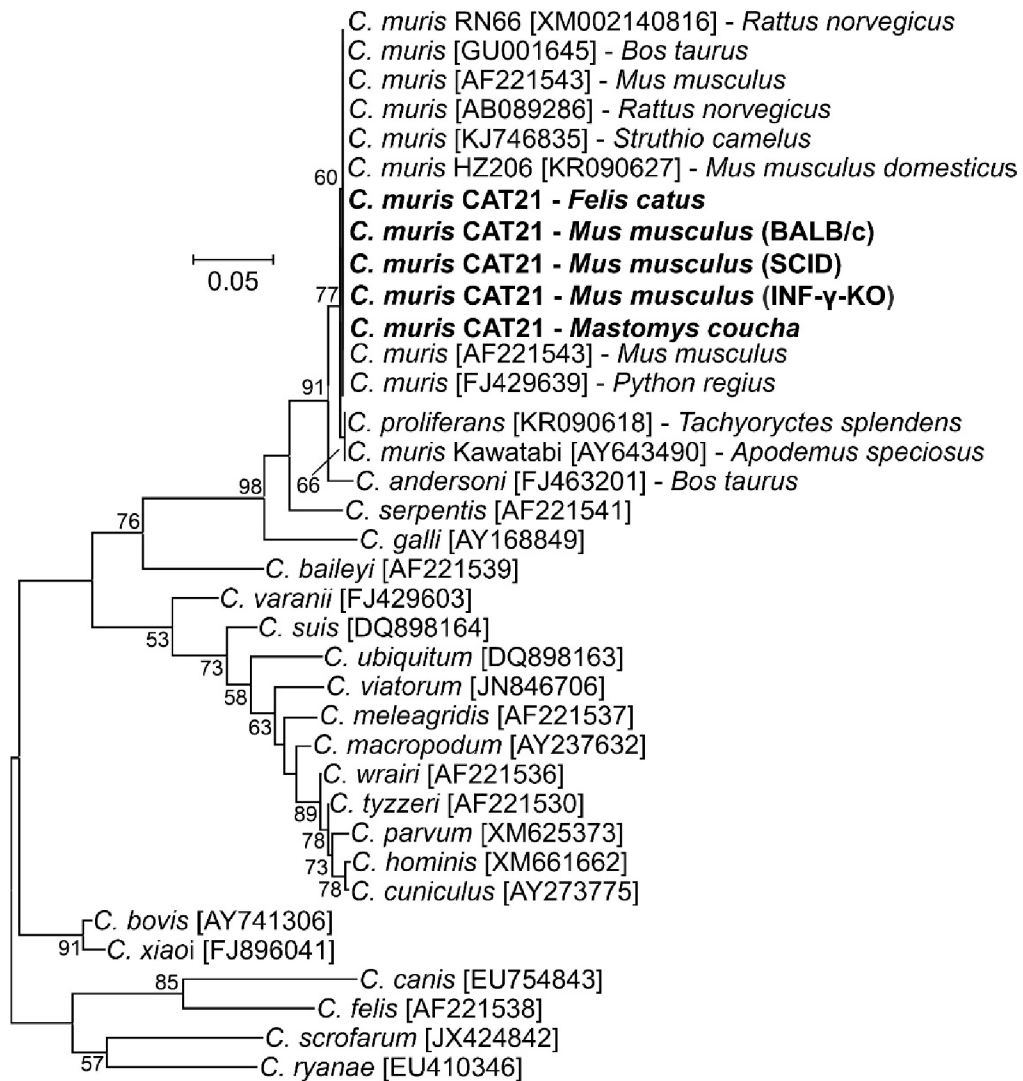
Molekulární analýzy částečných sekvencí genů *SSU*, aktin, *TRAP-C1*, a *HSP70* prokázaly, že izoláty získané z experimentálně infikovaných myši a mastomyši byly vzájemně 100% identické a současně se nelišily od sekvencí získaných z přirozeně infikované kočky. Dále nebyly zjištěny žádné sekvenční rozdíly mezi *C. muris* CAT21 a ostatními *C. muris* izoláty (Obrázky 3–6).



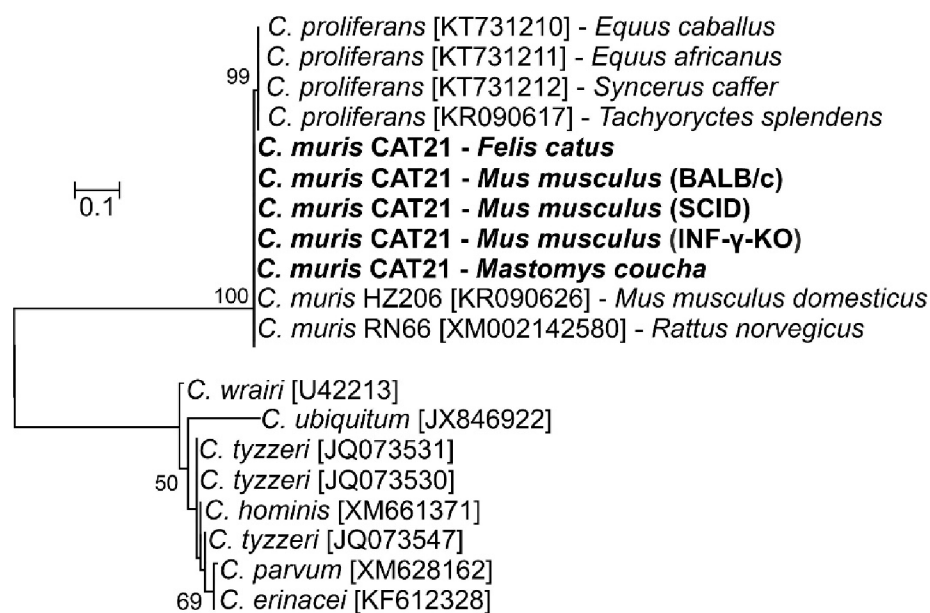
Obrázek 3. Kladogram fylogenetických vztahů *C. muris* CAT21 s ostatními izoláty *C. muris* a dalšími druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro malou podjednotku rRNA (*SSU*) vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získaná v této studii je zvýrazněna tučně. Databázové číslo GenBank je uvedeno v hranaté závorce. U žaludečních druhů je za pomlčkou uveden hostitel.



Obrázek 4. Kladogram fylogenetických vztahů *C. muris* CAT21 s ostatními izoláty *C. muris* a dalšími druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro aktin vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získaná v této studii je zvýrazněna tučně. Databázové číslo GenBank je uvedeno v hranaté závorce. U žaludečních druhů je za pomlčkou uveden hostitel.



Obrázek 5. Kladogram fylogenetických vztahů *C. muris* CAT21 s ostatními izoláty *C. muris* a dalšími druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro *HSP70* vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získaná v této studii je zvýrazněna tučně. Databázové číslo GenBank je uvedeno v hranaté závorce. U žaludečních druhů je za pomlčkou uveden hostitel.



Obrázek 6. Kladogram fylogenetických vztahů *C. muris* CAT21 s ostatními izoláty *C. muris* a dalšími druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro *TRAP-CI* vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získaná v této studii je zvýrazněna tučně. Databázové číslo GenBank je uvedeno v hranaté závorce. U žaludečních druhů je za pomlčkou uveden hostitel.

5.4. Výtěžnost izolace gDNA z oocyst

Vzhledem k tomu, že biologické vlastnosti izolátu *C. muris* CAT21 se výrazně lišily od vlastností popsaných u dalších izolátů v rámci druhu *C. muris* a současně jsme nedetekovali žádné rozdíly v genech (*SSU*, aktin, *HSP70* a *TRAP-CI*; obrázky 3–6), které se používají pro běžnou genotypizaci, rozhodli jsme se osekvenovat celý genom tohoto izolátu. Oocysty pro tyto účely byly sbírány z experimentálně infikovaných SCID a IFN- γ -KO myší. Izolací oocyst jsme získali dohromady 4700 ng DNA, kdy pro sekvenování bylo použito 2000 ng a zbylá gDNA byla uchována při - 80 °C pro případné další využití. Čistota vyizolované gDNA byla měřena pomocí NanoDropu a množství bylo měřeno pomocí Qubitu. Aktuálně probíhá příprava DNA knihovny a získaná gDNA bude sekvenována pomocí nanopórového sekvenování na platformě MinION, která umožňuje získat dlouhá čtení. Následné sestavení a anotace osekvenovaného genomu bude předmětem další studie.

5.5. Klinický průběh infekce

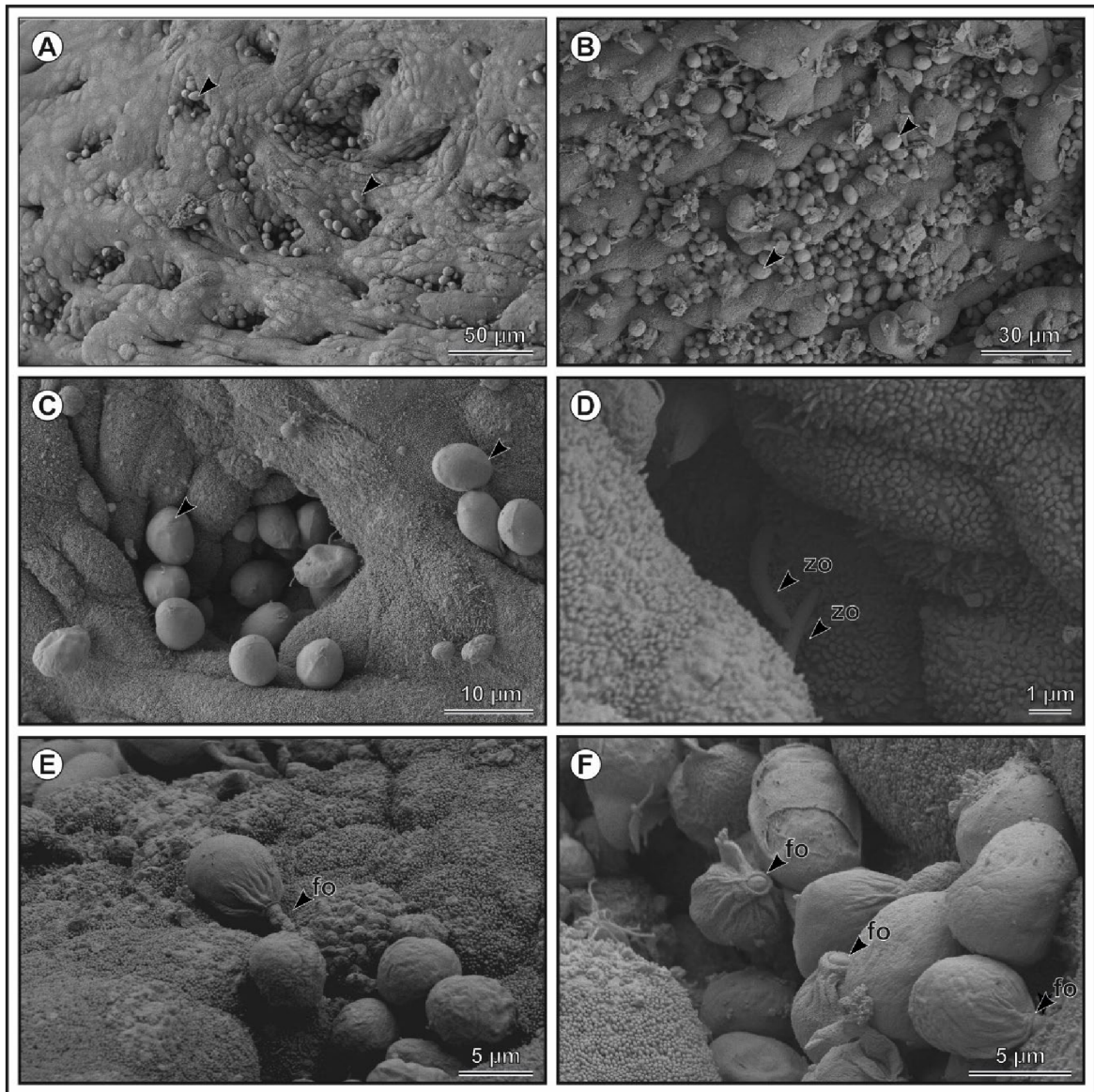
Po celou dobu sledování nebyly zjištěny žádné příznaky klinické kryptosporidiózy u přirozeně infikované kočky domácí. Zvíře netrpělo žádnými průjmy, zvracením a nebyly pozorovány ani jiné gastrointestinální obtíže. Zvíře přijímalo potravu běžným způsobem a hmotnost zvířete odpovídala věku, pohlaví, krmné dávce a aktivitě zvířete. Obdobně jako u kočky, také u experimentálně infikovaných hlodavců jsme nezaznamenali klinické příznaky spojené s infekcí *C. muris* CAT21.

5.6. Lokalizace infekce

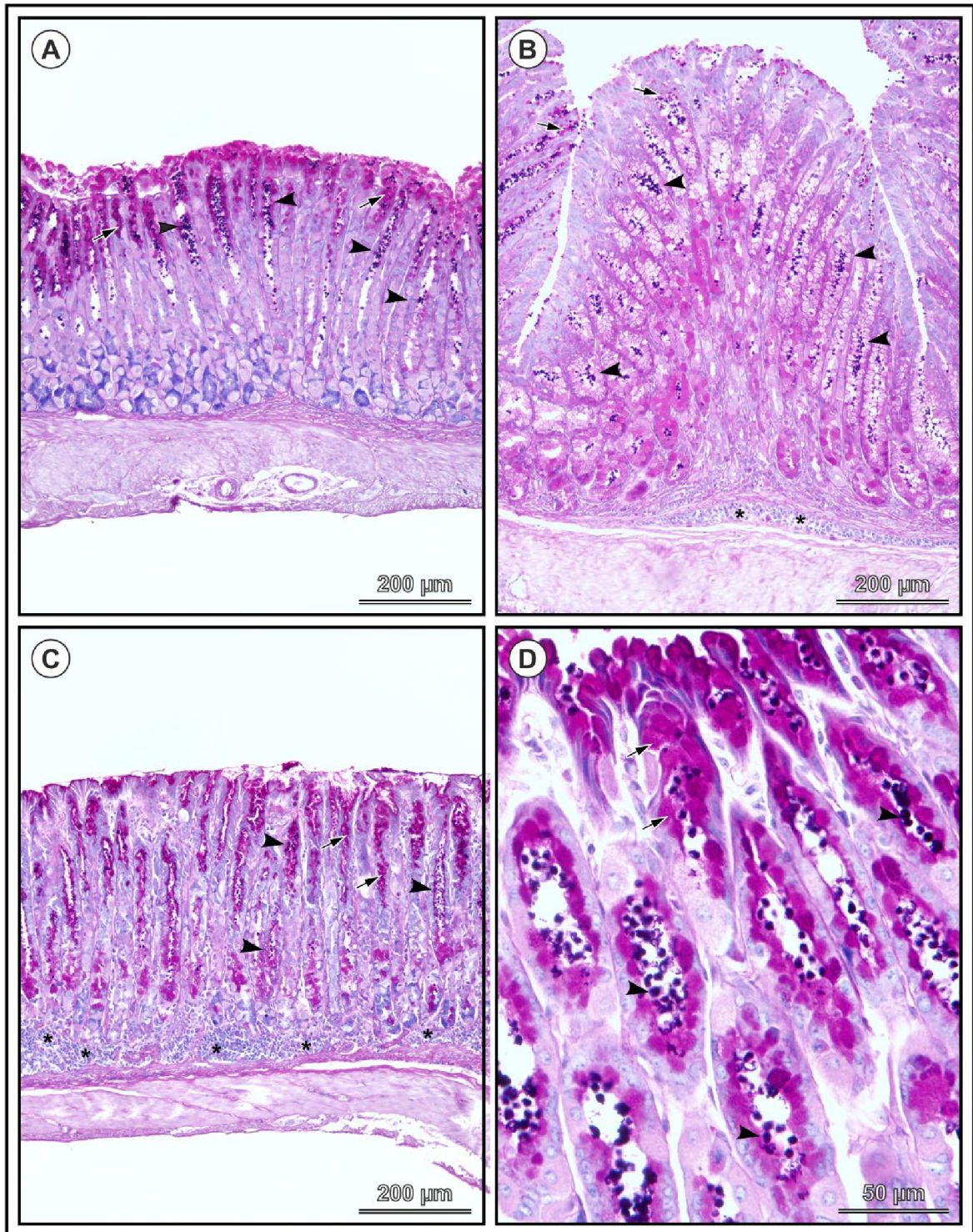
Vyšetření tkání gastrointestinálního traktu experimentálně infikovaných mastomysí a SCID a IFN- γ -KO myši pomocí molekulární, histologické, SEM a TEM analýzy prokázala přítomnost specifické DNA a vývojových stadií *C. muris* CAT21 výhradně ve žláznaté části žaludku všech vnímavých hostitelů (Obrázek 7 a 8). U žádné ze tří vyšetřovaných BALB/c myši nebyla pomocí histologického vyšetření a SEM analýzy detekována vývojová stadia, přestože v tkáni byla detekována specifická DNA *C. muris*. Na vnitřních orgánech žádného z vnímavých hostitelů nebyly pozorovány makroskopické změny.

Vyšetření povrchu žláznaté části žaludku infikovaných mastomysí, SCID a IFN- γ -KO myši ukázalo silné až masivní infekce. Vnitřní slizniční povrch infikovaných oblastí žaludku byl mírně edematózní, bez přichycených kryptosporidií. Téměř po celé oblasti povrchu sliznice byly pozorovány dilatované žlázy obsahující nekrotický materiál, hlen a velké množství vývojových stadií *C. muris* CAT21, pravděpodobně oocyst (Obrázek 7). Hlen a oocysty pokrývaly většinu povrchového epitelu.

Četná vývojová stadia *C. muris* CAT21 se vyskytovala zejména v horní polovině většiny infikovaných žláz (Obrázek 7A–C a 8). Infikované žlázy byly výrazně dilatované, vyplněné nekrotickým materiálem, hlenem a četnými kryptosporidii. Epiteliální buňky žláz byly atrofické a kuboidálně zploštělé. *Lamina propria* byla mírně edematózní, nebyla překrvená a u SCID myši neobsahovala zánětlivé infiltráty. Naopak u mastomysí a IFN- γ -KO myši byly při *lamina propria* detekovány shluky zánětlivých infiltrátů. U SCID myši a mastomysí byla pozorována výrazná aktivace hlenových buněk, zatímco u IFN- γ -KO myši byly tyto buňky aktivovány jen ojediněle (Obrázek 8).



Obrázek 7. Mikrofotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu ukazující vývojová stadia *Cryptosporidium muris* izolát CAT21 na slizničním epitelu žláznatého žaludku SCID myši usmrcené 40 DPI. **A)** a **B)** hlen, nekrotický materiál a četná vývojová stadia pokrývající povrch sliznice žláznatého žaludku, **C)** rozšířený vývod žlázy žaludku vyplněný oocystami, **D)** pohled do žlázy žaludku s uvolněnými zoity (zo), **E)** povrch žláznatého epitelu pokrytého hlenem, v detailu je vidět uvolněné vývojové stadium s prodlouženou feeder organelou (fo), **F)** shluk uvolněných vývojových stadií uvnitř žlázy s patrnými feeder organelami (fo). Měřítka je součástí každé fotografie.



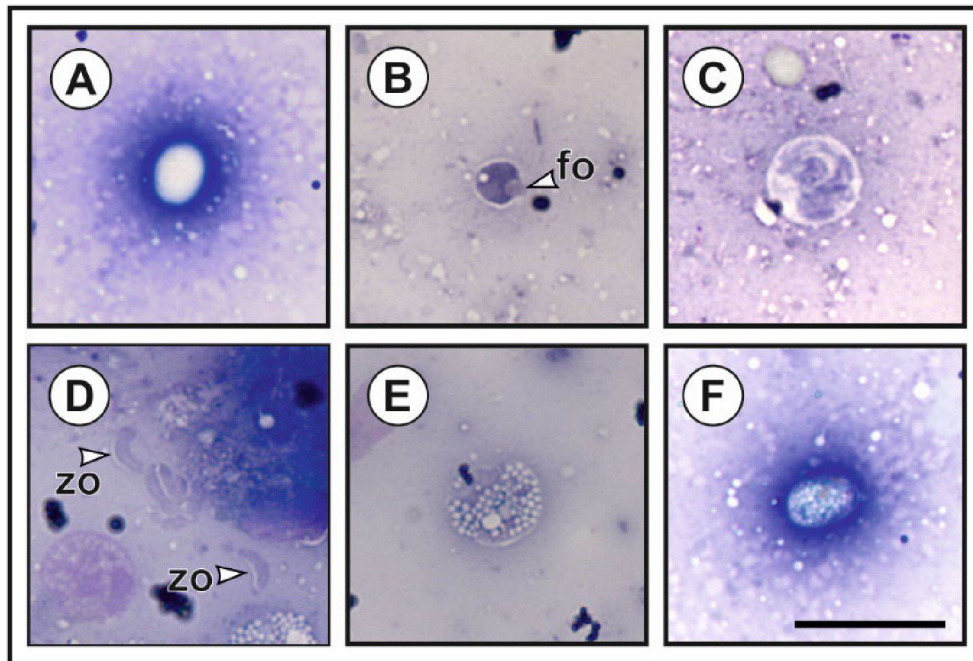
Obrázek 8. Histologické řezy obarvené periodic acid shiff (PAS) ukazující vývojová stadia *Cryptosporidium muris* izolát CAT21 na sliznici epitelu žláznatého žaludku u experimentálně infikované **A)** SCID myši, **B)** IFN- γ -KO myši, a **C)** mastomyši usmrčené 40 dní po infekci, **D)** detail infikovaných žláz u SCID myši. Hroty šipek ukazují vývojová stadii *C. muris* CAT21, šipky ukazují aktivované hlenové buňky, hvězdičky ukazují přítomnost zánětlivých infiltrátů při lamina propria. Měřítka je součástí každé fotografie.

5.7. Vývojový cyklus

Morfometrie vývojových stádií *C. muris* CAT21 byla zkoumána v preparátech získaných z žaludku experimentálně infikovaných SCID a IFN- γ -KO myši a mastomyši obarvených Wrightovým barvením. Barvivo Wright pomáhá růžově zvýraznit jádra vývojových stádií, naopak parazitoformní vak obklopující vývojová stádia zůstává neobarvený. Výsledky mikroskopického vyšetření prokázaly, že nejčastěji se vyskytovali jednobuněční trofozoiti (Obrázek 9B). Velikost tohoto stadia byla velmi variabilní, dosahující $4,62\text{--}11,83 \times 3,51\text{--}8,65 \mu\text{m}$ (Tabulka 8). V nátěrech bylo detekováno velké množství oocyst a většina z nich byla neobarvená (Obrázek 9A), ale nebylo možné rozlišit tenkostěnné a tlustostěnné oocysty. Obdobný počet jako byl napočítán u oocyst, byl detekován i u zygoty (Obrázek 9F). Volní sporozoiti nebyli nalezeni na žádném z preparátů. Dále byli detekováni meronti obsahující osm formujících se merozoitů, zatímco merozoti obsahující čtyři merozity nalezeni nebyli (Obrázek 9C). Volní merozoiti byli pozorováni jen zřídka (Obrázek 9D). Zatímco makrogamety, pro které je typické vyplnění oválnými amylopektinovými granulemi s charakteristickým pěnovitým vzhledem, byly pozorovány relativně často (Obrázek 9E), nepodařilo se nám detekovat mikrogamonty s 16 jádry.

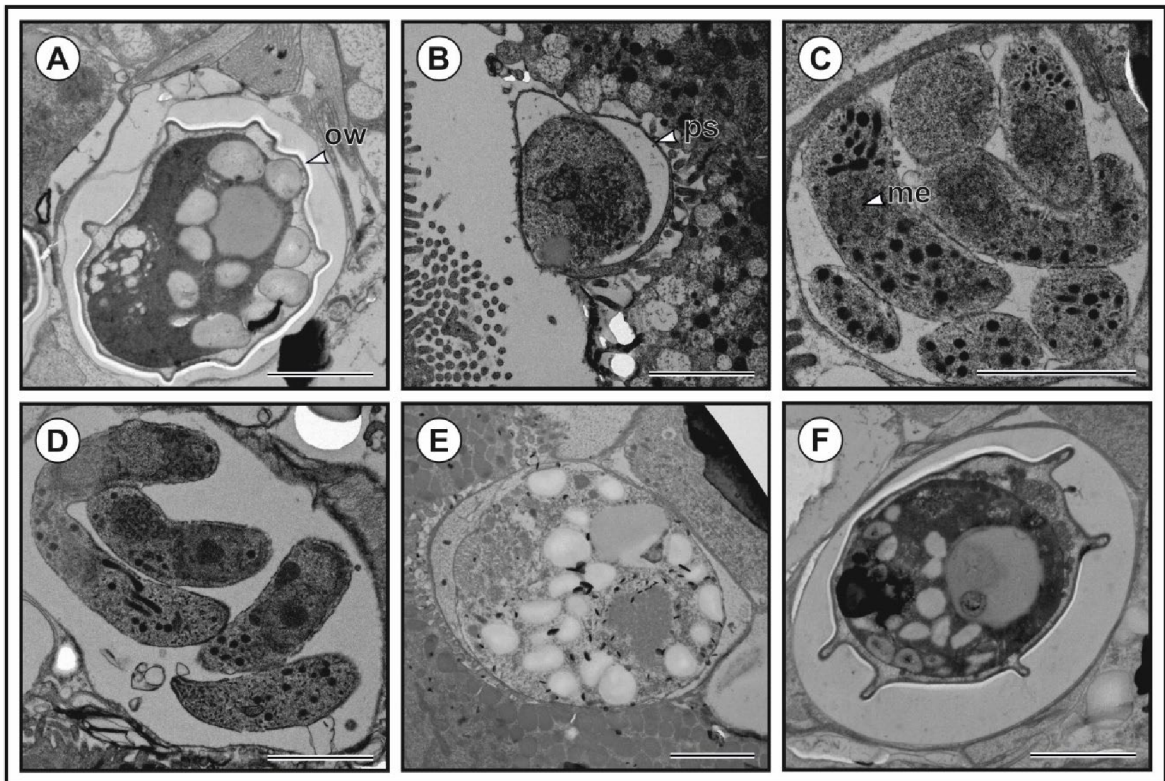
Tabulka 8. Srovnání velikosti vývojových stádií *Cryptosporidium muris* CAT21. Velikost stádií byla stanovena ze seškrabů sliznice žaludku z experimentálně infikovaných SCID myši (*Mus musculus*), IFN- γ -KO (*Mus musculus*) a mastomyši (*Mastomys coucha*) barvených metodou podle Wrighta. Myši byly infikovány dávkou 1×10^6 oocyst a podrobeny pitvě 40 DPI. ND – nedetekováno.

Vývojová stádia	Délka (μm) (Průměr \pm SD)	Šířka (μm) (Průměr \pm SD)
Oocysta	7,22–9,49 (8,46 \pm 0,56)	5,16–7,31 (6,15 \pm 0,57)
Sporozoit	ND	ND
Trofozoit	4,62–11,83 (6,95 \pm 1,62)	3,51–8,65 (5,75 \pm 1,34)
Meront	7,69–11,77 (9,98 \pm 1,44)	6,38–11,04 (8,83 \pm 1,64)
Merozoit	2,38–6,28 (3,98 \pm 1,82)	0,71–1,28 (0,93 \pm 0,23)
Makrogamont	6,76–11,95 (9,48 \pm 1,24)	6,44–10,35 (8,23 \pm 0,97)
Mikrogamont	ND	ND
Zygota	6,08–9,78 (8,82 \pm 0,81)	4,57–6,84 (6,00 \pm 0,59)



Obrázek 9. Vývojová stádia *Cryptosporidium muris* CAT21 získaná seškrabem sliznice žaludku SCID myši (*Mus musculus*) experimentálně infikované 1×10^6 oocyst a usmrčené 60 DPI. **A)** oocysta, **B)** jednojaderný trofozoit s feeder organelou (hrot šipky), **C)** formujícím se merontem, **D)** uvolnění merozoiti (zo), **E)** makrogamont, a **F)** zygota. Měřítko = 10 μm .

V souladu s výsledky nátěrů seškrabů sliznice obarvených Wrightovým barvením, také pomocí TEM jsme detekovali jen některá vývojová stadia (Obrázek 10). Nejčastěji detekovanými stadii byly oocysty, zygoty a jednojaderní trofozoiti. Ve shodě s dříve uvedeným, také TEM analýza neodhalila přítomnost čtyřjaderných merozoitů a mikrogamontů.

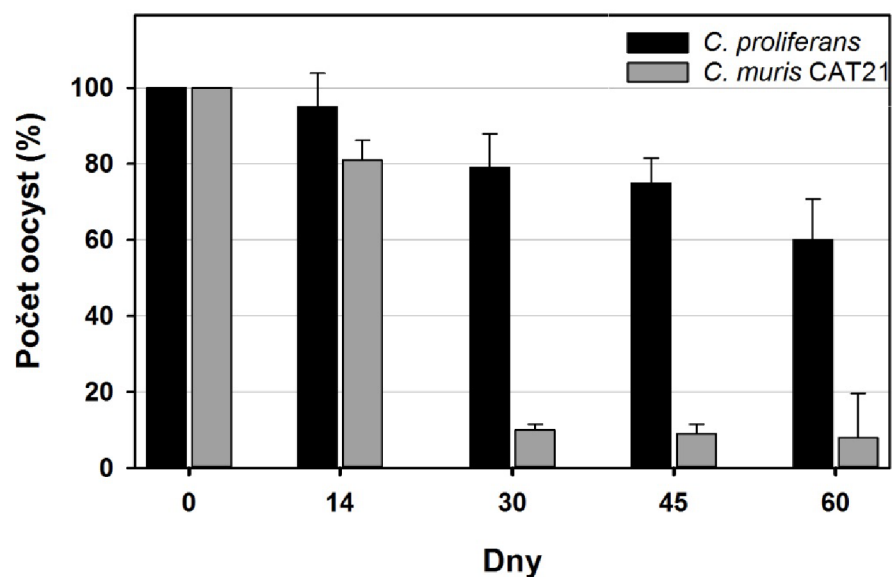


Obrázek 10. Vývojová stádia *Cryptosporidium muris* CAT21 zachycená transmisním elektronovým mikroskopem. **A)** oocysta s formující se stěnou oocysty (ow), **B)** jednojaderný trofozoit ukrytý v parazitoformním vaku (ps), **C)** průřez merontem I. s plně vyvinutými merozoity (me), **D)** průřez merontem II. typu, **E)** makrogamont s pěnovitou strukturou způsobenou amylopektinovými granulemi, a **F)** zygota. Měřítka 2 μ m.

5.8. Degradace oocyst

V průběhu celé práce bylo třeba pracovat s velkým množstvím živých, infekčních oocyst, přičemž bylo zjištěno, že dochází k výrazným ztrátám oocyst při skladování. Z těchto důvodů byl proveden test ověřující schopnost oocyst zachovávat si svou integritu. Jako kontrola byly použity oocysty *C. proliferans*. Pro účely pokusu byly použity čerstvé, ne více než 5 dní staré oocysty s životaschopností vyšší než 97 %. Výsledek tohoto experimentu ukázal, že purifikované oocysty *C. muris* CAT21, které byly skladované pouze v deionizované vodě při teplotě 4 °C samovolně postupně excystují. Během prvních 14 dnů skladování došlo ke ztrátě integrity u 20 % oocyst (excystaci) *C. muris* CAT21 v porovnání se 4 % u *C. proliferans* (Graf 3). Po 30 dnech skladování byl u *C. muris* CAT21 pozorován výrazný pokles v počtu oocyst (90 %), zatímco u *C. proliferans* došlo ke ztrátě pouhých 20 %. Po 45, respektive 60 dnech skladování nebyl u *C. muris* CAT21 pozorován žádný

další pokles v počtu excystovaných oocyst. U *C. proliferans* bylo zaznamenáno postupné snížení na průměrnou hodnotu 60 % oproti začátku experimentu.



Graf 3. Degradace oocyst *C. muris* CAT21 a *C. proliferans* skladovaných v destilované vodě při teplotě 4 °C v průběhu 60 dnů vztahená k hodnotám zjištěným v den 0.

6. Diskuse

Střevní druh *C. parvum* a žaludeční druh *C. muris* byly prvními popsánymi druhy v rámci rodu *Cryptosporidium*. Oba druhy byly na začátku 20. století odlišeny na základě morfologie oocyst a lokalizaci vývojového cyklu v hostiteli, kterým pro oba druhy byla laboratorní myš (Tyzzer 1907; 1912). Až do konce 20. století byly všechny izoláty žaludečních kryptosporidií označovány za *C. muris* nebo *C. muris*-like, a to bez ohledu na to, z jakého hostitele pocházely (Anderson 1987; Dubey et al. 2002; Hikosaka a Nakai 2005).

V současné době jsou uznány tři druhy žaludečních kryptosporidií savců, *C. muris*, *C. andersoni* a *C. proliferans*, s tím, že dva posledně jmenované druhy byly původně označovány jako *C. muris* a byly od *C. muris* odlišeny na základě biologických charakteristik a molekulárních odlišností (Lindsay et al. 2000; Kváč et al. 2016).

V rámci druhu *C. muris* bylo do současné doby popsáno několik izolátů, které se od sebe geneticky „neliší“, ale mají různé biologické vlastnosti (Iseki 1986; Kváč et al. 2008). Odlišnost jednotlivých izolátů *C. muris* je však provedena jen na několika málo genech. Genové sekvence genů *SSU*, *HSP70*, aktin a *TRAP-CI* námi studovaného izolátu *C. muris* CAT21 se nelišily od sekvencí genů dalších izolátů *C. muris* získaných po celém světě z různých hostitelů. Tyto geny jsou běžně používány pro odlišení jednotlivých druhů kryptosporidií v rámci rodu *Cryptosporidium* (Morgan-Ryan et al. 2001; Jiang et al. 2005; Tang et al. 2016). Nicméně lze na základě již dříve publikovaných výsledků předpokládat, že se jednotlivé izoláty budou mezi sebou lišit na dalších genech (Kváč et al. 2016). Příkladem může být vnitrodruhová variabilita v rámci druhu *C. parvum*. Jednotlivé izoláty tohoto druhu se na zmíněných genech neliší, zatímco při genomovém sekvenování byly zjištěny rozdíly. Současně je známo, že jednotlivé izoláty se od sebe výrazně liší biologickými vlastnostmi. Například izoláty označované jako IIc, které byly odlišeny na základě sekvencí genu kódujícího 60 kDa protein, jsou infekční výhradně pro člověka, zatímco izoláty IIa jsou dominantně detekovány u skotu a II d u ovcí (Couto et al. 2014; Wang et al. 2014; Deshpande et al. 2015). Obdobné rozdíly v genetické a biologické diverzitě byly identifikovány u dalších druhů/genotypů kryptosporidií – *C. hominis* nebo *C. ubiquitum* (Feng et al. 2009; Li et al. 2014). Bohužel v rámci genotypizace žaludečních kryptosporidií savců není znám žádný marker, pomocí kterého by bylo možné jednotlivé izoláty od sebe odlišit (Wang et al. 2012).

Stejně tak jako v případě *C. parvum*, *C. hominis* nebo *C. ubiquitum*, také v rámci *C. muris* byly identifikovány různé izoláty lišící se od sebe biologickými vlastnostmi. *Cryptosporidium muris* je považováno za druh specifický pro myši a potkany (Tyzzer 1910; Iseki 1986). Námi studovaný izolát CAT21 byl získán z přirozeně infikované kočky. Lze přepokládat, že infekce je na kočky přenesena z přirozeného hostitele, tedy z myši, které jsou druhem *C. muris* parazitovány relativně často (~30 %) (Kváč 2022, osobní sdělení). Infekce koček *C. muris* jsou však vzácné, o čemž svědčí pouhé tři případy přirozené infekce koček, včetně našeho (Santín et al. 2006; Pavlásek a Ryan 2007). Není jasné, jestli infekce koček je způsobena vlastnostmi izolátu nebo individuální vnímavostí koček. V naší studii jsme kromě přirozeně infikované kočky sledovali i další kočky a koťata žijící spolu s infikovanou kočkou (data nejsou ukázána). Žádná ze sledovaných koček nebyla pozitivní na *C. muris*. Tyto výsledky lze považovat za obdobné těm, které uvádí Santín et al. (2006) a Pavlásek a Ryan (2007). V jejich studiích se vždy jednalo o jednoho jedince. Naopak Iseki et al. (1989), který provedl experimentální inokulaci koček izolátem RN66 uvádí úspěšnou infekci všech tří koček.

Infekce žaludečními kryptosporidiiemi savců je ve většině případů asymptomatická (Iseki et al. 1989; Rhee et al. 1991; Özkul a Aydın 1994; Hikosaka a Nakai 2005; Kváč et al. 2008). V ojedinělých případech byly v souvislosti s žaludeční kryptosporidíózou popsány klinické příznaky. Pospischil et al. (1987) popsali anorexii antilop chovaných v zoologické zahradě, u kterých byly v trusu detekovány oocysty morfologicky identické s *C. muris*. Z dnešního pohledu však nemůžeme s jistotou tvrdit, že se o *C. muris* jednalo, protože nebyla provedena molekulární genotypizace. U skotu infikovaného *C. andersoni* byl u některých kusů popsán pokles mléčné produkce a ztráta tělesné kondice (Esteban a Anderson 1995; Anderson 1998). U námi sledované kočky nebyly v průběhu 110 dnů zjištěny žádné klinické příznaky spojené s infekcí *C. muris*, což je v souladu s výsledky Iseki et al. (1989). Naopak Pavlásek a Ryan (2007) popisují u kočky s *C. muris* infekcí výrazné klinické příznaky včetně průjmu a zvracení. Autoři připisují tyto příznaky infekci *C. muris*, nicméně zcela opomíjejí fakt, že kočka byla současně infikována škrkavkou *Toxocara cati*. Je tedy pravděpodobné, že zdravotní obtíže jimi sledované kočky byly způsobné právě infekcí *T. cati*, pro kterou jsou popisované klinické příznaky typické (Overgaauw 1997; Ursache et al. 2021).

Izolát *C. muris* CAT21 charakterizovaný v této práci byl plně infekční pro laboratorní hlodavce. Ke stejným závěrům dospěli i Pavlásek a Ryan (2007), kteří úspěšně infikovali laboratorní myši. V případě izolátu *C. muris* RN66 nejsou dostupné údaje. Ve studii Iseki

et al. (1989) zpětně nepoužili oocysty získané z koček pro infekce laboratorních hlodavců. Izolát CAT21 byl infekční jak pro imunokompetentní, tak imunodeficitní myši a mastomyši. Obdobnou hostitelskou specifitu popsali i Pavlásek a Ryan (2007) u jejich izolátu, když úspěšně infikovali laboratorní myši a potkany (bez označení kmenů). Prepatentní perioda námi testovaného izolátu byla u myši identická s prepatentní periodou popsanou Pavláskem a Ryanem (2007) (11 dnů). Obdobnou prepatentní periodu popsal i Rhee et al. (1995), který použil izolát *C. muris* MCR. Naopak experimentálně infikovaní psi, morčata, králíci a myši infikovaní izolátem *C. muris* použitým Aydin a Özkul (1996) začali vylučovat oocysty již 7 DPI. K podobným výsledkům dospěli i Matsue et al. (2001), kteří infikovali laboratorní myši izolátem RN66, ale také Kváč et al. (2008), kteří popsali průběh infekce u myši a hrabošů infikovaných izolátem *C. muris* CB03 původně získaného z velblouda dvouhrbého. U tohoto izolátu se však lišila prepatentní perioda u sledovaných hostitelů, kdy u myši byla 9 dní, zatímco u hrabošů 14 dnů (Kváč et al. 2008). Na průběh infekce může mít také vliv infekční dávka. Některé studie uvádějí, že se snižujícím se počtem oocyst v infekční dávce se prodlužuje prepatentní perioda (Matsue et al. 2001), zatímco jiné studie tento fenomén nepotvrzují (Rhee et al. 1995; Aydin a Özkul 1996; Melicherová et al. 2013). V naší studii i ve studiích, se kterými jsme výsledky srovnávali, byly použity infekční dávky od 10^5 do 10^6 , což by nemělo mít zásadní vliv na průběh infekce. Podle Matsue et al. (2001) dochází k prodloužení prepatentní periody až při infekčních dávkách nižších než 10^2 .

Průběh infekce způsobený *C. muris* CAT21 u laboratorních hlodavců se lišil v závislosti na druhu hostitele a současně se odlišoval od jiných izolátů *C. muris*. Imunokompetentní myši infikované *C. muris* CAT21 se vyléčily z infekce do 42 dnů po infekci, zatímco Rhee et al. (1995) uvádí patentní periodu pro izolát MCR v délce 71-75 dnů. Naopak Kváč (2008) uvádí, že BALB/c myši infikované *C. muris* CB03 ztratí infekci do 22 dnů. U imunodeficitních SCID myši jsme po počátečním nárůstu infekce pozorovali výrazný pokles v množství vylučovaných oocyst. Takovýto vývoj u imunodeficitních myši byl neočekávaný a není srovnatelný s žádnými dosud publikovanými výsledky. Kváč et al. (2008; 2016), kteří sledovali průběh infekce *C. muris* CB03, *C. muris* RN66 a *C. proliferans* u SCID myši neuvádí žádný takovýto pokles, naopak zmiňují kontinuální masivní infekci. Podrobné údaje o průběhu infekce dalšími kočičími izoláty *C. muris* v imunodeficitních myších nejsou k dispozici.

U mastomyši, které nejsou často používány jako modelový hostitel, byl zjištěn výrazný rozdíl v průběhu infekce mezi *C. muris* CAT21 a *C. proliferans*. Zatímco mastomyši

infikované *C. proliferans* mají celoživotní infekci doprovázenou masivní intenzitou infekce (Kváč et al. 2016), mastomyši infikované *C. muris* CAT21 se vyléčily za 55 dnů.

Intenzita infekce u námi sledované kočky, která vylučovala okolo 10^4 až 3×10^5 oocyst na gram trusu, se nelišil od údajů Iseki et al. (1989), který uvádí denní produkci okolo 10^7 oocyst/zvíře. Informace o intenzitě infekce u dalších koček nejsou známy (Santín et al. 2006; Pavlásek a Ryan 2007).

Námi sledovaná kočka se po 110 dnech sledování vyléčila z infekce. Vzhledem k tomu, že se jednalo o starší zvíře a nevíme, kdy se nakazila, nelze odhadnout, jak dlouho trvala patentní perioda. Z výsledků Iseki et al (1989) lze odvozovat, že délka paterní periody je delší než 150 dnů, což odpovídá i našemu sledování.

Žaludeční kryptosporidie savců parazitují výhradně ve žláznatém žaludku svých hostitelů (Tyzzer 1910; Iseki 1986; Kváč et al. 2016). V souladu s těmito zjištěními jsou i naše výsledky. Nebyly zjištěny žádné rozdíly v lokalizaci infekce *C. muris* CAT21 a dalších *C. muris* izolátů. Všechny *C. muris* izoláty výhradně infikují žláznatou část žaludku hlodavců. U koček, které byly infikované *C. muris*, byli Iseki et al. (1989) jediní, kteří provedli pitvu a prokázali, že u koček je lokalizace infekce stejná jako u hlodavců. Endogenní vývojová stadia *C. muris* CAT21 se morfologicky a velikostně neliší od stadií ostatních žaludečních kryptosporidií savců (Tyzzer 1910; Melicherová et al. 2013). Ve shodě s ostatními autory jsme našli velký počet jednojaderných trofozoitů a merozoitů. Na rozdíl od předchozích popisů jsme nedetekovali čtyřjaderné meronty a mikrogamonty. Jejich nepřítomnost není pravděpodobně způsobena absencí v rámci vývojového cyklu, ale spíše faktem, že obě zmíněná stadia se vyskytují velmi málo (Melicherová et al. 2013).

Patologické změny způsobené infekcí žaludečními kryptosporidii savců jsou variabilní. U druhu *C. andersoni* byly popsány změny v pH v abomasu a trojnásobné zvýšení hmotnosti infikované části slezu (Anderson 1998). Kváč a Vítovec (2003) popisují také zvýšenou produkci hlenu a nekrotického materiálu. Obdobné změny jsou navíc popisovány i u mastomyši infikovaných *C. proliferans* (Kváč et al. 2016). Naopak u myši infikovaných *C. proliferans*, *C. muris* CB03 nebo *C. muris* RN66 nejsou popisovány žádné makroskopické změny ani výrazné změny ve funkčních vlastnostech (Iseki 1986; Iseki et al. 1989; Kváč et al. 2008; 2016). U myši a mastomyši infikovaných *C. muris* CAT21 byla pozorována zvýšená produkce hlenu. Obdobný nález byl pozorován také u myši a mastomyši infikovaných *C. proliferans* (Kváč et al. 2016). Bohužel ostatní publikace se o produkci hlenu indukovaného infekcí *C. muris* nezmiňují.

Na rozdíl od *C. proliferans*, která způsobuje masivní proliferaci epitelu žaludku, *C. muris* CAT21 takovéto změny neindukuje, což je v souladu s popisem patogenity dalších *C. muris* izolátů (RN66, CB03) (Iseki et al. 1989; Kváč et al. 2008). U myši IFN- γ -KO a mastomyši byla detekována přítomnost zánětlivých infiltrátů při *lamina propria* ukazující na imunitní odpověď hostitele na infekci. Obdobná imunitní odpověď byla popsána u myši a mastomyši infikovaných *C. proliferans*, *C. muris* RN66 a *C. muris* CB03 (Jalovecká et al. 2010; Kváč et al. 2011). Zatímco mastomyši infikované *C. muris* CAT21 a *C. muris* CB03 se z infekce vyléčí (Kváč et al. 2008), infekce *C. proliferans* je u těchto hostitelů celoživotní (Kváč et al. 2016).

Oocysty kryptosporidií mají různý tvar. Zatímco oocysty střevních druhů jsou většinou menší a okrouhlé, oocysty žaludečních druhů jsou oválné a větší. Experimentální studie provedené na druzích patřících do obou skupin, tedy jak střevních, tak žaludečních druhů kryptosporidií, prokázaly, že oocysty náležící jednomu druhu si zachovávají svůj tvar a velikost nezávisle na druhu hostitele, přes který jsou pasážovány (Holubová et al. 2016; Kváč et al. 2018; Ježková et al. 2021a). Ke stejnému závěru jsme dospěli i v naší práci. Oocysty *C. muris* CAT21 získané z přirozeně infikované kočky se morfometricky nelišily od oocyst stejného izolátu pasážovaného přes různé hlodavčí hostitele. Porovnáním velikostí oocyst různých izolátů *C. muris*, které jsme během práce měli k dispozici, jsme zjistili, že oocysty CAT21 se velikostně neliší od oocyst *C. muris* RN66 a *C. muris* CB03 jsou větší než oocysty *C. proliferans*. Pokud porovnáme publikované údaje, zjistíme, že mezi jednotlivými izoláty ale nepatrné rozdíly jsou. Izolát *C. muris*, který byl získaný z člověka je výrazně menší než ostatní izoláty *C. muris* (Katsumata et al. 2000) a velikostně identický s izolátem z *Clethrionomys glareolus* (Chalmers et al. 1997).

Oocysty kryptosporidií se vyvinuly tak, aby chránily sporozoity a maximalizovaly jejich přežití od okamžiku, kdy se uvolní z epitelové buňky, až do okamžiku, kdy je pozře nový hostitel (Widmer et al. 2007; Bouzid et al. 2013; Sponseller et al. 2014). Obecně se předpokládá, že oocysty kryptosporidií jsou velice odolné nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí. Nicméně naše poznatky vycházejí především z šíření *C. parvum* v populaci hospodářských zvířat a lidí (Robertson et al. 2014). Mezi jednotlivými druhy však pravděpodobně existují významné rozdíly, které dosud nebyly intenzivně studovány. Oocysty *C. parvum* jsou extrémně odolné a zůstávají infekční více než 8 měsíců v temných, chladných a vlhkých podmínkách (Robertson et al. 1992). S tím je spojena i schopnost oocyst zachovat si integritu stěny oocysty a ochránit sporozoity. Oocysty *C. andersoni* zůstávají infekční jen po dobu 5-6 měsíců (Kváč et al. 2007a) a dochází k postupné

degradaci oocyst, nicméně většina oocyst zůstává kompaktních. V rámci naší studie jsme porovnávali oocysty *C. muris* CAT21 a *C. proliferans*. Zatímco oocysty *C. proliferans* se ukazují jako strukturálně stabilní během skladování a podle dřívějších studií si zachovávají infektivitu po dobu více než 6 měsíců (Schulzová 2022), většina oocyst (90 %) *C. muris* CAT21 ztratilo integritu stěny oocysty během 2 měsíců skladování.

7. Závěry

Výsledky této práce prokázaly, že izolát *C. muris* CAT21 není na testovaných genech molekulárně odlišitelný od jiných izolátů *C. muris*, ale vykazuje některé odlišné biologické vlastnosti:

- vyvolává výraznou imunitní odpověď hostitele projevující se migrací/proliferací buněk imunitního systému do tkáně žaludku;
- způsobuje mírnější infekci u imunodeficitních myší;
- aktivuje hlenové buňky ve žláznaté části žaludku ke zvýšené produkci hlenu, obdobně jako *C. proliferans*;
- izolát *C. muris* CAT 21 má výrazně omezenou životaschopnost oocyst projevující se jejich rychlou degradací.

8. Seznam použité literatury

- ABRAHAMSEN M. S., TEMPLETON T. J., ENOMOTO S., ABRAHANTE J. E., ZHU G., LANCTO C. A., DENG M., LIU C., WIDMER G., TZIPORI S., BUCK G. A., XU P., BANKIER A. T., DEAR P. H., KONFORTOV B. A., SPRIGGS H. F., IYER L., ANANTHARAMAN L., ARAVIND L. a KAPUR V., 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. **304**(5669), 441–445.
- AKIYOSHI D. E., DILO J., PEARSON C., CHAPMAN S., TUMWINE J. a TZIPORI S., 2003. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. *Infection and Immunity*. **71**(4), 1828–1832.
- ALDEYARBI H. M. a KARANIS P., 2016. The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology*. **143**(6), 749–761.
- ALVAREZ-PELLITERO P., QUIROGA M. I., SITJÀ-BOBADILLA A., REDONDO M. J., PALENZUELA O., PADRÓS F., VÁZQUEZ S. a NIETO J. M., 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms*. **62**(1–2), 133–145.
- ALVAREZ-PELLITERO P. a SITJÀ-BOBADILLA A., 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*. **32**(8), 1007–1021.
- AMADI B., MWIYA M., SIANONGO S., PAYNE L., WATUKA P., KATUBULUSHI M. a KELLY P., 2009. High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. *BMC Infectious Diseases*. **9**, 195.
- ANDERSON B. C., 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Veterinary Pathology*. **24**(3), 235–238.
- ANDERSON B. C., 1991. Experimental infection in mice of *Cryptosporidium muris* isolated from a camel. *The Journal of Protozoology*. **38**(6), 16–17.

- ANDERSON B. C., 1998. Cryptosporidiosis in bovine and human health. *Journal of Dairy Science*. **81**(11), 3036–3041.
- ARROWOOD M. J. a STERLING C. R., 1987. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *The Journal of Parasitology*. **73**(2), 314–319.
- AYDIN Y. a ÖZKUL I. A., 1996. Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Veterinary Parasitology*. **66**(3), 257–262.
- BOLLAND S. J., ZAHEDI A., OSKAM C., MURPHY B. a RYAN U., 2020. *Cryptosporidium bollandi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from angelfish (*Pterophyllum scalare*) and oscar fish (*Astronotus ocellatus*). *Experimental Parasitology*. **217**, 107956.
- BOUZID M., HUNTER P. R., CHALMERS R. M. a TYLER K. M., 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*. **26**(1), 115–134.
- BROWNSTEIN D. G., STRANDBERG J. D., MONTALI R. J., BUSH M. a FORTNER J., 1977. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. *Veterinary Pathology*. **14**(6), 606–617.
- CACCIÒ S. M. a WIDMER G., 2014. *Cryptosporidium*: parasite and disease. Springer Science & Business Media. 564 pp. ISBN 978-3-7091-1562-6.
- CARRENO R. A., MARTIN D. S. a 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. *Parasitology Research*. **85**(11), 899–904.
- CASEMORE D. P., ARMSTRONG M. a SANDS R. L., 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*. **38**(12), 1337–1341.

- CAVALIER-SMITH T., 2014. The neomuran revolution and phagotrophic origin of eukaryotes and cilia in the light of intracellular coevolution and a revised tree of life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **6**(9), a016006.
- CLARKE J. J., 1895. A Study of Coccidia met with in Mice. *Journal of Cell Science*. **2-37**(147), 277–283.
- CLODE P. L., KOH W. H. a THOMPSON R. C. A., 2015. Life without a host cell: What is *Cryptosporidium*? *Trends in Parasitology*. **31**(12), 614–624.
- COUTO M. C. M., LIMA M. F. a BOMFIM T. C. B., 2014. New *Cryptosporidium parvum* subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. *Acta Tropica*. **130**, 117–122.
- CURRENT W. L., UPTON S. J. a HAYNES T. B., 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology*. **33**(2), 289–296.
- ČONDLOVÁ Š., HORČIČKOVÁ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., HLÁSKOVÁ L., KONEČNÝ R., STANKO M., MCEVOY J. a KVÁČ M., 2018. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. *European Journal of Protistology*. **63**, 1–12.
- DESHPANDE A. P., JONES B. L., CONNELLY L., POLLOCK K. G., BROWNLIE S. a ALEXANDER C. L., 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates from human cryptosporidiosis cases in Scotland. *Parasitology*. **142**(2), 318–325.
- DÍAZ P., NAVARRO E., REMESAR S., GARCÍA-DIOS D., MARTÍNEZ-CALABUIG N., PRIETO A., LÓPEZ-LORENZO G., LÓPEZ C. M., PANADERO R., FERNÁNDEZ G., DÍEZ-BAÑOS P. a MORRONDO P., 2021. The age-related *Cryptosporidium* species distribution in asymptomatic cattle from north-western Spain. *Animals*. **11**(2), 256.
- DJURETIC T., WALL P. G. a NICHOLS G., 1997. General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. *Communicable Disease Report*. **7**(3), 41–45.

- DOYLE J. J. a DOYLE J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. **19**(1), 11–15.
- DUBEY J. P., MARKOVITS J. E. a KILLARY K. A., 2002. *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Veterinary Pathology*. **39**(3), 363–371.
- DUPONT H. L., CHAPPELL C. L., STERLING C. R., OKHUYSEN P. C., ROSE J. B. a JAKUBOWSKI W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *The New England Journal of Medicine*. **332**(13), 855–859.
- ELWIN K., HADFIELD S. J., ROBINSON G., CROUCH N. D. a CHALMERS R. M., 2012. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *International Journal for Parasitology*. **42**(7), 675–682.
- ENGLISH E. D., GUÉRIN A., TANDEL J. a STRIEPEN B., 2022. Live imaging of the *Cryptosporidium parvum* life cycle reveals direct development of male and female gametes from type I meronts. *PLoS Biology*. **20**(4), e3001604.
- ESTEBAN E. a ANDERSON B. C., 1995. *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *Journal of Dairy Science*. **78**(5), 1068–1072.
- FAYER R., SPEER C. A. a DUBEY J. P., 1990. General biology of *Cryptosporidium*. In: DUBEY J. P., SPEER C. A. a FAYER R. (Eds.), *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Press. pp. 1–29. ISBN 9780849364013
- FAYER R., TROUT J. M., XIAO L., MORGAN U. M., LAI A. A. a DUBEY J. P., 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *The Journal of Parasitology*. **87**(6), 1415–1422.
- FAYER R., PHILLIPS L., ANDERSON B. C. a BUSH M., 1991. Chronic cryptosporidiosis in a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. **22**(2), 228–232.

- FAYER R. a SANTÍN M., 2009. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*. **164**(2–4), 192–200.
- FAYER R., SANTÍN M. a MACARISIN D., 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*. **172**(1–2), 23–32.
- FAYER R., SANTÍN M. a TROUT J. M., 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*. **156**(3–4), 191–198.
- FAYER R., SANTÍN M. a XIAO L., 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Parasitology*. **91**(3), 624–629.
- FAYER R. a XIAO L., (Eds.), 2007. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, 560 pp. ISBN 1-4200-5226-8.
- FAYER R., 2007. General biology. In: FAYER R. a XIAO L., (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press. pp. 1–42. ISBN 1-4200-5226-8.
- FENG Y., ALDERISIO K. A., YANG W., BLANCERO L. A., KUHNE W. G., NADARESKI C. A., REID M. a XIAO L., 2007. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**(20), 6475–6483.
- FENG Y., LI N., DUAN L. a XIAO L., 2009. *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**(1), 153–157.
- GASSER R. B., ZHU X., CACCIO S., CHALMERS R., WIDMER G., MORGAN U. M., THOMPSON R. C., POZIO E. a BROWNING G. F., 2001. Genotyping *Cryptosporidium parvum* by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal and heat shock gene regions. *Electrophoresis*. **22**(3), 433–437.
- GELLETLIE R., STUART J., SOLTANPOOR N., ARMSTRONG R. a NICHOLS G., 1997. Cryptosporidiosis associated with school milk. *The Lancet*. **350**(9083), 1005–1006.

- HAJDUŠEK O., DITRICH O. a ŠLAPETA J., 2004. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*. **122**(3), 183–192.
- HENRIKSEN S. A. a POHLENZ J. F., 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*. **22**(3–4), 594–596.
- HIKOSAKA K. a NAKAI Y., 2005. A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Parasitology Research*. **97**(5), 373–379.
- HOLUBOVÁ N., SAK B., HORČIČKOVÁ M., HLÁSKOVÁ L., KVĚTOŇOVÁ D., MENCHACA S., MCEVOY J. a KVÁČ M., 2016. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitology Research*. **115**(6), 2243–2251.
- HOLUBOVÁ N., TŮMOVÁ L., SAK B., HEJZLAROVÁ A., KONEČNÝ R., MCEVOY J. a KVÁČ M., 2020. Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. *Parasites & Vectors*. **13**(1), 340.
- HOLUBOVÁ N., ZIKMUNDOVÁ V., LIMPOUCHOVÁ Z., SAK B., KONEČNÝ R., HLÁSKOVÁ L., RAJSKÝ D., KOPACZ Z., MCEVOY J. a KVÁČ M., 2019. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *European Journal of Protistology*. **69**, 70–87.
- HOMMER V., EICHHOLZ J. a PETRY F., 2003. Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **52**(3), 359–364.
- HOOVER D. M., HOERR F. J., CARLTON W. W., HINSMAN E. J. a FERGUSON H. W., 1981. Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus* Bloch and Schneider. *Journal of Fish Diseases*. **4**(5), 425–428.
- HORČIČKOVÁ M., ČONDLOVÁ Š., HOLUBOVÁ N., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., HLÁSKOVÁ L., KONEČNÝ R., SEDLÁČEK F., CLARK M., GIDDINGS C., MCEVOY J. a KVÁČ M., 2019. Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology*. **146**(2), 220–233.

- HŮRKOVÁ L., HAJDUŠEK O. a MODRÝ D., 2003. Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. *Journal of Wildlife Diseases*. **39**(2), 441–444.
- CHALMERS R. M., STURDEE A. P., BULL S. A., MILLER A. a WRIGHT S. E., 1997. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitology Research*. **83**(5), 478–482.
- CHECKLEY W., WHITE A. C., JAGANATH D., ARROWOOD M. J., CHALMERS R. M., CHEN X., FAYER R., GRIFFITHS J. K., GUERRANT R. L., HEDSTROM L., HUSTON C. D., KOTLOFF K. L., KANG G., MEAD J. R., MILLER M., PETRI W. A., PRIEST J. W., ROOS D. S., STRIEPEN B., THOMPSON R. C. A., WARD H. D., VAN VOORHIS W. A., XIAO L., ZHU G. a HOUPPT E. R., 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet. Infectious Diseases*. **15**(1), 85–94.
- INMAN L. R. a TAKEUCHI A., 1979. Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Veterinary Pathology*. **16**(1), 89–95.
- ISEKI M., 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Japanese Journal of Parasitology*. **28**, 285–307.
- ISEKI M., 1986. Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Japanese Journal of Parasitology*. **35**(6), 521–526.
- ISEKI M., MAEKAWA T., MORIYA K., UNI S. a TAKADA S., 1989. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN66) in various laboratory animals. *Parasitology Research*. **75**(3), 218–222.
- JALOVECKÁ M., SAK B., KVÁČ M, KVĚTOŇOVÁ D., KUČEROVÁ Z. a SALÁT J., 2010. Activation of protective cell-mediated immune response in gastric mucosa during *Cryptosporidium muris* infection and re-infection in immunocompetent mice. *Parasitology Research*. **106**(5), 1159–1166.
- JEŽKOVÁ J., HORČIČKOVÁ M., HLÁSKOVÁ L., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., NOVÁK J., HOFMANNOVÁ L., MCEVOY J. a KVAČ M., 2016. *Cryptosporidium*

testudinis sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium tortoise* genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitologica*. **63**, 035.

JEŽKOVÁ J., LIMPOUCHOVÁ Z., PREDIGER J., HOLUBOVÁ N., SAK B., KONEČNÝ R., KVĚTOŇOVÁ D., HLÁSKOVÁ L., ROST M., MCEVOY J., RAJSKÝ D., FENG Y. a KVÁČ M., 2021a. *Cryptosporidium myocastoris* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae), the Species Adapted to the Nutria (*Myocastor coypus*). *Microorganisms*. **9**(4), 813.

JEŽKOVÁ J., PREDIGER J., HOLUBOVÁ N., SAK B., KONEČNÝ R., FENG Y., XIAO L., ROST M., MCEVOY J. a KVÁČ M., 2021b. *Cryptosporidium ratti* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in the Czech Republic. *Parasitology*. **148**(1), 84–97.

JIANG J., ALDERISIO K. A. a XIAO L., 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(8), 4446–4454.

JIRKŮ M., VALIGUROVÁ A., KOUDELA B., KRÍŽEK J., MODRÝ D. a ŠLAPETA J., 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*. **55**(2), 81–94.

JOKIPII L. a JOKIPII A. M., 1986. Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine*. **315**(26), 1643–1647.

JONES K. H. a SENFT J. A., 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **33**(1), 77–79.

KATSUMATA T., HOSEA D., RANUH I. G., UGA S., YANAGI T. a KOHNO S., 2000. Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **62**(1), 70–72.

KODÁDKOVÁ A., KVÁČ M., DITRICH O., SAK B. a XIAO L., 2010. *Cryptosporidium muris* in a reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). *The Journal of Parasitology*. **96**(1), 211–212.

- KOUDELA B., MODRÝ D. a VÍTOVEC J., 1998. Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. *Veterinary Parasitology*. **76**(3), 181–188.
- KVÁČ M., KODÁDKOVÁ A., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., JALOVECKÁ M., ROST M. a SALÁT J., 2011. Activated CD8+ T cells contribute to clearance of gastric *Cryptosporidium muris* infections. *Parasite Immunology*. **33**(4), 210–216.
- KVÁČ M. a VÍTOVEC J., 2003. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Medicine*. **50**(9), 451–457.
- KVÁČ M., 2008. Žaludeční kryptosporidie a kryptosporidóza savců. České Budějovice. Habilitační práce. Zemědělská fakulta JČU. pp. 111.
- KVÁČ M., HANZLÍKOVÁ D., SAK B. a KVĚTOŇOVÁ D., 2009a. 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. *Veterinary Parasitology*. **160**(3–4), 319–322.
- KVÁČ M., HAVRDOVÁ N., HLÁSKOVÁ L., DAŇKOVÁ T., KANDĚRA J., JEŽKOVÁ J., VÍTOVEC J., SAK B., ORTEGA Y., XIAO L., MODRÝ D., CHELLADURAI J. R. J. J., PRANTLOVÁ V. a MCEVOY J., 2016. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLoS ONE*. **11**(1), e0147090.
- KVÁČ M., HOFMANNOVÁ L., HLÁSKOVÁ L., KVĚTOŇOVÁ D., VÍTOVEC J., MCEVOY J. a SAK B., 2014. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology*. **201**(1–2), 9–17.
- KVÁČ M., HOFMANNOVÁ L., ORTEGA Y., HOLUBOVÁ N., HORČIČKOVÁ M., KICIA M., HLÁSKOVÁ L., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B. a MCEVOY J., 2017. Stray cats are more frequently infected with zoonotic protists than pet cats. *Folia Parasitologica*. **64**, 034.

- KVÁČ M., KESTŘÁNOVÁ M., KVĚTOŇOVÁ D., KOTKOVÁ M., ORTEGA Y., MCEVOY J. a SAK B., 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Experimental Parasitology*. **131**(1), 107–110.
- KVÁČ M., KESTŘÁNOVÁ M., PINKOVÁ M., KVĚTOŇOVÁ D., KALINOVÁ J., WAGNEROVÁ P., KOTKOVÁ M., VÍTOVEC J., DITRICH O., MCEVOY J., STENGER B. a SAK B., 2013. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology*. **191**(3–4), 218–227.
- KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., SALÁT J. a DITRICH O., 2007a. Viability staining and animal infectivity of *Cryptosporidium andersoni* oocysts after long-term storage. *Parasitology Research*. **100**(2), 213–217.
- KVÁČ M., MYŠKOVÁ E., HOLUBOVÁ N., KELLNEROVÁ K., KICIA M., RAJSKÝ D., MCEVOY J., FENG Y., HANZAL V. a SAK B., 2021. Occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in wild foxes, wolves, jackals, and bears in central Europe. *Folia Parasitologica*. **68**, 002.
- KVÁČ M., ONDRÁČKOVÁ Z., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B. a VÍTOVEC J., 2007b. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology*. **143**(3), 229–233.
- KVÁČ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., DITRICH O., HOFMANNOVÁ L., MODRÝ D., VÍTOVEC J. a XIAO L., 2008. Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Veterinary Parasitology*. **153**(3–4), 363–367.
- KVÁČ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D. a SECOR W. E., 2009b. Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Veterinary Parasitology*. **163**(1–2), 33–38.

- KVÁČ M., VLNATÁ G., JEŽKOVÁ J., HORČIČKOVÁ M., KONEČNÝ R., HLÁSKOVÁ L., MCEVOY J. a SAK B., 2018. *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *European Journal of Protistology*. **63**, 96–104.
- LAATAMNA A. E., WAGNEROVÁ P., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., XIAO L., ROST M., MCEVOY J., SAADI A. R., AISSI M. a KVÁČ M., 2015. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Veterinary Parasitology*. **208**(3), 135–142.
- LAMISERE H., BHALCHANDRA S., KANE A. V., ZENG X., MO D., ADAMS W., ESTES M. K. a WARD H. D., 2022. Differential response to the course of *Cryptosporidium parvum* infection and its impact on epithelial integrity in differentiated versus undifferentiated human intestinal enteroids. *Infection and Immunity*. **90**(11), e0039722.
- LASSER K. H., LEWIN K. J. a RYNING F. W., 1979. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Human Pathology*. **10**(2), 234–240.
- LEVINE N. D., 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *The Journal of Parasitology*. **66**(5), 830–834.
- LEVINE N. D., 1984. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *The Journal of Protozoology*. **31**(1), 94–98.
- LI N., XIAO L., ALDERISIO K., ELWIN K., CEBELINSKI E., CHALMERS R., SANTÍN M., FAYER R., KVÁČ M., RYAN U., SAK B., STANKO M., GUO Y., WANG L., ZHANG L., CAI J., ROELLIG D. a FENG Y., 2014. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases*. **20**(2), 217–224.
- LI X., PEREIRA C. M. G., LARSEN R., XIAO C., PHILLIPS R., STRIBY K., MCCOWAN B. a ATWILL E. R., 2015. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species. *International Journal for Parasitology*. **4**(3), 343–350.

- LINDSAY D. S., UPTON S. J., OWENS D. S., MORGAN U. M., MEAD J. R. a BLAGBURN B. L., 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. **47**(1), 91–95.
- LIU C., WANG L., LANCTO C. A. a ABRAHAMSEN M. S., 2009. Characterization of a *Cryptosporidium parvum* protein that binds single-stranded G-strand telomeric DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **165**(2), 132–141.
- MAC KENZIE W. R., HOXIE N. J., PROCTOR M. E., GRADUS M. S., BLAIR K. A., PETERSON D. E., KAZMIERCZAK J. J., ADDISS D. G., FOX K. R. a ROSE J. B., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*. **331**(3), 161–167.
- MASUNO K., YANAI T., HIRATA A., YONEMARU K., SAKAI H., SATOH M., MASEGI T. a NAKAI Y., 2006. Morphological and immunohistochemical features of *Cryptosporidium andersoni* in cattle. *Veterinary Pathology*. **43**(2), 202–207.
- MASUNO K., FUKUDA Y., KUBO M., IKARASHI R., KURAISHI T., HATTORI S., KIMURA J., KAI C., YANAI T. a NAKAI Y., 2014. Infectivity of *Cryptosporidium andersoni* and *Cryptosporidium muris* to normal and immunosuppressive cynomolgus monkeys. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **76**(2), 169–172.
- MATSUBAYASHI M., KIMATA I., ISEKI M., HAJIRI T., TANI H., SASAI K. a BABA E., 2005. Infectivity of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. *Veterinary Parasitology*. **129**(1–2), 165–168.
- MATSUE T., FUJINO T., KAJIMA J. a TSUJI M., 2001. Infectivity and oocyst excretion patterns of *Cryptosporidium muris* in slightly infected mice. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **63**(3), 319–320.
- MCDONALD V., KORBEL D. S., BARAKAT F. M., CHOUDHRY N. a PETRY F., 2013. Innate immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *Parasite Immunology*. **35**(2), 55–64.

- MEISEL J. L., PERERA D. R., MELIGRO C. a RUBIN C. E., 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*. **70**(6), 1156–1160.
- MELE R., MORALES M. A. G., TOSINI F. a POZIO E., 2003. Indinavir reduces *Cryptosporidium parvum* infection in both *in vitro* and *in vivo* models. *International Journal for Parasitology*. **33**(7), 757–764.
- MELICHEROVÁ J., ILGOVÁ J., KVÁČ M., SAK B., KOUDELA B. a VALIGUROVÁ A., 2013. Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology*. **141**(2), 287–303.
- MILÁČEK P. a VÍTOVEC J., 1985. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica*. **32**(1), 50.
- MODRÝ D., HOFMANNOVÁ L., ANTALOVÁ Z., SAK B. a KVÁČ M., 2012. Variability in susceptibility of voles (Arvicolinae) to experimental infection with *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *Parasitology Research*. **111**(1), 471–473.
- MONTICELLO T. M., LEVY M. G., BUNCH S. E. a FAIRLEY R. A., 1987. Cryptosporidiosis in a feline leukemia virus-positive cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **191**(6), 705–706.
- MORGAN U. M., SARGENT K. D., ELLIOT A. a THOMPSON R. C. A., 1998. *Cryptosporidium* in cats—Additional evidence for *C. felis*. *The Veterinary Journal*. **156**(2), 159–161.
- MORGAN-RYAN U. M., MONIS P., POSSENTI A., CRISANTI A. a SPANO F., 2001. Cloning and phylogenetic analysis of the ribosomal internal transcribed spacer-1 (ITS1) of *Cryptosporidium wrairi* and its relationship to *C. parvum* genotypes. *Parassitologia*. **43**(4), 159–163.

- MORGAN-RYAN U. M., FALL A., WARD L. A., HIJJAWI N., SULAIMAN I., FAYER R., THOMPSON R. C. A., OLSON M., LAL A. a XIAO L., 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. **49**(6), 433–440.
- MTAMBO M. M., NASH A. S., BLEWETT D. A., SMITH H. V. a WRIGHT S., 1991. *Cryptosporidium* infection in cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. *The Veterinary Record*. **129**(23), 502–504.
- NIME F. A., BUREK J. D., PAGE D. L., HOLSCHER M. A. a YARDLEY J. H., 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. **70**(4), 592–598.
- OVERGAAUW P. A., 1997. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. *Critical Reviews in Microbiology*. **23**(3), 233–251.
- ÖZKUL İ. A. a AYDIN Y., 1994. Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Veterinary Parasitology*. **55**(1), 129–132.
- PANCIERA R. J., THOMASSEN R. W. a GARNER F. M., 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*. **8**(5–6), 479–484.
- PAPERNA I. a VILENKIN 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. *Diseases of Aquatic Organisms*. **27**, 95–101.
- PAVLÁSEK I. a RYAN U., 2007. The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Veterinary Parasitology*. **144**(3), 349–352.
- PAVLÁSEK I., 1999. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Remedia Clinical Microbiology*. **3**, 290–301.
- PAVLÁSEK I. a RYAN U., 2008. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. *Experimental Parasitology*. **118**(3), 434–437.
- POHJOLA S., OKSANEN H., JOKIPII L. a JOKIPII A. M., 1986. Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. **18**(2), 173–178.

- POONACHA K. B. a PIPPIN C., 1982. Intestinal cryptosporidiosis in a cat. *Veterinary Pathology*. **19**(6), 708–710.
- POSPISCHIL A., STIGLMAIR-HERB M. T., HEGEL G. a WIESNER H., 1987. Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Veterinary Record*. **121**, 379–380.
- POWER M. L. a RYAN U. M., 2008. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *The Journal of Parasitology*. **94**(5), 1114–1117.
- PREDIGER J., JEŽKOVÁ J., HOLUBOVÁ N., SAK B., KONEČNÝ R., ROST M., MCEVOY J., RAJSKÝ D. a KVÁČ M., 2021. *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Microorganisms*. **9**(10), 2050.
- REIF J. S., WIMMER L., SMITH J. A., DARGATZ D. A. a CHENEY J. M., 1989. Human cryptosporidiosis associated with an epizootic in calves. *American Journal of Public Health*. **79**(11), 1528–1530.
- REN X., ZHAO J., ZHANG L., NING C., JIAN F., WANG R., LV C., WANG Q., ARROWOOD M. J. a XIAO L., 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*. **130**(3), 274–281.
- RHEE J. K., KIM H. C. a EUN G. S., 1998. Infection kinetics and developmental biology of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in Korean native kids and corriedale lambs. *The Korean Journal of Parasitology*. **36**(3), 171–181.
- RHEE J. K., SEU Y. S. a PARK B. K., 1991. Isolation and identification of *Cryptosporidium* from various animals in Korea. II. Identification of *Cryptosporidium muris* from mice. *The Korean Journal of Parasitology*. **29**(2), 149–159.
- RHEE J. K., SO W. S. a KIM H. C., 1999. Age-dependent resistance to *Cryptosporidium muris* (strain MCR) infection in golden hamsters and mice. *The Korean Journal of Parasitology*. **37**(1), 33–37.

- RHEE J. K., YOON S. Y. a PARK B. K., 1995. Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in mice. *The Korean Journal of Parasitology*. **33**(4), 377–382.
- ROBERTSON L. J., CAMPBELL A. T. a SMITH H. V., 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(11), 3494–3500.
- ROBERTSON L. J., BJÖRKMAN C., AXÉN C. a FAYER R., 2014. Cryptosporidiosis in farmed animals. In: CACCIÒ S. M. a WIDMER G., (Eds.) *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer Science & Business Media, pp. 149–235. ISBN 978-3-7091-1562-6.
- ROBINSON G., WRIGHT S., ELWIN K., HADFIELD S. J., KATZER F., BARTLEY P. M., HUNTER P. R., NATH M., INNES E. A. a CHALMERS R. M., 2010. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*. **40**(13), 1539–1548.
- RYAN U. M., MONIS P., ENEMARK H. L., SULAIMAN I., SAMARASINGHE B., READ C., BUDDLE R., ROBERTSON I., ZHOU L., THOMPSON R. C. A. a XIAO L., 2004. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *The Journal of Parasitology*. **90**(4), 769–773.
- RYAN U. M., XIAO L., READ C., SULAIMAN I. M., MONIS P., LAL A. A., FAYER R. a PAVLÁSEK I., 2003a. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *The Journal of Parasitology*. **89**(4), 809–813.
- RYAN U. M., POWER M. a XIAO L., 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the red kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **55**(1), 22–26.
- RYAN U. M., PAPANINI A., MONIS P. a HIJJAWI N., 2016. It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*. **105**, 305–313.

- RYAN U. M., PAPANINI A., TONG K., YANG R., GIBSON-KUEH S., O'HARA A., LYMBERG A. a XIAO L., 2015. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*. **150**, 31–35.
- RYAN U. M., XIAO L., READ C., ZHOU L., LAL A. A. a PAVLÁSEK I., 2003b. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(7), 4302–4307.
- SAK B., PETRŽELKOVÁ K. J., KVĚTOŇOVÁ D., MYNÁŘOVÁ A., SHUTT K. A., POMAJBÍKOVÁ K., KALOUSOVÁ B., MODRÝ D., BENAVIDES J., TODD A. a KVÁČ M., 2013. Long-term monitoring of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at different stages of habituation in Dzanga Sangha protected areas, Central African Republic. *PLoS ONE*. **8**(8), e71840.
- SANTÍN M., TROUT J. M., VECINO J. A. C., DUBEY J. P. a FAYER R., 2006. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Veterinary Parasitology*. **141**(3–4), 334–339.
- SARGENT K. D., MORGAN U. M., ELLIOT A. a THOMPSON R. C., 1998. Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. *Veterinary Parasitology*. **77**(4), 221–227.
- SATOH M., HIKOSAKA K., SASAKI T., SUYAMA Y., YANAI T., OHTA M. a NAKAI Y., 2003. Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(1), 691–692.
- SCHULZOVÁ T., 2022. Faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií hlodavců. České Budějovice. Diplomová práce. **Fakulta zemědělská a technologická JČU. pp. 43**
- SLAVIN D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*. **65**(3), 262–266.

- SLIFKO T., FRIEDMAN D., ROSE J. a JAKUBOWSKI W., 1997. An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**, 3669–75.
- SMITH H. V., NICHOLS R. A. B. a GRIMASON A. M., 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*. **21**(3), 133–142.
- SPONSELLER J. K., GRIFFITHS J. K. a TZIPORI S., 2014. The evolution of respiratory cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clinical Microbiology Reviews*. **27**(3), 575–586.
- SULAIMAN I. M., LAL A. A. a XIAO L., 2002. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *The Journal of Parasitology*. **88**(2), 388–394.
- SVOBODOVÁ V., SVOBODA M. a VERNEROVÁ E., 2013. Klinická parazitologie psa a kočky. 2. vydání. Medicus Veterinarius. pp. 256. ISBN 80-905468-1-1.
- TANG Y., LI N., SONG M., ROELLIG D. M., FENG Y. a XIAO L., 2016. Development of a multilocus sequence typing tool for high-resolution subtyping and genetic structure characterization of *Cryptosporidium ubiquitum*. *Infection, Genetics and Evolution*. **45**, 256–261.
- TINAVSKÁ J., 2021. Vývoj protilátkové imunitní odpovědi proti kryptosporidiovým infekcím. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta JČU. pp. 61.
- TORRES J., GRACENEA M., GÓMEZ M. S., ARRIZABALAGA A. a GONZÁLEZ-MORENO O., 2000. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Veterinary Parasitology*. **92**(4), 253–260.
- TYZZER E. E., 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **5**(1), 12–13.
- TYZZER E. E., 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of Medical Research*. **23**(3), 487-510.3.

- TYZZER E. E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde*. **26**, 394–412.
- TYZZER E. E., 1929. Coccidiosis in gallinaceous birds. *American Journal of Epidemiology*. **10**(2), 269–383.
- TZIPORI S., 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiological Reviews*. **47**(1), 84–96.
- UNI S., ISEKI M., MAEKAWA T., MORIYA K. a TAKADA S., 1987. Ultrastructure of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) parasitizing the murine stomach. *Parasitology Research*. **74**(2), 123–132.
- UPTON S. J. a CURRENT W. L., 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *The Journal of Parasitology*. **71**(5), 625–629.
- URSACHE A. L., GYÖRKE A., MIRCEAN V., DUMITRACHE M. O., CODEA A. R. a COZMA V., 2021. *Toxocara cati* and other parasitic enteropathogens: More commonly found in owned cats with gastrointestinal signs than in clinically healthy ones. *Pathogens*. **10**(2), 198.
- VALIGUROVÁ A., HOFMANNOVÁ L., KOUDELA B. a VÁVRA J., 2007. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. **54**(6), 495–510.
- VALIGUROVÁ A., JIRKŮ M., KOUDELA B., GELNAR M., MODRÝ D. a ŠLAPETA J., 2008. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *International Journal for Parasitology*. **38**(8), 913–922.
- VETTERLING J. M., JERVIS H. R., MERRILL T. G. a SPRINZ H., 1971. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *The Journal of Protozoology*. **18**(2), 243–247.
- WANG L., CAO L., ZHENG S., CHANG Y., ZHANG K., ZHANG S. a ZHANG L., 2021. Molecular identification and biological characterization of *Cryptosporidium muris* from camels (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasites & Vectors*. **14**(1), 365.

- WANG R., JIAN F., ZHANG L., NING C., LIU A., ZHAO J., FENG Y., QI M., WANG H., LV C., ZHAO G. a XIAO L., 2012. Multilocus sequence subtyping and genetic structure of *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *PLoS ONE*. **7**(8), e43782.
- WANG R., ZHANG L., AXÉN C., BJORKMAN C., JIAN F., AMER S., LIU A., FENG Y., LI G., LV C., ZHAO Z., QI M., DONG H., WANG H., SUN Y., NING C. a XIAO L., 2014. *Cryptosporidium parvum* IId family: clonal population and dispersal from Western Asia to other geographical regions. *Scientific Reports*. **4**, 4208.
- WETZEL D. M., SCHMIDT J., KUHLENSCHMIDT M. S., DUBEY J. P. a SIBLEY L. D., 2005. Gliding Motility Leads to Active Cellular Invasion by *Cryptosporidium parvum* Sporozoites. *Infection and Immunity*. **73**(9), 5379–5387.
- WIDMER G., KLEIN P. a BONILLA R., 2007. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology*. **134**(11), 1583–1588.
- XIAO L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*. **124**(1), 80–89.
- XIAO L. a CAMA V. A., 2018. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In: ORTEGA Y. R. a STERLING C. R., (Eds). Foodborne parasites. Springer. pp. 73–117. ISBN 978-3-319-67664-7.
- XIAO L., FAYER R., RYAN U. M. a UPTON S. J., 2004a. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*. **17**(1), 72–97.
- XIAO L., MORGAN U. M., LIMOR J., ESCALANTE A., ARROWOOD M., SHULAW W., THOMPSON R. C. A., FAYER R. a LAL A. A., 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(8), 3386–3391.
- 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. a LAL A. A., 2004b. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**(2), 891–899.

ZAHEDI A., BOLLAND S. J., OSKAM C. L. a RYAN U., 2021. *Cryptosporidium abrahamseni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidii) from red-eye tetra (*Moenkhausia sanctaefilomenae*). *Experimental Parasitology*. **223**, 108089.

ZAHEDI A., DURMIC Z., GOFTON A. W., KUEH S., AUSTEN J., LAWSON M., CALLAHAN L., JARDINE J. a RYAN U. M., 2017. *Cryptosporidium homai* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidii) from the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Veterinary Parasitology*. **245**, 92–101.