



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra zootechnických věd

Bakalářská práce

Infektivita sporozoitů kryptosporidií s ohledem na lokalizaci
vývojového cyklu

Autorka práce: Eliška Sklenářová

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

České Budějovice
2024

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Kryptosporidie, patřící do kmene Apicomplexa, jsou paraziti vyskytující se u všech tříd obratlovců po celém světě, včetně člověka. Infikují gastrointestinální trakt, což může vést k akutnímu nebo chronickému průjmovému onemocnění, zejména u jedinců s oslabeným imunitním systémem. Infekce se šíří kontaminovanou vodou, potravou nebo přímým kontaktem. Klíčovým aspektem je proces excystace, který umožňuje prvokům infikovat hostitele. Studie se zaměřuje na podmínky prostředí zažívacího traktu, ve kterých probíhá excystace kryptosporidií, a na faktory nutné k tomuto procesu. Výzkum ukázal, že různé druhy kryptosporidií vykazují variabilitu v excystaci v závislosti na lokalizaci v těle hostitele.

Výsledky naznačují, že různé druhy kryptosporidií excystují nejefektivněji v různých částech trávicího traktu, tedy pro úspěšnou infekci je důležitá správná lokalizace excystace. Experimenty ukázaly, že teplota prostředí a pH hrají klíčovou roli. Výzkum naznačuje existenci ochranného faktoru v těle hostitele, který omezuje excystaci v trávicím traktu. Studie také zkoumá prepatentní periodu jednotlivých druhů kryptosporidií a zjišťuje, že způsob inokulace nemá vliv na délku této periody. Porozumění procesu excystace a podmínkám, které ho ovlivňují, je klíčové pro vývoj účinné terapie kryptosporidiózy.

Klíčová slova: *Cryptosporidium mortiferum*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium proliferans*, excystace, lokalizace vývoje, laparotomické operace, inokulace, infektivita

Abstract

Cryptosporidium, belonging to the phylum Apicomplexa, are parasites found across all classes of vertebrates worldwide, including humans. They infect the gastrointestinal tract, leading to acute or chronic diarrheal disease, especially in individuals with weakened immune systems. Infection spreads through contaminated water, food, or direct contact. A main aspect is the excystation process, which allows the parasites to infect the host. The study focuses on the environmental conditions of the gastrointestinal tract where *Cryptosporidium* excystation occurs and the factors necessary for this process. Research has shown that different species of *Cryptosporidium* exhibit variability in excystation depending on their location in the host's body. The results suggest that different species of *Cryptosporidium* excyst most efficiently in different parts of the digestive tract, thus proper excystation localization is crucial for successful infection. Experiments have shown that environmental temperature and pH play a key role. Research indicates the existence of a protective factor in the host's body that limits excystation in the digestive tract. The study also examines the prepatent period of individual *Cryptosporidium* species and finds that the method of inoculation does not affect the length of this period. Understanding the excystation process and the conditions that influence it is crucial for the development of effective cryptosporidiosis therapy.

Keywords: *Cryptosporidium mortiferum*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium proliferans*, excystation, localization of development, laparotomy surgery, inoculation, infectivity

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala především mému vedoucímu práce prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za velkou ochotu, trpělivost a odbornou pomoc při zpracování této práce. Dále samozřejmě všem pracovníkům laboratoře Veterinární a humánní protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i., za jejich pozitivní přístup, přátelské zázemí a cenné rady.

Obsah

Úvod.....	9
1 Literární přehled.....	10
1.1 Taxonomie.....	10
1.2 Kryptosporidie a kryptosporidióza.....	12
1.3 Vývojový cyklus.....	13
1.3.1 Metody excystace.....	15
1.4 Tkáňová specifita	17
1.5 <i>Cryptosporidium parvum</i>	18
1.5.1 Hostitelé	18
1.5.2 Lokalizace	18
1.5.3 Patogenita a infekce	18
1.6 <i>Cryptosporidium mortiferum</i>	18
1.6.1 Hostitelé	19
1.6.2 Lokalizace	19
1.6.3 Patogenita a infekce	19
1.7 <i>Cryptosporidium proliferans</i>	19
1.7.1 Hostitelé	19
1.7.2 Lokalizace	20
1.7.3 Patogenita a infekce	20
2 Cíl práce	21
3 Metodiky a materiál	22
3.1 Materiál	22
3.1.1 Laboratorní zvířata	22
3.1.2 Oocysty kryptosporidií.....	22
3.2 Metody.....	22
3.2.1 Sběr a uchovávání trusu pozitivního na oocysty kryptosporidií	22

3.2.2	Purifikace kryptosporidií.....	22
3.2.3	Počítání oocyst v Bürkerově komůrce	23
3.2.4	Kontrola infekce – specifické barvení oocyst	24
3.2.5	Izolace DNA.....	25
3.2.6	PCR	26
3.2.7	Gelová elektroforéza	26
3.2.8	Izolace z gelu a sekvenování.....	27
3.2.9	Pitva zvířat	27
3.2.10	Excystace <i>in vitro</i>	28
3.2.11	Průtoková cytometrie	29
3.2.12	Laparotomická infekce.....	30
3.3	Test životaschopnosti oocyst.....	31
3.4	Design experimentů.....	31
3.4.1	Infektivita a excystace oocyst <i>C. proliferans</i> uchovávaných v teplotě 37 °C	31
3.4.2	Excystace <i>in vitro</i> s obsahem tekuté fáze zažívacího traktu	32
3.4.3	Laparotomické infekce.....	32
3.5	Statistická analýza	33
4	Výsledky	34
	Identita izolátů.....	34
4.1	34
4.2	Infektivita oocyst <i>C. proliferans</i> uchovávaných v teplotě 37 °C a získaných z různých částí zažívacího traktu	34
4.3	Excystace oocyst <i>C. proliferans</i> uchovávaných v teplotě 37 °C.....	35
4.4	Excystace oocyst <i>C. parvum</i> a <i>C. mortiferum</i> vystavených tekuté fázi obsahu zažívacího traktu	35
4.5	Laparotomické operace	37
5	Diskuse.....	38

Závěr	42
Seznam použité literatury.....	43
Seznam obrázků	48
Seznam tabulek	49
Seznam grafů.....	50

Úvod

Kryptosporidie patří do kmene Apicomplexa (Cavalier et Smith, 2014). Vyskytují se u všech tříd obratlovců a nacházejí se po celém světě. Kryptosporidie infikují gastrointestinální trakt většiny obratlovců včetně člověka. Je známo, že některé druhy infikují mnoho hostitelů, jiné pouze určité hostitelské skupiny (např. přežvýkavce nebo hlodavce), nebo pouze jeden druh hostitele (Fayer et Xiao, 2007).

Kryptosporidie způsobují u svých hostitelů průjemové onemocnění, kryptosporidiózu, které může probíhat akutně nebo chronicky s různou intenzitou a klinickými příznaky. U jedinců s poruchou imunitního systému může být infekce život ohrožující (Rašková et al., 2012). Infekční oocysty kryptosporidií se mohou šířit kontaminovanou vodou, potravou nebo přímým kontaktem. Hostitel se nakazí pozřením těchto infekčních oocyst (Khan et Witola, 2023). Různí hostitelé mohou působit jako rezervoáry a kryptosporidie mohou dlouho přetrvávat v prostředí jako oocysty (Bones et al., 2019).

Infekce začíná, když hostitel pozře infekční oocysty. Následuje 1. fáze vývojového cyklu – excystace, která probíhá pouze za určitých podmínek prostředí, z nichž stěžejní je teplota těla (Fayer et al., 1990).

Tato práce je zaměřena na studování podmínek prostředí zažívacího traktu, ve kterých excystace probíhá s ohledem na lokalizaci vývoje, a zároveň na podmínky, které jsou nutné k excystaci a samotnému propuknutí infekce.

1 Literární přehled

Kryptosporidie patří do kmene Apicomplexa (Cavalier et Smith, 2014). Jsou rodem parazitických prvoků, kteří infikují epiteliální buňky na hranici mikroklků gastrointestinálního traktu. Vyskytují se u všech tříd obratlovců a nacházejí se po celém světě. Průběh infekce se liší podle druhu kryptosporidie. Je známo, že některé druhy infikují mnoho hostitelů, jiné pouze určité hostitelské skupiny (např. přežvýkavce nebo hloдавce), nebo pouze jeden druh hostitele. Některé druhy kryptosporidií způsobují závažné patologické změny na infikovaných orgánech a infekce může být fatální, u jiných probíhá infekce bezpříznakově v chronické formě (Fayer et Xiao, 2007).

1.1 Taxonomie

Jedním z hlavních důvodů vleklých sporů o taxonomii kryptosporidií je obtížnost naplnění definice biologického druhu. Klasická definice druhu je, že jedinci se vzájemně kříží mezi sebou v přirozených populacích, ale zároveň se reprodukčně izolují od jiných skupin (druhů), což lze u kryptosporidií těžko určit.

Jednotlivé druhy kryptosporidií se mohou od sebe lišit lokalizací vývojového cyklu v hostiteli a velikostí oocyst. Nicméně tyto biologické vlastnosti se u řady druhů překrývají a nejsou tak spolehlivým diferenciativním a diagnostickým znakem. Přesto jsou tyto charakteristiky požadovány při popisu nového druhu. V současné době jsou druhy od sebe odlišovány na základě genetických metod (Xiao et al., 2004; Ryan et al., 2021).

Taxonomické zařazení:

Říše: Chromalveolata (Adl et al., 2005)

Tato říše je velmi početná a zahrnuje protista a mnohobuněčná eukaryota. Název této říše byl odvozen od bývalé říše Chromista a přítomnosti kortikálních alveol. Jediným společným znakem mezi organismy z této říše je přítomnost plastidů a celulózy. Nejnovější studie ukazují, že nejde o monofyletickou skupinu.

Podříše: Alveolata (Cavalier-Smith, 1991)

Tento název vznikl díky přítomnosti kortikálních alveol na povrchu buněk. Vyztužují povrch buňky pod cytoplazmatickou membránou pomocí proteinů a celulózy.

Kmen: Apicomplexa (Levine, 1990)

Výtrusovci nesou své jméno podle tzv. apikálního komplexu. To je soubor několika organel, které se nacházejí na předním pólu vývojových stádií (sporozoitů a

merozoitů). Nalezneme tam skeletovité útvary a sekreční žlázy (kyjovité rhoptrie a vláskovité mikronemy). Apikální komplex slouží k napadení hostitelské buňky.

Třída: Conoidasida (Levine, 1988)

Dříve byly kryptosporidie mylně řazeny do kokcií.

Rod: *Cryptosporidium* (Tyzzer, 1907)

V současné době je uznáno 51 platných druhů kryptosporidií a velké množství izolátů bez taxonomického zařazení, které nazýváme genotypy a jež jsou často pojmenovány dle typového hostitele (Fayer, 2010). Nejvíce druhů (30) bylo detekováno u savců a nejméně (1) u obojživelníků (Tabulka 1). Rod *Cryptosporidium* a jeho odlišnost od kokcií byl poprvé pozorován v žaludku a následně ve střevě u myši (Tyzzer 1910, 1912).

Tabulka 1: Platné druhy kryptosporidií savců

Druh	Citace
<i>C. alticolis</i>	Horčíčková et al., 2021
<i>C. andersoni</i>	Lindsay et al., 2000
<i>C. apodemi</i>	Čondlová et al., 2018
<i>C. bovis</i>	Fayer et al., 2005
<i>C. canis</i>	Fayer et al., 2001
<i>C. cuniculus</i>	Robinson et al., 2010
<i>C. ditrichi</i>	Čondlová et al., 2018
<i>C. erinacei</i>	Kváč et al., 2014
<i>C. fayeri</i>	Ryan et al., 2008
<i>C. felis</i>	Iseki, 1979
<i>C. homai</i>	Zahedi et al., 2017
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan et al., 2002
<i>C. macropodum</i>	Power et al., 2008
<i>C. microti</i>	Horčíčková et al., 2018
<i>C. mortiferum</i>	Ježková et al., 2023
<i>C. muris</i>	Tyzzer, 1910
<i>C. myocastoris</i>	Ježková et al., 2021
<i>C. occultus</i>	Kváč et al., 2018
<i>C. parvum</i>	Tyzzer, 1912
<i>C. proliferans</i>	Kváč et al., 2016
<i>C. rattii</i>	Ježková et al., 2021
<i>C. rubeyi</i>	Li et al., 2015
<i>C. ryanae</i>	Fayer et al., 2008
<i>C. scrofarum</i>	Kváč et al., 2013
<i>C. suis</i>	Ryan et al., 2004
<i>C. tyzzeri</i>	Ren et al., 2012
<i>C. ubiquitum</i>	Fayer et al., 2010
<i>C. viatorum</i>	Elwin et al., 2012
<i>C. wrairi</i>	Vetterling et al., 1991

<i>C. xiaoi</i>	Fayer et Santín, 2009
<i>C. equi</i>	Huang et al., 2023

1.2 Kryptosporidie a kryptosporidióza

Kryptosporidie způsobují u svých hostitelů průjemové onemocnění, kryptosporidiózu, které může probíhat akutně nebo chronicky s různou intenzitou a klinickými příznaky. U jedinců s poruchou imunitního systému může být infekce život ohrožující (Rašková et al., 2012).

Většina druhů parazituje v oblasti mikroklků střevní sliznice, menší skupina kryptosporidií parazituje ve žláznatém žaludku, v dýchacím systému, případně v dalších orgánech jako jsou ledviny nebo žlučovody. Infekce vede k atrofii klků, hyperplazii krypt a infiltraci leukocytů v *lamina propria* (Goodgame et al., 1995).

Zdrojem infekce je fekálně-orální cesta. Infekční oocysty kryptosporidií se mohou šířit kontaminovanou vodou, potravou nebo přímým kontaktem. Hostitel se nakazí pozřením těchto infekčních oocyst (Khan et Witola, 2023). Různí hostitelé mohou působit jako rezervoáry a kryptosporidie mohou dlouho v prostředí jako oocysty přetrvávat (Bones et al., 2019). Oocysty jsou také odolné vůči téměř všem konvenčním dezinfekčním metodám a úpravám vody. Kontrola parazitární infekce je velmi obtížná kvůli vylučování velkého množství infekčních oocyst ve výkalech infikovaných jedinců, které kontaminují životní prostředí a slouží jako zdroj infekce pro vnímavé hostitele (Khan et Witola, 2023).

Za většinu lidských případů kryptosporidiózy jsou zodpovědné druhy *C. hominis* a *C. parvum*. Přestože lidé jsou často infikováni druhem *C. parvum*, řada infekcí je způsobena zoonotickým přenosem infekce ze zvířat (Ryan et al., 2021). U méně častých druhů infikujících člověka jsou zdrojem infekce hlodavci, zejména ti, kteří žijí synantropním způsobem života (Rašková et al., 2012).

Typickým příznakem infekce je vodnatý průjem a malabsorpce související s malabsorpcí sodíku, elektrogenní sekrecí chloridů a zvýšenou propustností střev (Goodgame et al., 1995).

V současné době není k dispozici spolehlivý léčebný preparát. Vývoj léku na kryptosporidiózu je velmi obtížný kvůli jedinečnému intracelulárnímu umístění v hostiteli. Jedinou léčbou infekce kryptosporidiemi schválenou americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) je nitazoxanid, u kterého byla prokázána střední účinnost u pacientů s kompetentní imunitou. Zároveň nejsou k dispozici žádné účinné terapeutické léky pro léčbu závažné, potenciálně život ohrožující kryptosporidiózy u

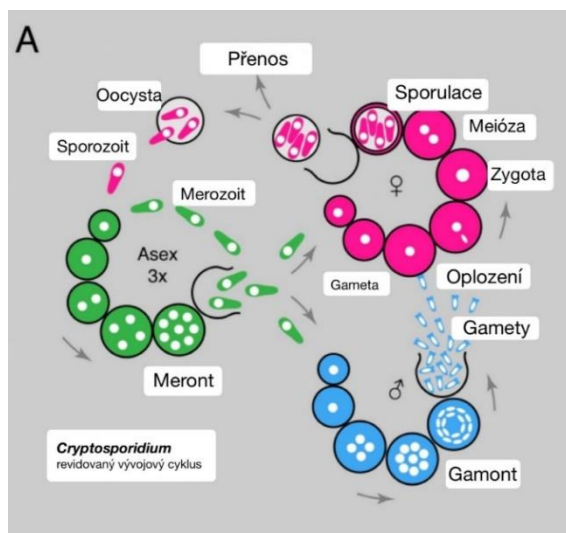
imunodeficientních pacientů, malých dětí a novorozeneých hospodářských zvířat (Khan et Witola, 2023). V případě imunodeficientních pacientů léčených nitazoxanidem dochází k relapsům infekce.

1.3 Vývojový cyklus

Paraziti rodu *Cryptosporidium* byly dlouho zařazovány mezi kokcidie, a to právě díky podobnosti vývojového cyklu. Ta byla ovšem za použití molekulárních metod vyvrácena (Fayer et al., 2008). Délka vývojového cyklu je druhově specifická, ale závisí i na hostiteli a stavu jeho imunitního systému. Kryptosporidie se v hostiteli rozmnožují jak nepohlavně, tak pohlavně a k přenosu mezi hostiteli dochází prostřednictvím meiotických spor zvaných oocysty (English et al., 2022).

Vývojový cyklus můžeme rozdělit do 4 fází:

1. Excystace: uvolnění infekčních sporozoitů z oocysty
2. Merogonie: nepohlavní fáze
3. Gametogonie: tvoření mikrogamet a makrogamet – pohlavní rozmnožování
4. Sporogonie: vznik infekčních sporozoitů uvnitř oocysty (Current et García, 1991; English et al., 2022)



Obrázek 1: Revidovaný vývojový cyklus *Cryptosporidium* spp. (English et al., 2022) - upraveno

1. Excystace

Životní cyklus kryptosporidie začíná, když hostitel pozře oocysty. Po pozření oocysty proběhne 1. fáze, tedy excystace, bez které nemůže být zahájena infekce (Fayer et al., 1990). Pro většinu kryptosporidií je typické, že oocysta musí být vystavena redukčním podmínkám v žaludku s následnou expozici podmínkám ve střevě (Fayer et

Xiao, 2007). U kryptosporidií může taková expozice zvýšit počet excystovaných oocyst, ale byla prokázána i excystace oocyst v teplých vodných roztocích. Díky této vlastnosti mohou oocysty infikovat i respirační systém (Fayer et al., 1990), žlučník a žlučové cesty, lymfatické tkáně a samčí i samičí pohlavní systém (Fleta et al., 1995; Fayer et Xiao, 2007). Na jednom pólu oocysty se otevře tzv. sutura a dojde k uvolnění infekčních sporozoitů. Sporozoiti, kteří excystují z oocysty, jsou pohybliví. Nejprve se přiblíží k apikálnímu konci potencionálně vhodné hostitelské buňky a pak ji aktivně napadají (Fayer et Xiao, 2007; O'Hara et Chen, 2011).

Připojení sporozoiti, kteří mají tvar pŕlměsíce nebo bumerangu, se stávají oválnými až kulovitými. Vakuoly tvořící se na předním konci se shlukují a obklopují parazita a tvoří parazitoformní vak, který se spojí s cytoplazmatickou membránou hostitelské buňky a tím tvoří rozhraní parazit-hostitel. Sporozoiti v parazitoformním vaku jsou intracelulární, ale nejsou v přímém kontaktu s cytoplazmou hostitelské buňky, takže jsou zároveň extracytoplazmatické. V místě spojení s buňkou se vytváří jedinečná struktura, tzv. vyživovací (feeder) organela, která poskytuje parazitovi živiny a energii z hostitelské buňky. V experimentech na buněčných kulturách bylo připojování a internalizace dokončeno během 15 minut (Fayer et Xiao, 2007).

2. Merogonie

Další fází je merogonie. V parazitoformním vaku se tvoří trofozoit, který se nepohlavně množí a vznikají meronti (Bouزيد et al., 2013). Předmětem diskuzí je počet generací merogonií. Dosud se předpokládá, že kryptosporidie provádí 2–3 generace nepohlavní replikace (Obrázek 1), po nichž následuje jediná generace sexuálních stádií, která je nezávislá na podnětech z prostředí. Při merogonii vznikají meronti typu I, II a případně III. Z merontů typu I vzniká 8 merozoitů a z merontů typu II, respektive III vznikají 4 merozoiti (English et al., 2022). Nicméně Striepen a kol. v roce 2023 publikovali výsledky, které ukazují, že merozoiti II. typu se na gametogonii nepodílejí a jejich přítomnost ve vývojovém cyklu tak zůstává nevyjasněna.

3. Gametogonie a oplození

Potomstvo každého meronta má asexuální nebo sexuální účel, přičemž merozoiti posledního typu dávají vzniknout samčím gamontům (mikrogamont) a samičím gamontům (makrogamont; Obrázek 1) (English et al., 2022; Göebel et Braendler, 1982). Samčí gamont podstupuje 4 kola synchronního jaderného dělení, které dávají vzniknout 16 mikrogamentám, zatímco samičí gamont dává vzniknout jedné gametě, která se zvětšuje a hromadí bílkoviny, lipidy a sacharidy pro budoucí oocystu. Samčí

gamety oplodňují samičí gametu. Po oplození dochází k meióze (vznik zygoty) a tvorbě ochranné stěny (English et al., 2022). Produkce oocyst je nezbytná pro přenos, ale také může hrát roli v pokračující infekci ve stávajícím hostiteli (Tandel et al., 2019).

4. Sporogonie

Procesem sporogonie prochází diploidní zygota. Výsledkem jsou 4 haploidní sporozoiti uložení ve sporulované oocystě, která může být buď tenkostěnná, nebo silnostěnná (Current et al., 1986). Oocysty jsou ihned po vyloučení z těla hostitele infekční (English et al., 2022).

1.3.1 Metody excystace

V průběhu evoluce se v rámci rodu *Cryptosporidium* vyvinuly 2 linie, z nichž jedna se přizpůsobila kyselému prostředí žaludku a druhá linie kryptosporidií parazituje v prostředí střeva. Dříve se předpokládalo, že všechny druhy střevních kryptosporidií parazitují primárně v tenkém střevě a z tohoto důvodu byly excystační metody koncipované na základě těchto předpokladů.

Předpokládalo se, že proces uvolňování sporozoitů z oocysty, excystace, je ovlivněn podmínkami, kde infekce probíhá (Widmer et al., 2007). Experimentální výzkumy prokázaly, že pro úspěšnou excystaci je třeba více faktorů a řada spouštěčů z prostředí – změny teplot, pH, působení žlučových solí, enzymů a proteáz.

Byly vyvinuty *in vitro* metody pro excystaci žaludečních a střevních kryptosporidií. V rámci žaludečních druhů byly excystační metody testovány u druhů *C. andersoni* a *C. muris* (Fayer et al., 2009). Všechny dosud provedené studie se shodly na faktu, že klíčovým faktorem vyvolávajícím excystaci žaludečních kryptosporidií savců je teplota těla hostitele (Bones et al., 2019). V rámci střevních druhů byly testovány pouze druhy *C. parvum* a *C. hominis*, které primárně infikují tenké střevo, zejména duodenum a ileum. Excystace těchto druhů je podporována tělesnou teplotou a krátkodobým působením kyselého prostředí, když oocysty procházejí žaludkem a následnou změnou pH ve střevě, a přítomností žlučových solí a enzymů v duodenu (Fleta et al., 1995; Fayer et Xiao, 2007). Bylo prokázáno, že tyto faktory zároveň zvyšují propustnost stěny oocysty molekulám. Žlučové soli zase podporují rychlost excystace a deoxycholát sodný invazivitu sporozoitů vůči epiteliálním buňkám. Během excystace byla zjištěna zvýšená produkce proteázy, která sice nemá vliv na rychlost excystace, ale na motilitu (pohyblivost) sporozoitů. U oocyst *C. parvum*, které byly přivedeny do

kontaktu s enterocyty při centrifugaci, se zároveň prokazatelně zvýšil počet infikovaných buněk. Povrch oocyst má schopnost vázat na sebe lektiny, podobně jako je tomu u sacharidů. Je možné, že hostitelská buňka poskytuje oocystě signály související s vývojem prostřednictvím přímého kontaktu. Vazba lektinu na oocysty také excystaci zvyšuje, což naznačuje, že povrchové molekuly oocysty mohou excystaci přímo vyvolávat. Dalším faktorem, který napomáhá vyvolání excystace u *C. parvum* je i kyselina sialová (Choudry et al., 2008).

1. Metoda Rasmussen et al. (1993)

Oocysty *C. parvum* jsou opakovaně promývány a centrifugovány s roztokem PBS. Poté jsou suspendovány v 2 % chlornanu sodném a nechávají se inkubovat při pokojové teplotě. Následuje opět opakované promývání v PBS a resuspendování v excystačním médiu (0,75 % kyselina taurocholová a 0,25 % trypsin v PBS) a inkubace při 37 °C po dobu 45 min.

2. Metoda Petry & Harris (1999)

Zde jsou oocysty *C. parvum* pouze centrifugovány po dobu 3 min. Supernatant je odsán a pelet s oocystami suspendován ve zředěném komerčním bělidle (0,25 % chlornanu sodného) a inkubován po dobu 10 minut na ledu. Poté jsou oocysty třikrát promyty vodou a resuspendovány v excystačním roztoku (0,75 % taurocholátu sodného v médiu RPMI 1640) a inkubovány při 37 °C po dobu 2 hodin.

3. Metoda Mead et al. (1990)

Oocysty *C. parvum* jsou odstředěny za účelem odstranění PBS, poté resuspendovány v 1 ml 0,5 % chlornanu sodného, inkubovány po dobu 5 minut při 4 °C a centrifugovány. Sediment oocyst je neutralizován v 0,1 % thiosíranu sodném (zředěném v PBS), odstředěn a dvakrát promyt PBS. Následně jsou oocysty inkubovány v excystačním roztoku (skládajícím se z 0,75 % taurocholátu sodného a 0,25 % trypsinu zředěného v PBS) po dobu 1 hodiny při 37 °C. Poté je suspenze oocyst/sporozoitů dvakrát promyta v PBS.

4. Metoda Black et al. (1996)

Oocysty *C. parvum* jsou přidány do excystačního média (150 mg taurocholátu sodného a 50 mg trypsinu rozpuštěného v 5 ml PBS) a vortexovány. Dále jsou oocysty inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin a poté při pokojové teplotě po dobu 30 minut.

5. Metoda Gut & Nelson (1999)

Oocysty *C. parvum* jsou zde centrifugovány, resuspendovány v 10 mM HCl a inkubovány po dobu 10 minut při 37 °C. Poté jsou oocysty znovu odstředěny, resuspendovány v médiu RPMI 1640 (předehřáté na 37 °C) s 0,8 % taurocholátem sodným a inkubovány po dobu 10 minut při 37 °C. Následně jsou suspenze odstředěny a resuspendovány v PBS.

6. Metoda Rennecker et al. (1999)

V této metodě jsou oocysty *C. parvum* vystaveny účinku 2 ml excystačního média (1,5 % taurocholát sodný a 0,5 % trypsinu v PBS; předehřáté na 37 °C) a inkubovány při 37 °C po dobu 1 hodiny. Poté jsou zkumavky odstředěny (6 800 g po dobu 3 min) a sporozoity resuspendovány v PBS.

7. Metoda Widmer et al. (2007)

Tato metoda je určena pro excystaci žaludečních druhů kryptosporidií (*C. muris* a *C. andersoni*). Oocysty jsou inkubovány ve vodní lázni o teplotě 37 °C v dH₂O po dobu 45 minut. Po inkubaci jsou oocysty centrifugovány (10 min při 8 000 g). Přidá se 400 µl 0,75 % sodium taurocholatu (předehřátého na 37 °C). Inkubují se 45 minut při teplotě 37 °C. Poté se centrifugují 2 minuty při 1 000 g. Widmer et al. (2007) prokázal, že žaludeční kryptosporidie excystují i v případě, že je pouze inkubujeme ve vodě při 37 °C.

1.4 Tkáňová specifita

Orgánová specifita (lokalizace endogenního vývoje uvnitř hostitele) druhů a genotypů kryptosporidií se může lišit a kryptosporidie jsou rozdělovány na dvě hlavní skupiny: střevní skupina, která také zahrnuje druhy a genotypy s afinitou k plicím, a žaludeční skupina, která má afinitu ke žlázám žláznatého žaludku (Kváč et al., 2016).

Mezi druhy parazitující v žaludku můžeme zařadit například *C. muris*, *C. serpentis*, *C. galli*, *C. fragile*, *C. proliferans*, nebo *C. proventriculi*. Druhy s lokalizací primárně v tenkém střevě jsou *C. tyzzeri*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. ryanae* či *C. wrairi* (Ren et al., 2012; Fayer et al., 2005; Fayer et al., 2001; Fayer et al., 2008; Vetterling et al., 1971). Kryptosporidie s vývojem v tlustém střevě jsou druhy *C. ratti*, *C. ornithophilus*, *C. microti* a *C. occultus* (Ježková et al., 2021; Holubová et al., 2020; Hořčíčková et al., 2019; Kváč et al., 2018).

Lokalizace parazita byla zaznamenána ale i na více místech trávicí trubice zároveň, jako je to u druhů *C. parvum*, *C. meleagridis*, nebo *C. mortiferum*, které parazitují jak v tenkém, tak tlustém střevě (Slavín, 1955; Upton a Current, 1985; Tůmová et al., 2023). Druh *C. baileyi* parazituje například jak ve střevech, tak ve značné míře i v močových nebo dýchacích cestách (Current et al., 1986). A v neposlední řadě *C. avium*, který má kromě střev též afinitu i k močovým cestám, ledvinám nebo kloace (Holubová et al., 2016).

1.5 *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium parvum je druhou popsanou kryptosporidií, kterou od *C. muris* odlišil na základě velikosti oocyst E. E. Tyzzer již v roce 1912.

1.5.1 Hostitelé

Tento druh je významným patogenem způsobující kryptosporidiózu u zvířat i lidí a je předpokládána vnímavost všech savců. Je považován za nejméně hostitelsky specifický druh kryptosporidií (Fayer, 2000).

1.5.2 Lokalizace

Infekce *C. parvum* postihuje u různých hostitelů často tenké i tlusté střevo a způsobuje postupné vymizení mikrokloků sliznice (Tzipori et al., 1981).

1.5.3 Patogenita a infekce

Nejvíce se infekce projevuje zejména u novorozených mláďat a u jedinců s oslabenou imunitou. U zdravých dospělých jedinců je infekce většinou asymptomatická, ale infekční oocysty vylučované trusem mohou infekci rozšířit a vyvolat příznaky u slabších jedinců. Klinické příznaky jsou vodnaté průjmy, zvracení, hubnutí a deprese a může dojít až k úhynu hostitele (Ennemark et al., 2003). Prepatentní doba je udávána 4–22 dní (Tyzzer, 1912) a tvar oocyst *C. parvum* je elipsovitý o velikosti $4,5 \times 5,0 \mu\text{m}$ (Upton et Current, 1985).

1.6 *Cryptosporidium mortiferum*

Cryptosporidium mortiferum, dříve známé jako *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I bylo popsáno teprve nedávno (Ježková et al., 2023). Tento druh je běžným parazitem severoamerických veverek. Do Evropy byl tento druh zavlečen s veverkami šedými východními (Tůmová et al., 2023).

1.6.1 Hostitelé

Přirozeným hostitelem *C. mortiferum* jsou hlodavci (nejvíce veverky). Rizikem se stává pro evropské druhy veverek, pro které je infekce letální (Tůmová et al., 2023). Ukázalo se, že je zároveň novým zoonotickým druhem kryptosporidií. Většina případů kryptosporidiózy u lidí je způsobena *C. parvum* nebo *C. hominis*, ovšem v USA a některých severských zemích Evropy byly zaznamenány případy, kdy počet infekcí *C. mortiferum* převyšuje počet infekcí způsobených *C. hominis* a stává se tak potenciálním zdrojem epidemií (Bujila et al., 2021).

1.6.2 Lokalizace

Infekce *C. mortiferum* byla detekována výhradně ve slepém střevě a přední části tlustého střeva (Tůmová et al., 2023).

1.6.3 Patogenita a infekce

Studie prokázaly, že experimentálně inokulovaná kuřata a morčata nejsou k infekci vnímavá, zatímco u laboratorních myší, fretek, pískomilů, euroasijských červených veverek a východních šedých veverek začalo vylučování oocyst mezi 4 a 11 dní po infekci. Klinické příznaky u myší, fretek, pískomilů a veverek šedých východních jsou mírné nebo probíhá infekce bez příznaků. U euroasijských veverek červených je infekce charakterizována průjmem, nechutenství, apatií a masivním vylučováním oocyst s fatálními následky.

Velikost oocyst získaných u přirozeně infikovaného člověka i u experimentálně inokulovaných zvířat byla prokázána $5,64 \times 5,37 \mu\text{m}$ (Tůmová et al., 2023).

1.7 *Cryptosporidium proliferans*

Od roku 2003, kdy byla tato kryptosporidie poprvé popsána, byla považována za izolát druhu *C. muris* s označením TS03, ale na základě morfologických, biologických a molekulárních odlišností byla v roce 2016 popsána jako samostatný druh (Kváč et al., 2016).

1.7.1 Hostitelé

Typovým hostitelem je hlodoun východoafrický, dalšími známými hostiteli jsou buvol africký, osel africký a divoký kůň. V experimentálních podmínkách se podařilo přenést infekci i na řadu dalších hostitelů – na myši, pískomily, krysy malé, veverky popelavé a hraboše stepní, u kterých ovšem infekce probíhala bez příznaků (Kváč et al., 2016).

1.7.2 Lokalizace

Cryptosporidium proliferans patří do žaludečních kryptosporidií, konkrétně má afinitu ke žlázám žaludku (Kváč et al., 2016).

1.7.3 Patogenita a infekce

Experimentální studie ukázaly, že průběh infekce *C. proliferans* u hlodavců se od *C. muris* a *C. andersoni* liší. Prepatentní doba *C. proliferans* je 18–21 dní. U experimentálně inokulovaných hlodavců nebyly pozorovány žádné klinické příznaky infekce zažívacího traktu, ale projevíly se histopatologické změny u krys malých. Žlázy žaludku byly výrazně zvětšené, vyplněné nekrotickým materiálem, hlenem a četnými vývojovými stádii kryptosporidií a epiteliální buňky infikovaných žláz vytvářely papilární struktury. Hmotnost žaludku byla u infikovaných zvířat šestkrát vyšší než u kontrolních zvířat bez infekce. Velikost získaných vysporulovaných oocyst je v průměru 7,7 × 5,3 μm (Kváč et al., 2016).

2 Cíl práce

Cílem práce bylo popsat pomocí *in vitro* a *in vivo* experimentů infektivitu sporozoitů kryptosporidií s různou tkáňovou specifitou, za použití tekutých fází zažívacího traktu (*C. mortiferum*, *C. proliferans*, *C. parvum*) a laparotomických operací (*C. mortiferum*). Dále bylo cílem ověřit vliv teploty prostředí v mimohostitelské fázi vývojového cyklu na excystaci sporozoitů a infektivitu oocyst (*C. proliferans*).

3 Metodiky a materiál

3.1 Materiál

3.1.1 Laboratorní zvířata

Jako laboratorní zvířata byly pro naše experimenty použity myši domácí (*Mus musculus*) kmen SCID a INF- γ KO a krysy malé (*Mastomys coucha*). Zvířata chována a získána ze zvěřince Parazitologického ústavu, Biologické centrum AV ČR v.v.i.

3.1.2 Oocysty kryptosporidií

K experimentům v této práci byly použity oocysty *Cryptosporidium mortiferum*, *Cryptosporidium parvum* a *Cryptosporidium proliferans*. Izoláty jednotlivých druhů kryptosporidií byly získávány z experimentálně infikovaných hostitelů. Druh *C. parvum* byl udržován ve SCID myších, *C. mortiferum* v INF- γ KO myších a *C. proliferans* v krysách malých.

3.2 Metody

3.2.1 Sběr a uchovávání trusu pozitivního na oocysty kryptosporidií

Zvířata pozitivní na jednotlivé druhy kryptosporidií byla každý den přemístěna na dobu 15 minut do sterilní prázdné chovné nádoby. Po vykálení zvířat byly vzorky trusu z chovné nádoby posbírány a odděleně skladovány v při teplotě 8 °C v dH₂O.

3.2.2 Purifikace kryptosporidií

Oocysty kryptosporidií byly ze vzorku trusu purifikovány pomocí sacharózového a cesium chloridového gradientu.

Roztoky:

Roztok sacharózy: flotační roztok sacharózy o specifické hmotnosti 1,33 a teplotě 8 °C (756 g sacharózy rozpuštěné v 483 ml deionizované vody)

PBS:

1 % PBS Tween: 0,5 ml Tween 20 přidáno do 1 ml PBS

Roztok CsCl: 21,75 g CsCl ve 103,25 ml deionizované vody

Pracovní postup:

1. Trus pozitivní na kryptosporidie řádně homogenizujeme se studenou vodovodní vodou pomocí třecí misky.
2. Přefiltrujeme suspenzi trusu přes sítko 250 μ m. Promýváme studenou vodou.
3. Filtrát přelijeme do zkumavek dle množství tekutiny.
4. Centrifugujeme 10 minut při teplotě 4 °C a 1 000 g.

-
5. Odsajeme supernatant.
 6. Pelet resuspendujeme ve studené vodě a roztoku sacharózy v poměru 1:1.
 7. Velmi dobře promícháme, na dně nesmí zůstat zbytky peletu.
 8. Centrifugujeme 10 minut při teplotě 4 °C a 1 000 g.
 9. Slejeme supernatant do nové zkumavky tak, aby nedošlo k porušení peletu.
 10. Naředíme supernatant studenou vodou v poměru 1:4.
 11. Centrifugujeme 10 minut při teplotě 4 °C a 1 000 g.
 12. Kroky 10–11 opakujeme 3×.
 13. Odsajeme supernatant a pelet naředíme ve 4 ml studeného PBS.
 14. Do 2 ml zkumavky napipetujeme 1 ml studeného CsCl.
 15. Na CsCl opatrně navrstvíme 500 µl resuspendovaných oocyst v PBS.
 16. Centrifugujeme 3 minuty při 4 °C a 13 400 g.
 17. Odpipetujeme vrstvu mezi CsCl a PBS obsahující oocysty.
 18. Tuto vrstvu přepipetujeme do čisté zkumavky obsahující 1 ml studeného PBS a zhomogenizujeme pipetou.
 19. Centrifugujeme 3 minuty při 4 °C a 13 400 g.
 20. Odsajeme ½ supernatantu a přidáme studený PBS, opět promícháme.
 21. Centrifugujeme 3 minuty při 4 °C a 13 400 g.
 22. Odsajeme supernatant a resuspendujeme oocysty v 1 ml studeného PBS.
 23. Výtěžek oocyst spočítáme v Bürkerově komůrce.
 24. Oocysty skladujeme při 4 °C.

3.2.3 Počítání oocyst v Bürkerově komůrce

Počítáním oocyst zjišťujeme výtěžek po purifikaci, excystaci či jiných úkonech. Díky zjištění výtěžku můžeme vypočítat množství oocyst ve vzorku a infekční dávku.

Materiál: purifikovaná suspenze oocyst, Bürkerova komůrka, roztok PBS, pipety a špičky

Pracovní postup:

1. Dle velikosti peletu na dně zkumavky můžeme odhadnout počet oocyst ve vzorku.
2. Pokud je pelet příliš velký, je nutné jej před počítáním naředit roztokem PBS. Ředění pak započítáme do výsledku.
3. Vzorek zvortexujeme.

-
4. Pipetou nabere 10 µl vzorku a nanese ho na Bürkerovu komůrku pod podložní sklíčko tak, aby se rozprostřel po celé ploše.
 5. Pozorujeme mikroskopem při 400násobném zvětšení.
 6. Spočítáme výtěžek oocyst z 25 čtverců, vynásobíme koeficientem 10000 a započítáme případné ředění. Výsledná koncentrace udává počet oocyst na 1 ml.

3.2.4 Kontrola infekce – specifické barvení oocyst

Vzorky trusu infikovaných zvířat byly pravidelně kontrolovány na přítomnost oocyst kryptosporidií pomocí specifických barvení, čímž byla ověřována úspěšnost infekce. Každé zvíře bylo individuálně kontrolováno od třetího dne po infekci (DPI).

Metoda Ziehl-Neelsena v modifikaci dle Henriksena a Pohlenze (1981)

Roztoky:

1. Roztok karbolfuchsinu: 2,5 ml rozpuštěné fenolové krystaly, 5 ml 100 % ethanol, 0,5 g práškový bazický fuchsin, 50 ml destilovaná voda, před použitím přefiltrovat
2. 1 % kyselý alkohol: 1 ml koncentrovaná kyselina solná (HCl), 100 ml 70 % alkohol
3. 0,8 % fast green (světlá zeleň): 0,8 g light green-světlá zeleň, 100 ml deionizovaná voda

Pracovní postup:

1. Nátěry vzorků na podložním sklíčku fixujeme methanolem v plameni.
2. Barvíme v roztoku karbolfuchsinu po dobu 30 minut.
3. Opláchneme pod tekoucí vodou.
4. Nabarvené vzorky odbarvíme v 1 % kyselém alkoholu po dobu 1 minuty.
5. Opláchneme pod tekoucí vodou.
6. Nátěry dobarvíme světlou zelení po dobu 1 minuty.
7. Opláchneme pod tekoucí vodou.
1. Necháme doschnout při laboratorní teplotě a prohlédneme mikroskopem při 1000násobném zvětšení za použití imerzního oleje.

3.2.5 Izolace DNA

Izolace DNA z tkáně provádíme pro ověření identity izolátu a infekce v příslušném orgánu.

Materiál: 10 mg tkáně, DNeasy Blood and Tissue Kit

Pracovní postup:

1. Do mikrozkušavky nastříháme asi 10 mg tkáně, přidáme asi 50 µl 0,5 mm velkých skleněných kuliček a 1–3 skleněné kuličky o velikosti 3 mm.
2. Připipetujeme 200 µl ATL Buffer a vzorek zvortexujeme.
3. Pomocí mini-beadbeateru po dobu 1 minuty a rychlosti 5500 otáček za minutu tkáň ve vzorku zhomogenizujeme.
4. Centrifugujeme přibližně 10 s.
5. Připipetujeme 20 µl Proteinase K.
6. Vzorky inkubujeme 1 hodinu při 56 °C, během inkubace pravidelně protřepáváme.
7. Centrifugujeme přibližně 10 s.
8. Připipetujeme 200 µl AL Buffer a vzorek zvortexujeme.
9. Připipetujeme 200 µl 96 °C EtOH a vzorek zvortexujeme.
10. Centrifugujeme 45 s při 13 400 g.
11. Veškerý supernatant přepipetujeme na Mini spin column a centrifugujeme 3 minuty při 13 400 g. Odpad ze sběrné zkumavky odstraníme.
12. Připipetujeme 500 µl AW1 Buffer a vzorek centrifugujeme 1 minutu při 13 400 g. Odpad ze sběrné zkumavky odstraníme.
13. Připipetujeme 500 µl AW2 Buffer a vzorek centrifugujeme 1 minutu při 13 400 g. Odpad ze sběrné zkumavky odstraníme.
14. Centrifugujeme 1 min při 13 400 g.
15. Sběrné zkumavky vyhodíme, nahradíme je novými a přímo na membránu kolony napipetujeme 200 µl AE Buffer. Necháme inkubovat 1 min při laboratorní teplotě.
16. Centrifugujeme 1 min při 13 400 g.
17. Získanou genomovou DNA (gDNA) skladujeme v mrazničce při -20 °C.

3.2.6 PCR

Pro ověření identity použitého izolátu byla použita metoda amplifikace genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU) pomocí nested PCR (Xiao et al. 1999). PCR reakce byla provedena v celkovém objemu 20 μ l.

Složení mastermixu:

K 10 μ l komerčně dodávaného HS-Taq premix (GenAll, Korea), který obsahuje 2U HSTaqDNA polymerázy, 200 μ M dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, loading dye a stabilizátor, přidáno 7 μ l PCR vody, 0,5 μ l forward primeru (200 mM), 0,5 μ l reverse primeru (200 mM) a 2 μ l gDNA (primární reakce) nebo 2 μ l produktu primární reakce (sekundární reakce).

Amplifikační program:

1. Primární denaturace po dobu 3 minut při 95 °C.
2. Dále 35 opakujících se cyklů
 - a. Denaturace po dobu 45 sekund při 95 °C.
 - b. Nasedání primerů po dobu 45 sekund při teplotě 55 °C.
 - c. Extenze řetězců po dobu 1 minuty při 72 °C.
3. Na závěr byla provedena konečná extenze řetězců po dobu 10 minut při 72 °C.

3.2.7 Gelová elektroforéza

Chemikálie: Ethidium-bromid, agaróza (10 mg/ml), TAE pufř, DNA Ladder (100 bp)

Pracovní postup:

1. V baňce smícháme naváženou agarózu s TAE pufřem (podle velikosti nosiče) a zahříváme v mikrovlnné troubě, dokud nevznikne homogenní směs.
2. Po zahřátí baňku schladíme pod tekoucí vodou.
3. Přidáme ethidium-bromid (1 μ l).
4. Směs vlijeme do připraveného nosiče s vhodným hřebenem a necháme ztuhnout (cca 15 minut).
5. Po ztuhnutí gel vložíme do elektroforetické vany s TAE pufřem.
6. Do prvního slotu nanese ladder (10 μ l), do ostatních nanese produkt PCR (20 μ l).
7. Elektroforézu spustíme na 20–30 minut, aby došlo k oddělení jednotlivých DNA fragmentů.
8. Po skončení gel vyjmeme a separaci DNA fragmentů detekujeme UV transiluminátorem.

3.2.8 Izolace z gelu a sekvenování

Amplifikované úseky SSU byly z gelu vyříznuty skalpelem a izolovány pomocí komerčního kitu GenElute Gel extraction Kit (Sigma) dle návodu výrobce. PCR produkty z PCR reakce byly sekvenovány za použití sekundárních primerů a ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kitu. Vzorky byly sekvenovány z obou konců. Nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí programu ChromasPro a Bio Edit a byly porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank.

Pracovní postup izolace z gelu:

1. Skalpelem vyřízneme jednotlivé fragmenty DNA z gelu a dáme do připravené zkumavky.
2. Do zkumavky připipetujeme 500 μ l Gel Solubilization Solution (300 μ l/100 mg gelu).
3. Inkubujeme 10 min při 50 °C, kontrolujeme rozpouštění a každé 2 až 3 minuty promícháme.
4. Dáme inkubovat PCR vodu na eluci na 65 °C.
5. Sestavíme Binding Column G, napipetujeme 500 μ l Column Preparation Solution a centrifugujeme 1 min při 13 400 g.
6. Připipetujeme 150 μ l isopropanolu a promícháme.
7. Přepipetujeme veškerý objem vzorku na kolonu Binding Column G a centrifugujeme 1 minutu při 13 400 g.
8. Odpad ze sběrné zkumavky vylejeme a opět ji použijeme s kolonou.
9. Přepipetujeme 700 μ l Wash Solution G a centrifugujeme 1 min při 13 400 g.
10. Odpad ze sběrné zkumavky vylejeme a opět ji použijeme s kolonou.
11. Centrifugujeme 1 min při 13 400 g bez přidání roztoků.
12. Zkumavku v centrifuze otočíme o 180 ° a centrifugujeme 3 min při 13 400 g.
13. Kolonu dáme do nové zkumavky o objemu 1,5 ml a provedeme eluci napipetováním 30 μ l PCR vody (65 °C) přímo na střed kolony.
Inkubujeme 1 minutu a poté centrifugujeme 1 min při 13 400 g.

3.2.9 Pitva zvířat

Všechny experimenty byly ukončeny humánním usmrcením zvířat cervikální dislokací. Z kadáverů byly odebrány tkáně žaludku, duodena, jejunu, ilea, céka a kolonu. Na každý orgán byla použita jedna sada sterilních pitevních nástrojů. Každá tkáň byla

intenzivně opláchnuta sterilním PBS a vložena do sterilních zkumavek pro izolaci DNA (viz 3.2.5).

Pracovní postup:

1. Usmrtíme zvířata humánní cervikální dislokací.
2. Sterilními chirurgickými nástroji provedeme pitvu a vyjmeme orgány trávicí soustavy.
3. Na každý jednotlivý orgán použijeme jinou sadu sterilních nástrojů a orgány postupně omyjeme sterilním PBS.
4. Sliznice orgánů rozstříhneme, a i s obsahem je vložíme na 40 μm sítko tak, aby se sliznice a obsah dotýkaly sítko.
5. Centrifugujeme při 4 °C, při 1000 g po dobu 10 minut.
6. Odsajeme supernatant do eppendorfky o obsahu 1,5 ml.
7. Centrifugujeme maximálně 3 minuty.
8. Odsajeme supernatant a tento filtrát použijeme pro excystaci s pouze přečištěnými oocystami.

3.2.10 Excystace *in vitro*

Materiál:

1. Oocysty přečištěné na CsCl a uchovávané ve 8 °C
2. PBS sterilní, pH 7,4
3. 1 % Chlornan sodný (NaClO); vychlazený na 8 °C: 13 ml dH₂O + 1 ml 14 % NaClO
4. 0,75 % sodium taurocholate v 1 % BOFES RPMI (skladováno v lednici, před použitím potřebné množství předeřhřát na 37 °C)
5. 1 % BOFES RPMI (předeřhřát těsně před použitím, jinak skladovat v lednici): 100 μl BOFES do 10 ml RPMI

Pracovní postup pro excystaci střevních kryptosporidií:

1. Oocysty o odpovídající koncentraci inkubujeme v eppendorfkách ve vodní lázni o teplotě 37 °C v dH₂O po dobu 45 minut.
2. Po inkubaci oocysty centrifugujeme (10 min při 8 000 g) a vystavíme účinku koncentrovaného 1 % NaClO o teplotě 8 °C.
3. Inkubujeme na ledu po dobu 5 minut.

-
4. 1 % NaClO vymyjeme 3× nadbytkem dH₂O.
 5. Přidáme 400 µl 1 % BOFES nebo PBS (vychlazené na 8 °C).
 6. Centrifugujeme 2 minuty při 1 000 g.
 7. Odsajeme supernatant.
 8. Přidáme 400 µl 0,75 % sodium taurocholate (předehřátého na 37 °C).
 9. Inkubujeme 45 minut při teplotě 37 °C, po 15 minutách můžeme zkontrolovat, jestli probíhá proces excystace.
 10. Centrifugujeme 2 minuty při 1 000 g.
 11. Odsajeme supernatant.
 12. Výtěžek sporozoitů zkontrolujeme a spočítáme v Bürkerově komůrce.

Pracovní postup pro excystaci žaludečních kryptosporidií:

1. Oocysty o odpovídající koncentraci inkubujeme v eppendorfkách ve vodní lázni o teplotě 37 °C v dH₂O po dobu 30 minut.
2. Centrifugujeme 2 minuty při 1 000 g.
3. Odsajeme supernatant.
4. Výtěžek sporozoitů zkontrolujeme a spočítáme v Bürkerově komůrce.

3.2.11 Průtoková cytometrie

Pro stanovení a kontrolu míry excystace v jednotlivých experimentech byl použit průtokový cytometr BD FACSCanto™ II v laboratoři Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

Materiál:

1. 450 µl přečištěných oocyst (o koncentraci 500 000 oocyst/450 µl v PBS)
2. 50 µl referenčních fluorescenčních kuliček Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA
3. Zkumavky, termonádoba s ledem

Pracovní postup:

1. Do zkumavek si napipetujeme oocysty.
2. Oocysty excystujeme dle metodiky 3.2.10 a přidáme referenční fluorescenční kuličky.
3. Vzorky zvortexujeme a provedeme měření průtokovým cytometrem.
4. Výsledné hodnoty zapisujeme do předem připravené tabulky, kde je zapsán počet kuliček (10 000) a zapisujeme počet oocyst (na daný počet kuliček).
5. Měření opakujeme 5×, každou hodnotu zapíšeme a následně zprůměrujeme.

3.2.12 Laparotomická infekce

Pomůcky a medikamenty:

1. Pomůcky: holicí strojek, žiletka, sterilní podložka, chirurgické nástroje – skalpel, pinzety chirurgické, pinzety pean, nůžky, sterilní gáza, inzulinové injekční stříkačky s jehlou, chirurgické rukavice a rouška, chirurgická nit s jehlou (Vicryl 75 cm, č. 12), infralampa, sterilní gumičky, inhalační sedační přístroj
2. Medikamenty: dezinfekce Betadine (naředěná v H₂O, povidonum iodinum), dezinfekce Cutasept, fyziologický roztok s antibiotiky (10 ml fyziologického roztoku + 1 ml ATB Metronidazol), antibiotikum Baytril (30 µl na 70 g váhy zvířete, aplikace intramuskulárně), analgetikum Loxikoid (3 µl na 70 g váhy zvířete, aplikace subkutánně), sedativum Isofluran, oční mast Ophthalmum septonex

Pracovní postup:

1. Uspíme zvíře dávkou 3 % Isofluran a O₂ a zafixujeme na vyhřívané operační podložce.
2. Na oči nanese oční mast Ophthalmum septonex.
3. Holicím strojkem vyholíme oblast břicha a vyholenou část oťreme roztokem Betadine pomocí sterilní gázy.
4. Operační pole doholíme žiletkou, 2× oťreme roztokem Betadine, nastříkáme dezinfekci Cutasept a necháme chvíli působit. Operační pole setřeme gázou.
5. Provedeme řez do kůže v oblasti *linea alba* o délce asi 1,5 cm.
6. Odhalíme bílou čáru (*linea alba*) a provedeme řez skalpelem o délce cca 1 cm.
7. Pomocí pinzety vyjmeme požadovanou část zažívacího traktu a aplikujeme inzulinovou stříkačkou infekční dávku (50 µl). Průběžně dutinu břišní oplachujeme fyziologickým roztokem s ATB.
8. Do dutiny břišní aplikujeme fyziologický roztok s ATB pro výplach.
9. Vratíme orgány do dutiny břišní.
10. Vnitřní vrstvu sliznice šijeme jednotlivými uzly bez mezer.
11. Vnitřní vrstvu kůže zašijeme pokračovacím stehem nebo jednotlivými stehy od shora směrem dolů s uzlem na konci. Šijeme 3 stehy na 1 cm ránu.
12. Vnější vrstvu kůže šijeme jednotlivými uzly.

-
13. Celé operační pole vydezinfikujeme.
 14. Aplikujeme Loxikoid s.k. a Baytril i.m. a ukončíme inhalační anestezii.
 15. Zvíře přesuneme do samostatného boxu s infralampou. Pozorujeme zotavení.
 16. Zvířata kontrolujeme každých 20 minut po dobu 3 hodin a následně minimálně 3× denně.

3.3 Test životaschopnosti oocyst

Vitalita oocyst všech druhů kryptosporidií byla před každým experimentem testována za pomoci barvení PI nebo průtokové cytometrie. Pro experimenty byly použity pouze oocysty s životaschopností více než 95 %.

3.4 Design experimentů

3.4.1 Infektivita a excystace oocyst *C. proliferans* uchovávaných v teplotě 37 °C

Za účelem zjištění, zda má teplota při manipulaci s orgány trávicí soustavy vliv na následnou excystaci a infekci hostitele, byla provedena pitva pod vodou o teplotě 37°C. Teplota vody byla udržována pomocí vodní lázně. Jako pokusné zvíře k pitvě byla zvolena krysa malá.

Materiál: 2× vodní lázeň (37 °C), chirurgické nástroje, zkumavky, krysy malé infikované *C. proliferans* a krysy malé bez infekce.

Pracovní postup:

1. Připravíme si dvě vodní lázně zahřáté na 37 °C a sterilní chirurgické nástroje na pitvu.
2. Usmrtíme krysou malou s infekcí *C. proliferans* a ihned po usmrcení ji vložíme do vodní lázně 37 °C.
3. Pitvu provedeme tak, aby orgány zůstaly pod vodou v požadované teplotě.
4. Pod vodou vyjmeme orgány trávicí soustavy, nejdříve žaludek, pak tenké střevo, tlusté střevo a slepé střevo. Jednotlivé části zažívacího traktu svorkujeme tak, aby nedošlo ke kontaminaci vodní lázně a ostatních orgánů obsahem žaludku nebo střev.
5. Jednotlivé části zažívacího traktu (žaludek, duodenum, ileum, jejunum a cékum) přemístíme do zkumavek s H₂O vyhřátou na 37 °C.
6. Zkumavky ihned vložíme do druhé vodní lázně s teplotou 37 °C.
7. Rozstříhneme jednotlivé orgány a smícháme H₂O v obsahem orgánů.

Infektivita

8. Ve vytvořeném homogenátu spočítáme oocysty v Bürkerově komůrce.
9. Vypočteme infekční dávky. Zvířata infikujeme dávkou 500 000 oocyst.
10. Teplým roztokem s oocystami z každého orgánu inokulujeme vždy 3 krysy malé pomocí jícní sondy.

Poznámka: je třeba pracovat tak, aby nedošlo ke chlazení oocyst. Na každé zvíře a každý orgán použijeme jednu sadu sterilních nůžek, pinzet a jícní sondu.

Jako kontrola byly použity purifikované oocysty *C. proliferans* (3.2.2), kterými byly inokulovány tři krysy malé (500 000 oocyst/zvíře).

Excystace

8. Ve vytvořeném homogenátu spočítáme excystované oocysty v Bürkerově komůrce.
9. Znovu pozorujeme a počítáme excystované oocysty po 1 h při 37 °C.
10. Výtěžek spočítáme i u kontrolních vzorků, tedy u vzorků s H₂O o teplotě 8 °C a 37 °C a pozorujeme rozdíly v míře excystace mezi kontrolními skupinami i mezi počítáním oocyst v čase.

3.4.2 Excystace *in vitro* s obsahem tekuté fáze zažívacího traktu

V tomto experimentu byly použity myši prosté kryptosporidiové infekce, byla provedena pitva s vyjmutím žaludků, tenkého střeva a slepého střeva. Pro experiment byly použity oocysty *C. parvum* a *C. mortiferum* získané a purifikované dle dříve uvedených postupů (3.2.1 a 3.2.2). Izoláty tekutých fází byly získány dle postupu 3.2.9.

Pracovní postup:

1. Resuspendujeme oocysty v tekutých fázích trávicího traktu z různých částí zažívacího traktu (žaludek, 1. část tenkého střeva, 2. část tenkého střeva a slepé střevo), uchovávané při 8 °C.
2. Vzorky zahříváme na teplotu 37 °C a každých 15 minut kontrujeme množství excystovaných oocyst.

3.4.3 Laparotomické infekce

Cílem experimentu bylo laparotomickou operací aplikovat infekční dávku s purifikovanými oocystami *C. mortiferum* (1 mil. oocyst v 50 µl) do jednotlivých částí trávicího traktu – cékum, jejunum, duodenum a tlusté střevo a následně detekovat infekci (tři

SCID myši na každou skupinu). Třem kontrolním zvířatům byla infekční dávka podána per orálně (1 mil. oocyst na 200 μ l).

Pracovní postup:

1. Přivedeme pokusné zvíře do anestezie a zahájíme laparotomickou operaci (viz metodika 3.2.12).
2. Vpíchneme infekční dávku s oocystami *C. mortiferum* postupně do jednotlivých částí trávicí soustavy (1 myš =1 orgán).
3. Ránu zašijeme a ošetříme, zvíře vložíme do samostatného boxu pod infralampu a pozorujeme zotavení – do 15 minut by mělo být při vědomí a pohyblivé. Pravidelně kontrolujeme zdravotní stav.
4. Odebíráním vzorků trusu zjišťujeme přítomnost infekce.

3.5 Statistická analýza

Rozdíly mezi testovanými skupinami byly vyhodnoceny pomocí Studentova T testu. Datové sady byly zpracovány v Microsoft Excel.

4 Výsledky

4.1 Identita izolátů

Molekulární analýzy SSU izolátů používaných pro inokulaci a excystaci prokázaly, že na počátku experimentů bylo pracováno se třemi druhy kryptosporidií, konkrétně *C. parvum*, *C. proliferans* a *C. mortiferum*. Sekvence izolátů získaných v rámci níže popsaných experimentů byly vždy 100% identické s izolátem, který byl pro daný experiment použit. V průběhu experimentů nedošlo tedy k záměně ani kontaminaci používaných izolátů.

4.2 Infektivita oocyst *C. proliferans* uchovávaných v teplotě 37 °C a získaných z různých částí zažívacího traktu

Výsledky experimentu ukázaly, že oocysty *C. proliferans* získané z tenkého střeva infikovaného zvířete a udržované při teplotě těla hostitele jsou infekční pro naivního hostitele, aniž by opustily zažívací trakt. Nebyl zjištěn žádný rozdíl v průběhu infekce hostitelů, kteří byli infikováni oocystami purifikovanými z trusu a uchovávanými v teplotě 8 °C a těmi infikovanými oocystami uchovávaných při teplotě těla hostitele (Tabulka 2).

Tabulka 2: Hodnocení výskytu oocyst u krys malých a SCID myši inokulovaných oocystami *Cryptosporidium proliferans* uchovávaných při teplotě 37 °C nebo 8 °C. 0 – nepřítomnost oocyst (zvýrazněno červeně), 1 – přítomnost oocyst (zvýrazněno zeleně).

DPI	Krysa malá			SCID			Krysa malá			SCID		
	37 °C						4–8 °C					
	zvířata											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1.-13.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
15.	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
16.	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
17.	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
18.	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
19.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

4.3 Excystace oocyst *C. proliferans* uchovávaných v teplotě 37 °C

Hodinová expozice purifikovaných oocyst *C. proliferans* při 37 °C vyvolala excystaci 91 % oocyst, zatímco u oocysty *C. proliferans* získaných z duodena infikovaného zvířete a udržovaných při 37 °C excystovalo pouze 37 % oocyst (Tabulka 3). Rozdíly mezi skupinami jsou statisticky významné ($p < 0,001$). Výsledky experimentu také ukázaly, že k excystaci většiny oocyst dochází již v prvních minutách expozice a prodlužování doby excystace nemá významný vliv ($p > 0,05$).

Tabulka 3: Procento excystovaných oocyst *Cryptosporidium proliferans* uchovávaných v teplotě 8 °C a 37 °C a excystovaných při 37 °C

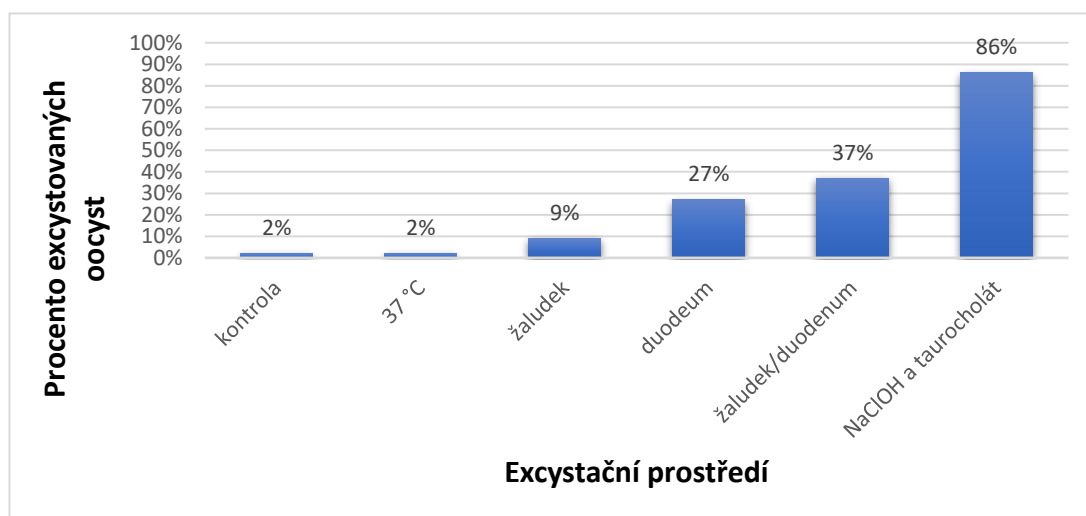
Excystace Čas (min)/teplota (°C)	Teplota skladování před excystací	
	8 °C	37 °C
5 / 37	86 %	35 %
30 / 37	90 %	35 %
60 / 37	91 %	37 %

4.4 Excystace oocyst *C. parvum* a *C. mortiferum* vystavených tekuté fázi obsahu zažívacího traktu

Cryptosporidium parvum

V případě, že byly oocysty vystaveny účinku pouze teploty 37 °C nebyla pozorována excystace v porovnání s kontrolní skupinou bez vystavení účinku tepla nebo excystačních roztoků ($p = 0,2789$). V případě, že byly oocysty *C. parvum* vystaveny tekutému obsahu žaludku, došlo k excystaci 9 % oocyst, nicméně rozdíly v porovnání s kontrolou nebyly statisticky významné ($p = 0,6$). U oocyst vystavených účinkům obsahu duodena byla pozorována excystace ve výši 27 %. Tento rozdíl by v porovnání s negativní kontrolou statisticky významný ($p = 0,0007$). Nejvyšší podíl excystovaných oocyst byl pozorován při použití *in vivo* protokolu s využitím chemických látek (3.2.10), kdy excystovalo 86 % všech oocyst ($p > 0,0001$). Při kombinaci excystace za použití tekutého obsahu žaludku a střev byla dosažena excystace ve výši 36 % (Graf 1).

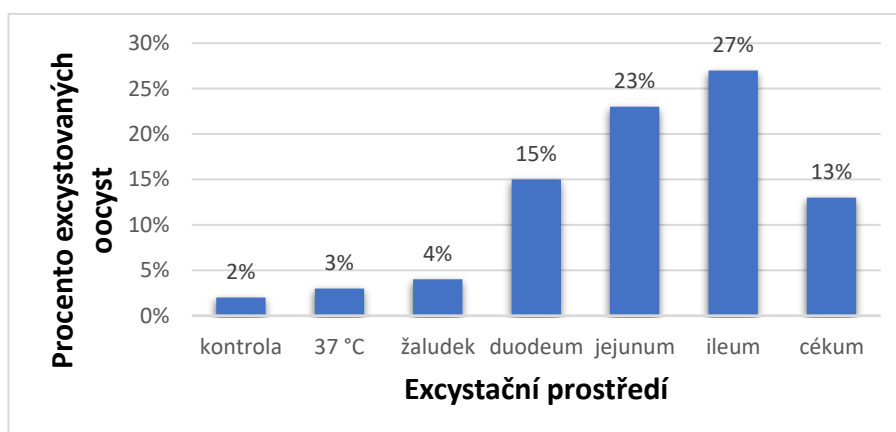
Graf 1: Procento excystovaných oocyst *Cryptosporidium parvum* při různém excystačním prostředí



Cryptosporidium mortiferum

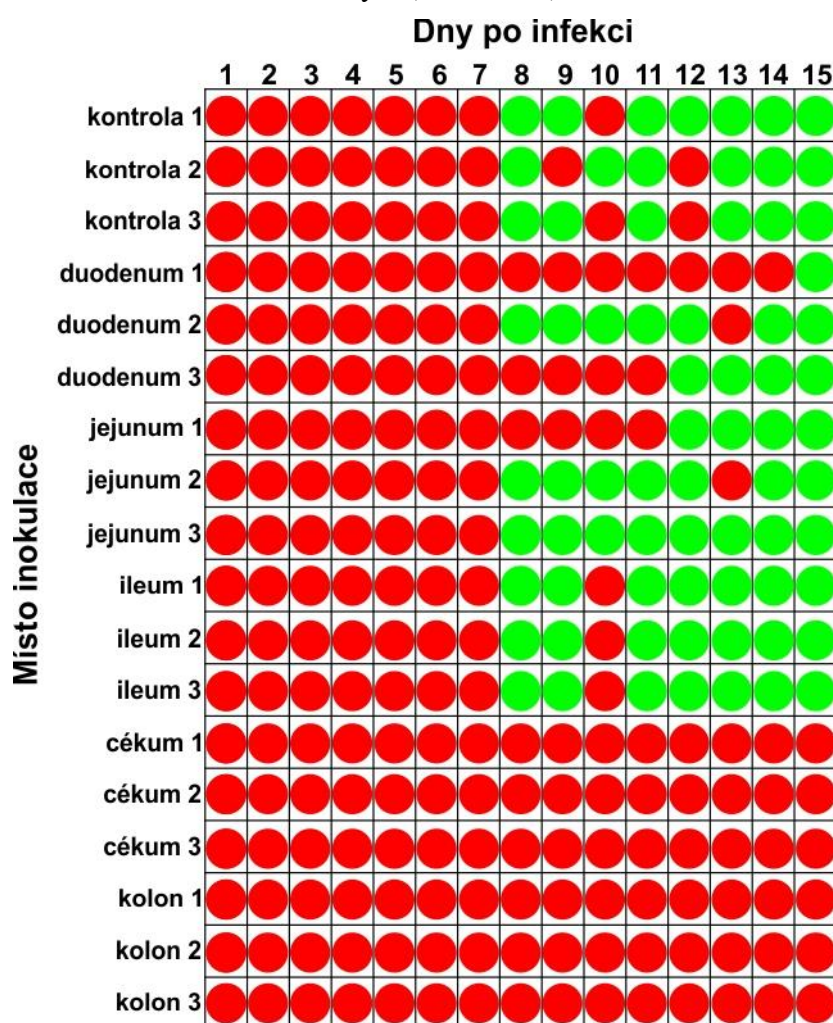
Oocysty *C. mortiferum* se nepodařilo vyexcystovat z žádnou dosud publikovaných laboratorních metod. U oocyst excystovaných v roztocích o teplotě 37 °C (metoda používaná pro žaludeční druhy, > 5%, $p > 0,05$) ani při excystaci používané na střevní druhy (kombinace změny pH a taurocholát, > 5%, $p > 0,05$) nedošlo ke excystaci žádných oocyst. V případě, že byly oocysty *C. mortiferum* vystavené účinkům tekutého obsahu žaludku byla pozorována excystace ve výši 15 % ($p = 0,008$). Při testování tekutého obsahu duodena došlo k excystaci 23 % oocyst ($p = 0,0188$). největší podíl excystovaných oocyst byl pozorován v případě expozice oocyst v tekutém obsahu ilea, a to 27 % ($p = 0,0188$). V případě vystavení účinku obsahu céka, tedy místa, kde *C. motiferum* parazituje byla detekována nejnižší úroveň excystace – 13 % ($p = 0,0305$), viz. Graf 2.

Graf 2: Procento excystovaných oocyst *Cryptosporidium mortiferum* v různém excystačním prostředí



4.5 Laparotomické operace

Na základě výsledků uvedených v kapitole 4.4. byl proveden *in vivo* pokus s oocystami *C. mortiferum*. Všechny kontrolní INF γ -KO myši inokulované per orálně začaly vylučovat oocysty *C. mortiferum* od 5. DPI. SCID myši inokulované do duodena, jejuna a ilea začaly vylučovat oocysty *C. mortiferum* od 9. do 12. DPI. PCR analýzy tkání zažívacího traktu ukázaly, že u všech myší výše uvedených byl vývojový cyklus detekován v céku a proximálním kolonu. U myší inokulovaných do céka nebylo pozorováno vylučování oocyst ani specifické DNA *C. mortiferum* v trusu po dobu 15 DPI. Taktéž molekulární analýzy neprokázaly přítomnost vývojového cyklu, respektive DNA v žádné části zažívacího traktu těchto myší (Obrázek 2).



Obrázek 2: Přítomnost oocyst *Cryptosporidium mortiferum* v trusu myší laparotomicky inokulovaných do různých částí zažívacího traktu. Zelená barva značí přítomnost oocyst, červená barva značí nepřítomnost oocyst v trusu.

5 Diskuse

Parazitičtí prvoci rodu *Cryptosporidium* způsobují onemocnění gastrointestinálního traktu podobné chřipce u imunokompetentních jedinců a závažný, přetrvávající, život ohrožující průjem u imunodeficientních jedinců. Pro léčbu kryptosporidiózy u imunodeficientního hostitele není k dispozici účinná terapie (Current et Haynes, 1984). S ohledem na unikátní lokalizaci infekčních stadií kryptosporidií na hostitelské buňce se zdají být cílem terapeutických preparátů pohyblivá infekční stadia – sporozoiti a merozoiti. Do současné doby byl proces excystace a infekivity sporozoitů studován jen málo a u omezeného počtu druhů kryptosporidií (Fayer et al., 2009; Bones et al., 2019; Fayer et Xiao, 2007). Pochopení procesu excystace a podmínek, které tento proces spouští, by mohlo napomoci v porozumění infekčního procesu a usnadnit hledání účinné terapie.

Předchozí studie ukázaly, že proces excystace je velmi rychlý. V naší práci jsme při použití *in vitro* metod excystovali více než 80 % oocyst *C. parvum* a *C. proliferans* během 30, respektive 5 minut po vystavení vhodným podmínkám. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími pracemi (Fayer et al., 2009; Kváč et al., 2016), nicméně výsledky práce poukázaly na skutečnost, že existuje variabilita v excystaci různých druhů kryptosporidií s odlišnou lokalizací v těle hostitele. Podmínky, které vyvolávají excystaci u oocyst *C. parvum* byly podrobně zkoumány (Fayer et Leek 1984; Campbell et al., 1992; Woodmansee 1987) a bylo prokázáno, že pro excystaci a aktivaci sporozoitů je zapotřebí mnohem více stimulů, než je pH trávicího traktu hostitele (Fayer et Leek 1984). Když dojde k předčasnému uvolnění infekčních sporozoitů střevních druhů kryptosporidií, zejména v žaludku hostitele, dle předchozích studií to způsobuje jejich inaktivaci (Widmer et al. 2007). Na základě toho jsou hledány metody a postupy, jak infikovat hostitele pouze sporozoity kryptosporidií (Vinayak et al., 2015).

Jako první jsme testovali podmínky excystace druhu *C. mortiferum*, který infikuje cékum a proximální část kolonu (Tůmová et al., 2023). Výsledky naší práce ukázaly, že standardně používaná *in vitro* metoda kultivace pro střevní kryptosporidie je neúčinná a oocysty *C. mortiferum* neexcystují po vystavení účinkům nízkého pH v žaludku a následné změně pH odpovídající pH tenkého střeva a přítomnosti žlučových solí tak, jak tomu je v případě *C. parvum* (Fayer et al., 2009). Výsledky naší a ostatních prací ukazují, že oocysty kryptosporidií excystují v místě budoucí infekce. S ohledem i na rychlý proces excystace je pro parazity nevýhodné excystovat příliš brzy. Došlo

by k vyčerpání energetických a proteinových zásob, což by mělo za následek smrt parazita (Yeoh et al., 2019). Výsledky této práce ukázaly, že největšího počtu excystovaných oocyst *C. mortiferum* bylo dosaženo po inkubaci v prostředí odpovídajícímu distální části tenkého střeva. Naopak nejméně vyexcystovaných oocyst bylo v případě vystavení účinků žaludečního obsahu, proximální části tenkého střeva a céka. Pokud jsou hypotézy o rychlosti a vlivu okolního prostředí na excystaci oocysty kryptosporidií správné, lze z našich výsledků usuzovat, že k aktivaci excystace *C. mortiferum* došlo krátce před vstupem oocysty do místa, kde je lokalizován vývojový cyklus (cékum). Vystavení účinkům obsahu céka se zdá být nedostatečné pro úspěšnou excystaci. Tyto výsledky odpovídají i předchozím zjištěním u druhu *C. parvum* a principu používaných metod excystace. Také my jsme v naší práci pravdivost této hypotézy potvrdili. Oocysty *C. parvum* vystavené účinkům pouze žaludečního obsahu nebo pouze obsahu duodena excystovaly statisticky významně méně než oocysty vystavené kombinaci účinku obou prostředí. Bylo prokázáno, že oocysty *C. parvum* excystují rychleji po vystavení kyselině chlorovodíkové a že tato expozice může představovat důležitý faktor pro excystaci *C. parvum* (Campbell et al. 1992; Choudry et al., 2008). Studie Choudry et al. (2008) také zkoumali i další vlivy na excystaci sporozoitů. Např. žlučové soli podporují rychlost excystace a deoxycholát sodný invazivitu sporozoitů vůči epiteliálním buňkám. Během excystace byla zjištěna zvýšená produkce proteázy, která sice nemá vliv na rychlost excystace, ale na motilitu (pohyblivost) sporozoitů.

Havrdová (2016) pomocí laparotomických infekcí prokázala, že nejvhodněji místem pro inokulaci chirurgickou cestou je proximální jejunum. Lze tedy předpokládat, že prostředí duodena a proximálního jejunum se podílí na stimulaci oocyst *C. parvum* zásadním podílem. To by odpovídalo i histologickým nálezům z přirozených infekcí laboratorních myší tímto druhem kryptosporidie, kdy nejvyšší intenzita infekce je detekována ve střední a distální části jejunum a ileu (Kváč, osobní sdělení). Laparotomická infekce do dalších částí střeva, kde vývojový cyklus neprobíhá, nevyvolává vznik infekce. Obdobě tomu je i u druhu *C. proliferans*. Laparotomická infekce do střeva nevyvolá infekci hostitele (Havrdová, 2016).

V případě druhu *C. mortiferum* jsme pomocí laparotomických inokulací dospěli ke stejným výsledkům, které jsou v souladu jak s dříve publikovanými daty, tak s dalšími výsledky zjištěnými v této práci. Laparotomická inokulace oocyst *C. mortiferum* do céka a kolonu nevyvolala u žádné z operovaných myší infekci tímto druhem, což odpovídá zjištění, že obsahy těchto částí střeva měly na excystaci jen malý vliv.

Naopak inokulace do proximálních částí střeva vždy vedla k infekci hostitele. Tyto zjištění jsou v souladu s předešlými studiemi (Havrdová 2016; Sateriale et al., 2021; Vinayak et al., 2015)

Cryptosporidium proliferans infikuje výhradně žláznatou část žaludku svých hostitelů (Kváč et al., 2016). V souladu s předchozími studiemi jsme prokázali, že tento druh excystuje primárně účinkem zvýšené teploty odpovídající teplotě těla hostitele (Fayer et al., 2009; Widmer et al., 2007; Bones et al., 2019).). Na rozdíl od experimentů prováděných Widmerem, který excystoval oocysty *C. andersoni* kombinací tepla a účinkům nízkého pH, uvádějí jiní autoři, že pro úspěšnou excystaci žaludečních kryptosporidií je zapotřebí teplota a vyšší pH (Dudáková, 2022; Schulzová, 2022). Navíc účinky nízkého pH a dezinfekční účinek chlornanu negativně ovlivňuje vitalitu sporozoitů (Kváč, ústní sdělení).

Pokud představuje teplota kritický faktor excystace žaludečních druhů kryptosporidií, zůstává otázkou, proč neexcystují oocysty průchodem zažívací traktu hostitele po vyloučení ze žaludku do duodena. Námi provedený experiment prokázal, že oocysty vyjmuté z těla hostitele a uchovávané při teplotě těla excystují výrazně méně než oocysty zchlazené na 8 °C a následně zahřáté na 37 °C, tedy teplotu těla hostitele. Výsledky této práce ukazují, že oocysty žaludečních kryptosporidií jsou vybaveny nějakým ochranným faktorem, který omezuje jejich excystaci v těle hostitele. Vyexcystované oocysty udržované mimo tělo hostitele při konstantní tělesné teplotě mohly být oocysty tenkostěnné, jejichž přítomnost u druhu *C. proliferans* potvrdila Melicherová et al. (2014). Použití destilované vody, která má téměř neutrální pH, jako nosného media, mohlo zapříčinit excystaci těchto oocyst. Současně jsme prokázali, že oocysty *C. proliferans* získané z duodena a udržované při teplotě 37 °C jsou infekční pro navího hostitele. Vzhled k tomu, že neexistuje žádný jiný analogický experiment, nelze naše výsledky porovnat.

Studie *in vitro* i *in vivo* prokázaly, že střevní kryptosporidie jsou schopny dokončit svůj vývojový cyklus během 3–10 dnů a žaludeční během 7–20 dnů (Current et Haynes, 1984; Tzipori, 1983; Kváč et al., 2016), se značnou variabilitou v závislosti na druhu hostitele (Tzipori, 1983, Kváč et al., 2016). V této práci jsme nezjistili rozdíl v prepatentní periodě jednotlivých druhů kryptosporidií v závislosti na způsobu inokulace. U *C. mortiferum* aplikovaného per orálně byla zjištěna prepatentní perioda 8–10 DPI, což je v souladu s daty z jiných studií (Tůmová et al., 2023). V případě chirurgické inokulace laparotomickou operací byla zaznamenána obdobná prepatentní

perioda. Ke stejným výsledkům jsme dospěli i v případě *C. proliferans*, nebyly zjištěny rozdíly v prepatentní periodě hostitelů inokulovaných purifikovanými oocystami nebo oocystami pocházející přímo ze zažívacího traktu hostitele, také Havrdová (2016) nepozorovala rozdíly v prepatentní periodě laparotomicky inokulovaných myší. Z výsledků tedy vyplývá, že způsob inokulace/infekce není rozhodující a neovlivňuje délku prepatentní periody.

Závěr

Studie zkoumající vliv teploty prostředí na excystaci sporozoitů *C. proliferans* a *C. mortiferum* odhalila, že teplota 37 °C nemá významný efekt na excystaci těchto druhů. Oocysty *C. proliferans* excystovaly výrazně méně při pouhém vystavení této teplotě, což naznačuje přítomnost ochranného faktoru v těle hostitele. Zatímco laparotomické operace potvrdily, že excystace a infekce hostitele oocystami *C. mortiferum* probíhají převážně v prostředí jejunu a duodena. Získané výsledky mají důležitý výzkumný potenciál pro porozumění procesům infekce kryptosporidií.

Seznam použité literatury

- Aydin Y, Ozkul IA.** Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Vet Parasitol.* 1996 Nov 15;66(3-4):257-62. doi: 10.1016/s0304-4017(96)01007-2. PMID: 9017888.
- Bones AJ, Jossé L, More C, Miller CN, Michaelis M, Tsaousis AD.** Past and future trends of *Cryptosporidium in vitro* research. *Exp Parasitol.* 2019 Jan;196:28-37. doi: 10.1016/j.exppara.2018.12.001. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30521793; PMCID: PMC6333944.
- Bouزيد M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM.** *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jan;26(1):115-34. doi: 10.1128/CMR.00076-12. PMID: 23297262; PMCID: PMC3553671.
- Bujila I, Troell K, Fischerström K, Nordahl M, Killander G, Hansen A, Söderlund R, Lebbad M, Beser J.** *Cryptosporidium* chipmunk genotype I – An emerging cause of human cryptosporidiosis in Sweden. *Infect Genet Evol.* 2021 Aug; 92:104895. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104895. Epub 2021 May 8. PMID: 33971308.
- Campbell I, Tzipori AS, Hutchison G, Angus KW.** Effect of disinfectants on survival of *cryptosporidium* oocysts. *Vet Rec.* 1982 Oct 30;111(18):414-5. doi: 10.1136/vr.111.18.414. PMID: 7147666.
- Cavalier-Smith T.** Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *Eur J Protistol.* 2014 Oct;50(5):472-95. doi: 10.1016/j.ejop.2014.07.002. Epub 2014 Jul 30. PMID: 25238406.
- Current WL, Garcia LS.** Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991 Jul;4(3):325-58. doi: 10.1128/CMR.4.3.325. PMID: 1889046; PMCID: PMC358202.
- Current WL, Upton SJ, Haynes TB.** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, *Cryptosporidiidae*) infecting chickens. *J Protozool.* 1986 May;33(2):289-96. doi: 10.1111/j.1550-7408.1986.tb05608.x. PMID: 3735157.
- Current WL, Haynes TB.** Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science.* 1984 May 11;224(4649):603-5. doi: 10.1126/science.6710159. PMID: 6710159.
-

-
- Dudáková Hana.** Faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií přežvýkavců. České Budějovice, 2022. bakalářská práce (Bc.). JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH. Fakulta zemědělská a technologická, 53 s.
- Enemark HL, Bille-Hansen V, Lind P, Heegaard PM, Vigre H, Ahrens P, Thamsborg SM.** Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum*--evaluation of an animal infection model. *Vet Parasitol.* 2003 Apr 2;113(1):35-57. doi: 10.1016/s0304-4017(03)00034-7. PMID: 12651216; PMCID: PMC7125529.
- English ED, Guérin A, Tandel J, Striepen B.** Live imaging of the *Cryptosporidium parvum* life cycle reveals direct development of male and female gametes from type I meronts. *PLoS Biol.* 2022 Apr 18;20(4): e3001604. doi: 10.1371/journal.pbio.3001604. PMID: 35436284; PMCID: PMC9015140.
- Fayer R.** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol.* 2010 Jan;124(1):90-7. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.005. Epub 2009 Mar 18. PMID: 19303009.
- Fayer R, Trout JM, Graczyk TK, Lewis EJ.** Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Vet Parasitol.* 2000 Nov 10;93(2):103-12. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00356-3. PMID: 11035228.
- Fayer R, Xiao L.** (Eds.). (2007). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis (2nd ed.). CRC Press. Taylor & Francis INC International Concepts, 576 p. <https://doi.org/10.1201/9781420052275>
- Fayer R, Guidry A, Blagburn BL.** Immunotherapeutic efficacy of bovine colostral immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infect Immun.* 1990 Sep;58(9):2962-5. doi: 10.1128/iai.58.9.2962-2965.1990. PMID: 2387630; PMCID: PMC313595.
- Fayer R, Leek RG.** The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. *J Protozool.* 1984 Nov;31(4):567-9. doi: 10.1111/j.1550-7408.1984.tb05504.x. PMID: 6512726.
- Fayer R, Santín M, Trout JM.** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol.* 2008 Oct 1;156(3-4):191-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.05.024. Epub 2008 May 23. PMID: 18583057.
-

-
- Göebel E, Brandler U.** Ultrastructure of microgametogenesis, microgametes and gametogamy of *Cryptosporidium* sp. in the small intestine of mice. *Protistologica*. 1982
- Havrdová Nikola.** Laparotomické infekce hostitelů střevními a žaludečními kryptosporidii. Č. Budějovice, 2016. diplomová práce (Ing.). JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH. Zemědělská fakulta, 67 s.
- Choudhry N, Bajaj-Elliott M, McDonald V.** The terminal sialic acid of glycoconjugates on the surface of intestinal epithelial cells activates excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun*. 2008 Aug;76(8):3735-41. doi: 10.1128/IAI.00362-08. Epub 2008 May 27. PMID: 18505814; PMCID: PMC2493191.
- Khan SM, Witola WH.** Past, current, and potential treatments for cryptosporidiosis in humans and farm animals: A comprehensive review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Jan 24;13:1115522. doi: 10.3389/fcimb.2023.1115522. PMID: 36761902; PMCID: PMC9902888.
- Kváč M, Havrdová N, Hlásková L, Daňková T, Kanděra J, Ježková J, Vítovec J, Sak B, Ortega Y, Xiao L, Modrý D, Chelladurai JR, Prantlová V, McEvoy J.** *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLoS One*. 2016 Jan 15;11(1):e0147090. doi: 10.1371/journal.pone.0147090. PMID: 26771460; PMCID: PMC4714919.
- Melicherová J, Ilgová J, Kváč M, Sak B, Koudela B, Valigurová A.** Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology*. 2014 Feb;141(2):287-303. doi: 10.1017/S0031182013001637. Epub 2013 Oct 11. PMID: 24128742.
- O'Hara SP, Chen XM.** The cell biology of cryptosporidium infection. *Microbes Infect*. 2011 Aug;13(8-9):721-30. doi: 10.1016/j.micinf.2011.03.008. Epub 2011 Mar 31. PMID: 21458585; PMCID: PMC3130844.
- Rašková V, Květoňová D, Sak B, McEvoy J, Edwinson A, Stenger B, Kváč M.** Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *J Clin Microbiol*. 2013 Jan;51(1):360-2. doi: 10.1128/JCM.02346-12. Epub 2012 Oct 24. PMID: 23100342; PMCID: PMC3536213.
-

-
- Goodgame RW, Kimball K, Ou CN, White AC Jr, Genta RM, Lifschitz CH, Chappell CL.** Intestinal function and injury in acquired immunodeficiency syndrome-related cryptosporidiosis. *Gastroenterology*. 1995 Apr;108(4):1075-82. doi: 10.1016/0016-5085(95)90205-8. PMID: 7698574.
- Ryan U, Zahedi A, Feng Y, Xiao L.** An update on zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes in humans. *Animals (Basel)*. 2021 Nov 19;11(11):3307. doi: 10.3390/ani11113307. PMID: 34828043; PMCID: PMC8614385.
- Schulzová Tereza.** Faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií hlodavců. České Budějovice, 2022. diplomová práce (Ing.). JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH. Fakulta zemědělská a technologická, 43 s.
- Sateriale A, Gullicksrud JA, Engiles JB, McLeod BI, Kugler EM, Hena-Mejia J, Zhou T, Ring AM, Brodsky IE, Hunter CA, Striepen B.** The intestinal parasite *Cryptosporidium* is controlled by an enterocyte intrinsic inflammasome that depends on NLRP6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jan 12;118(2): e2007807118. doi: 10.1073/pnas.2007807118. PMID: 33372132; PMCID: PMC7812745.
- Slavín D.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J Comp Pathol*. 1955 Jul;65(3):262-6. doi: 10.1016/s0368-1742(55)80025-2. PMID: 13242675.
- Tandel J, English ED, Sateriale A, Gullicksrud JA, Beiting DP, Sullivan MC, Pinkston B, Striepen B.** Life cycle progression and sexual development of the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*. *Nat Microbiol*. 2019 Dec;4(12):2226-2236. doi: 10.1038/s41564-019-0539-x. Epub 2019 Sep 2. PMID: 31477896; PMCID: PMC6877471.
- Tůmová L, Ježková J, Prediger J, Holubová N, Sak B, Konečný R, Květoňová D, Hlásková L, Rost M, McEvoy J, Xiao L, Santín M, Kváč M.** *Cryptosporidium mortiferum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae), the species causing lethal cryptosporidiosis in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Parasit Vectors*. 2023 Jul 15;16(1):235. doi: 10.1186/s13071-023-05844-8. PMID: 37454101; PMCID: PMC10349434.
- Tyzzar EE.** An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric glands of the common Mouse. *J Med Res*. 1910 Nov;23(3):487-510.3. PMID: 19971982; PMCID: PMC2098948.
-

-
- Tzipori S.** Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol Rev.* 1983 Mar;47(1):84-96. doi: 10.1128/mr.47.1.84-96.1983. PMID: 6343828; PMCID: PMC281562.
- Tzipori S, Angus KW, Gray EW, Campbell I, Allan F.** Diarrhea in lambs experimentally infected with *Cryptosporidium* isolated from calves. *Am J Vet Res.* 1981 Aug;42(8):1400-4. PMID: 7294476.
- Tzipori S, Ward H.** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect.* 2002 Aug;4(10):1047-58. doi: 10.1016/s1286-4579(02)01629-5. PMID: 12191655.
- Upton SJ, Current WL.** The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) infecting mammals. *J Parasitol.* 1985 Oct;71(5):625-9. PMID: 4057006.
- Vinayak S, Pawlowic MC, Sateriale A, Brooks CF, Studstill CJ, Bar-Peled Y, Cipriano MJ, Striepen B.** Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Nature.* 2015 Jul 23;523(7561):477-80. doi: 10.1038/nature14651. Epub 2015 Jul 15. PMID: 26176919; PMCID: PMC4640681.
- Widmer G, Klein P, Bonilla R.** Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology.* 2007 Oct;134(Pt 11):1583-8. doi: 10.1017/S0031182007002922. Epub 2007 May 17. PMID: 17506930.
- Woodmansee DB.** Studies of in vitro excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves. *J Protozool.* 1987 Nov;34(4):398-402. doi: 10.1111/j.1550-7408.1987.tb03199.x. PMID: 3123647.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ.** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev.* 2004 Jan;17(1):72-97. doi: 10.1128/CMR.17.1.72-97.2004. PMID: 14726456; PMCID: PMC321466.
- Yeoh LM, Lee VV, McFadden GI, Ralph SA.** Alternative Splicing in Apicomplexan Parasites. *mBio.* 2019 Feb 19;10(1):e02866-18. doi: 10.1128/mBio.02866-18. PMID: 30782661; PMCID: PMC6381282.
-

Seznam obrázků

Obrázek 1: Revidovaný vývojový cyklus <i>Cryptosporidium</i> spp. (English et al., 2022) - upraveno.....	13
Obrázek 2: Přítomnost oocyst <i>Cryptosporidium mortiferum</i> v trusu myši laparotomicky inokulovaných do různých částí zažívacího traktu. Zelená barva značí přítomnost oocyst, červená barva značí nepřítomnost oocyst v trusu.....	37

Seznam tabulek

Tabulka 1: Platné druhy kryptosporidií savců	11
Tabulka 2: Hodnocení výskytu oocyst u krys malých a SCID myši inokulovaných oocystami <i>Cryptosporidium proliferans</i> uchovávaných při teplotě 37 °C nebo 8 °C. 0 – nepřítomnost oocyst (zvýrazněno červeně), 1 – přítomnost oocyst (zvýrazněno zeleně).	34
Tabulka 3: Procento excystovaných oocyst <i>Cryptosporidium proliferans</i> uchovávaných v teplotě 8 °C a 37 °C a excystovaných při 37 °C	35

Seznam grafů

Graf 1: Procento excystovaných oocyst <i>C. parvum</i> při různém excystačním prostředí	36
Graf 2: Procento excystovaných oocyst <i>C. mortiferum</i> v různém excystačním prostředí	36