

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N 4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Veterinárních disciplín a kvality produktů

Vedoucí katedry: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv skladovacího média, teploty a času na uchovávání vzorků trusu
pro následnou detekci vybraných zoonotických protist pomocí PCR
metod**

Autor: Bc. Dita Havrdová

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

České Budějovice, duben 2014

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 10. 4. 2014

.....

Bc. Dita Havrdová

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, cenné rady a trpělivost, Nikole Havrdové, bez které by tato práce nebyla. Poděkování patří také pracovníkům laboratoře Veterinární a humánní protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, za ochotu, cenné rady a přátelské jednání. Svému manželovi a dětem děkuji za podporu a pochopení.

Tato práce byla podpořena projektem OPVK 2.3 Rozvoj vědeckého týmu a laboratoře pro infekční onemocnění společná člověku a lidoopům (CZ. 1.07/2.3.00/20.0300).

Abstrakt

Klidová stádia parazitů velmi dobře odolávají nepříznivým vlivům vnějšího prostředí. Mají schopnost přežít dlouhou dobu a s těmito vlivy se vyrovnat. Jednou s přesných metod detekce *C. parvum* a *E. cuniculi* je PCR. Jako nejvhodnější skladovací médium k odběru trusu v terénu lze doporučit RNA later a 2,5% dichroman draselný. Vzorke takto fixované lze skladovat v rozmezí teplot -20 až 21 °C a to i v případě, když není možnost uskladnění v chladničce.

Klíčová slova: *C. parvum*; *E. cuniculi*; PCR; skladovací médium

Summary

Resting stages of parasites are very well resistant to adverse effects of the external environment. They have the ability to survive for long periods and to accommodate to such effects. One of the accurate methods for detection of *C. parvum* and *E. cuniculi* is PCR. As the most appropriate storage medium for the droppings collected in the field is recommended RNA later and 2,5 % potassium dichromate. Samples fixed in this way may be stored at temperatures ranging from -20 to 21 °C, event if there is no possibility of storing them in a refrigerator.

Keywords: *C. parvum*; *E. cuniculi*; PCR; storage medium

Obsah

1. Úvod - DNA objasnění minulosti	8
2. Literární přehled.....	9
2.1. Kryptosporidie	9
2.1.1. Historie.....	9
2.1.2. Životní cyklus.....	10
2.1.3. Exogenní vývojové stádium – oocysta	11
2.1.4. Epidemiologie	12
2.2. Mikrosporidie	13
2.2.1 Historie.....	14
2.2.2. Životní cyklus.....	14
2.2.3. Exogenní vývojové stádium – spora.....	16
2.2.4. Epidemiologie	17
2.3. Vliv faktorů vnějšího prostředí odolnost exogenních stádií.....	17
2.3.1. Vliv teploty	17
2.3.2. Vliv pH	18
2.3.3. Schopnost exogenních stádií přežít v půdě.....	19
2.3.4. Schopnost exogenních stádií přežít ve vodě	20
3. Cíle práce	21
4. Materiál a metodiky	22
4. 1. Paraziti	22
4.2 Barvení preparátů dle Miláčka-Vítovce	22
4.3. Purifikace oocyst <i>Cryptosporidium parvum</i>	23
4.4. Purifikace spor <i>Encephalitozoon cuniculi</i>.....	25
4.5. Design experimentu	25
4.6. Izolace DNA	26
4.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	27
4.8. Elektroforéza	29
5. Výsledky	30
5.1. Vliv konzervačního média a teplot na uchování DNA <i>Cryptosporidium parvum</i>	30
5.2. Vliv konzervačního média a teplot na uchování DNA <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	31
6. Diskuse	34
7. Závěr.....	36
8. Literatura	37

1. Úvod - DNA objasnění minulosti

Vlastností všech živých organismů je schopnost přenosu genetické informace. Genetickým materiálem v buněčných organizmech je DNA. Ta zůstává zachována i po mnoho milionů let. Z fosilních pozůstatků organismů lze úspěšně izolovat molekuly archaické DNA. Příkladem je nález genetického materiálu z Kanady. Je jím bakteriální DNA, která byla uchována v krystalech soli, jejíž stáří vědci odhadují na 419 milionů let (Park et al. 2009).

Studium historické DNA (aDNA) provází dva hlavní problémy a to degradace DNA v průběhu času a kontaminace starých vzorků recentní DNA (O'Rourke et al. 2000; Hofreiter et al. 2001; Kaestle-Horsburgh 2002). Na degradaci aDNA mají vliv chemické, fyzikální a biologické faktory. Po uvolnění endonukleáz dochází v buňce k rychlé degradaci nukleových kyselin. Přestože molekuly DNA mohou být izolovány z recentních i fosilních tkání, procesy probíhající po smrti organismu mají za následek, že výtěžky aDNA z fosilních tkání jsou v porovnání s recentními tkáněmi až stokrát nižší. V případě aDNA je nutno na rozdíl od recentních vzorků pracovat s krátkými úseky molekul, které obvykle nepřesahují 100-300 párů bází. (Rogan et Salvo 1990). Dalším typem postmortálního poškození DNA je modifikace a změny nukleotidů v lokálním zachovalém vlákně DNA spontánními chemickými reakcemi, zejména hydrolýzou a oxidací (Hofreiter et al. 2001). Více než stáří pozůstatků má na zachovalost aDNA vliv teplota. Zatímco mladší fosilie jsou většinou lépe zachovalé než starší, rozdíl mezi zachovalostí starších fosilií z chladného prostředí a mladších fosilií z teplejšího prostředí je mnohem těžší posoudit (Smith et al. 2003). Proto daleko mladší forenzní pozůstatky obsahující aDNA vykazují mnohdy stejnou míru poškození aDNA jako vzorky fosilní (Poinar 2003).

Přesto může být za příznivých podmínek část původní DNA dlouhodobě zachována ve stavu umožňujícím extrakci a analýzu. Uchování DNA je jednou ze základních podmínek výzkumu.

2. Literární přehled

2.1. Kryptosporidie

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou intracelulární, epiplazmatictí protozoální paraziti infikující mikroklky epitelu trávicího traktu celé řady plazů, ptáků, ryb, obojživelníků, savců včetně člověka (Xiao et al. 2004). Dříve byly kryptosporidie řazeny ke kokcidiím vzhledem k podobnosti vývojového cyklu (Corliss 1994; Fayer et al. 1997). Podle nejnovějších poznatků založených na molekulární fylogenetice jsou jejich nejbližšími příbuznými gregaríny (Carreno et al. 1999).

Kryptosporidie jsou charakteristické specifickou morfologií a biologickými vlastnostmi. Jednotlivé druhy se liší velikostí oocyst. Lze rozlišit dvě výrazné skupiny druhů, první s menšími oocystami a s afinitou ke střevu (k enterocytům) a druhou s většími oocystami a s afinitou k žaludečním žlázám (Xiao et al. 2004). Endogenní vývoj kryptosporidií probíhá v buňkách gastrointestinálního traktu. U všech vyšších obratlovců nalézáme druhy osidlující střevní epitel i druhy s vývojem lokalizovaným ve sliznici žaludku. Postiženy mohou být i další orgánové soustavy, zejména u ptáků (*Cryptosporidium baileyi*), kde může být rozvoj lokalizován kromě trávicí soustavy také v plicích, vzdušných vacích, Fabricově burze nebo v ledvinách (Hůrková et al. 2003).

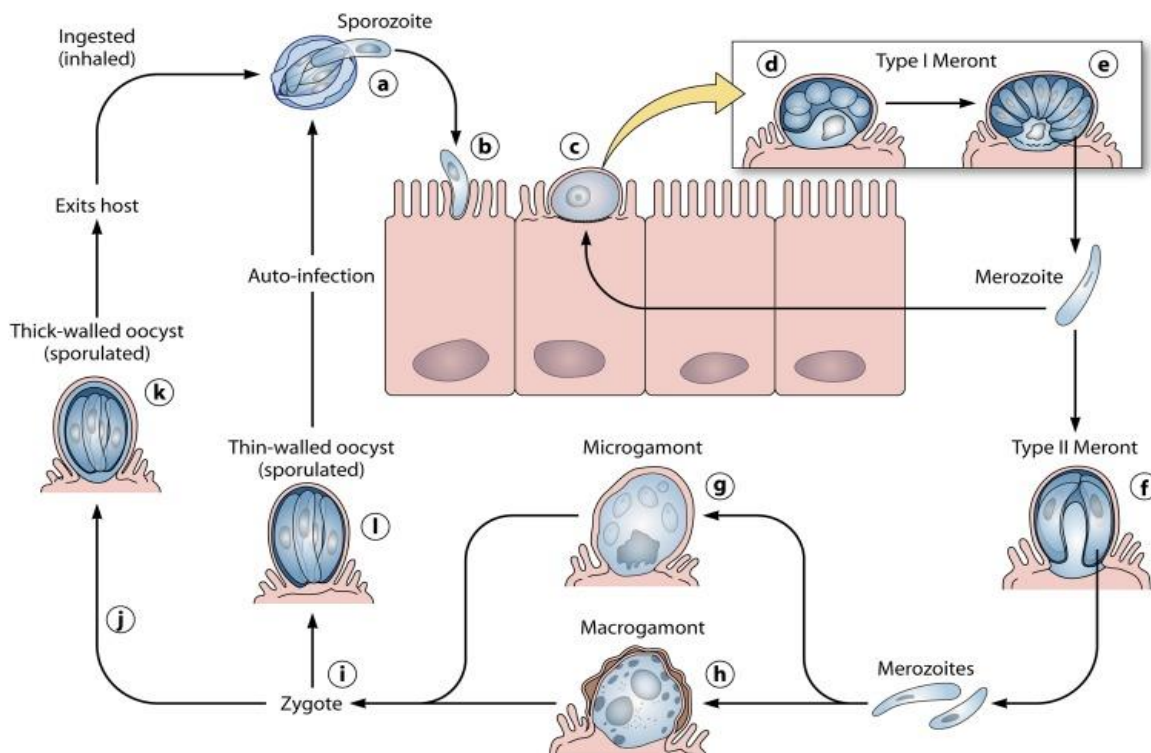
2.1.1. Historie

Ernest Edvard Tyzzer jako první popsal prvoka, kterého našel v žaludeční sliznici laboratorních myší. Pojmenoval ho *Cryptosporidium muris*. V roce 1907 popsal jeho sexuální a asexuální vývojová stádia (Tyzzer 1907). V roce 1912 popsal další nový druh kryptosporidií *Cryptosporidium parvum* s vývojovým cyklem v tenkém střevě myší (Tyzzer 1912). Dalším, v pořadí třetím druhem bylo *Cryptosporidium meleagridis* popsáné v souvislosti s onemocněním a úmrtím krůt (Slavin 1955). V roce 1970 vzbudily kryptosporidie zájem v souvislosti s průjmem u skotu (Pancieri et al. 1971; Meutin et al. 1974). První dva případy kryptosporidiózy u lidí se objevily v roce 1976 (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976).

2.1.2. Životní cyklus

Kryptosporidie jsou monoxeni, to znamená, že životní cyklus dokončují v jednom hostiteli. Nejlépe probádaný je cyklus druhu *C. parvum* a *C. muris*, životní cykly ostatních druhů jsou pravděpodobně stejné nebo velmi podobné (Tyzzer 1912; O'Donoghue 1995; Melicherová et al. 2014). Endogenní fáze začíná po požití oocyst vhodným hostitelem. Infekční dávka se v závislosti na odolnosti liší u jednotlivých hostitelů, i malé množství oocyst je schopné vyvolat onemocnění (Zambriski et al. 2013). Prvním krokem k infekci je excystace (obrázek 1) požitých oocyst. Proces excystace je ovlivněn řadou faktorů, jako jsou teplota a pH (Hijjawi et al. 2001). Z každé oocysty se uvolní 4 infekce schopní sporozoiti, kteří aktivně pronikají do mikroklyků slizničních epiteliálních buněk trávicího ústrojí (Wetzel et al. 2005). Následuje merogonie (asexuální množení), postupně vznikají dva odlišné typy merontů. Meronti I. typu obsahuje 6-8 merozoitů. Hostitelská buňka je zničena a merozoiti infikují nové epitelové buňky. Tento cyklus se buď několikrát opakuje, nebo vznikají meronti II. typu (obsahují pouze 4 merozoity), kteří dávají vzniknout mikro- a makrogametocytům a vývojový cyklus přechází do sexuální fáze (Sunnotel et al. 2006; Melicherová et al. 2014). Z nich v procesu gametogonie vznikají makrogamety a mikrogamety se 16 pohyblivými mikrogamety. Vzniklé mikrogamety a makrogamety splývají, vzniká zygota a z ní oocysta s jednou tetrazoickou sporocystou. Existují dva druhy produkovaných oocyst, tenkostěnné a silnostěnné. Tenkostěnné oocysty nejsou schopny dlouhodobě přežít ve vnějším prostředí, excystují v trávicím traktu a způsobují tzv. autoinfekci. Silnostěnné oocysty mají vnější vrstvu z kyselého glykoproteinu, střední lipoproteinovou a vnitřní glykoproteinovou. Tyto oocysty sporulují ještě v gastrointestinální soustavě původního hostitele, a jsou ihned schopné infekce. Každý ze 4 sporozoitů v oocystě má haploidní jádro s 8 chromozómy. Ty obsahují 10,1-10,4 miliónů párových bází DNA s nepočatnými introny. Cytoplasma obsahuje přibližně tisíc kopií od každé ze dvou typů dvouvláknové RNA pocházející z viru čeledi Partitiviridae (Blunt et al. 1997).

Obrázek 1. Životní cyklus *C. parvum*



Zdroj: Bouzid et al. 2013

2.1.3. Exogenní vývojové stádium – oocysta

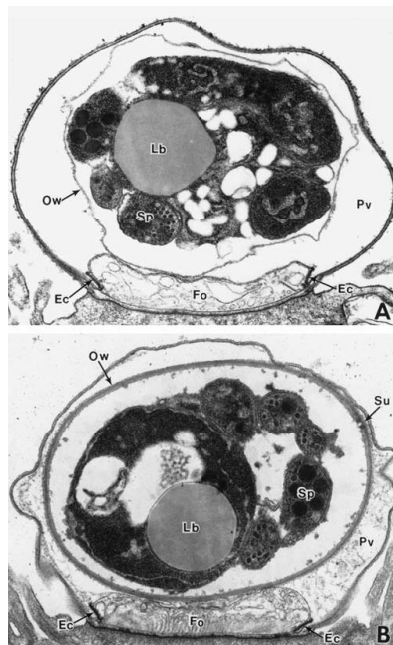
Stěna oocysty je tvořena ze tří vrstev, její průměrná síla je 49 nm (Harris et Petry 1999). Vnější vrstva je nepravidelná, její průměrná síla je 10 nm (Reduker et al. 1985). Pod touto vrstvou je 2,5 nm silná průsvitná vrstva. Pod ní je vnitřní vrstva a ta se skládá ze dvou zón. Vnější zóny 11,6 nm a vnitřní zóny 25,1 nm silné. Stěna je souvislá s výjimkou jednoho pólu, který je přerušen spojem (sutura), který zabírá 1/3 - 1/2 obvodu. Při excystaci se spoj rozevře, na obou stranách oocysty se zasouvá, stáčí dovnitř a sporozoiti opouští oocystu.

Vnější stěna je glykoproteinová. Střední vrstva této stěny je považována za glycolipid/lipoproteinovou, která jí propůjčuje určitou tuhost a je zodpovědná za acidorezistentní barvení. Vnitřní vrstva, která se zobrazuje jako lineární a vláknitá je považována za glykoproteinovou a poskytuje stěně určitou tuhost a pružnost. Tenkostěnné oocysty se liší v tom, že jejich stěna neobsahuje silnou multizonární

vnitřní vrstvu. Zbývá část obsahuje velké lipidové částice, mnoho amylopektinových granulí, krystalický protein, ribozómy a cytomembréanu.

Amylopektinové granule se skládají ze složitých rozvětvených polysacharidových řetězců dvou morfologických typů – větší, hladké granule stočené uvnitř, připomínající klubíčko provázku a menší granule s nepravidelným povrchem uvnitř částic (Harris et al. 2004).

Obrázek 2. Tenkostěnná a silnostěnná oocysta.



A Tenkostěnná oocysta: Am – amylopektin, Fo – „feeder“ organela, Lb – lipidní částice, Pv – parazitiformní vakuola, Sp – sporozoiti

B silnostěnná oocysta se suturrou na jednom pólu: Lb – lipidové částice, Au – silná stěna oocysty, Pv – parazitiformní vakuola, Sp – sporozoiti

Zdroj: Fayer R. 1997

2.1.4. Epidemiologie

Způsob přenosu infekce je fekálně - orální cestou, přičemž přenos může probíhat kontaktem (zvíře-člověk, člověk-člověk, člověk-zvíře) nebo požitím kontaminované vody (pitná, rekreační, mořská, led) a potravy (mléko, ovoce, mořské plody, saláty). Nejčastějším zdrojem infekce zůstávají kontaminované vodní zdroje znečištěné trusem nebo stolicí (MacKenzie et al. 1994).

Do roku 1995 bylo v USA zaznamenáno 5 velkých epidemií kryptosporidiózy, ve Velké Británii osm. V osmdesátých letech proběhlo v Severní Americe několik velkých nálezů, například v roce 1983 v New York City, 1984 v Braun Station v Texasu. V roce 1992 v Medford a Talent v Kretonu (3 000-15 000 nakažených osob) a v Pensylvánii (522 nakažených osob), v Kanadě byla zaznamenána epidemie v Kitchener – Waterloo v Ontariu (1 000 nakažených osob) (Lisle et Rose 1995).

Dosud nejvýznamnější epidemie byla zaznamenána v Millwaukee v roce 1993 (Wisconsin, USA). Bylo infikováno více než 400 000 osob, z nichž bylo více než 4 000 hospitalizováno a kryptosporidióza byla pravděpodobně příčinou 54 až 100 úmrtí v přímé souvislosti s touto nejrozsáhlejší infekcí z pitné vody v historii USA (MacKenzie et al. 1994).

Jako zdroje lidských infekcí byly zjištěny nepasterizované mléko, jogurty, tepelně neupravené masné výrobky, syrová zelenina, ovoce a mošty (Dillingham et al. 2002). Tyto infekce se vyskytují v menší míře než infekce, jejichž zdrojem je kontaminovaná voda.

2.2. Mikrosporidie

Mikrosporidie představují velkou a různorodou skupinu obligátních intracelulárních parazitů, infikujících celou řadu bezobratlých a obratlovců. Způsobují hospodářsky významné onemocnění u hmyzu (bourec morušový, včely), (Becnel et Andreadis 1999), ryb (Lom 2002; Shaw 1999) a savců (králíků, kožešinových zvířat a laboratorních hlodavců) (Canning et Lom 1986). Ve spojení se šířením pandemie AIDS byl zaznamenán velký počet mikrosporidiových infekcí u imunodeficitních pacientů (Franzen et Müller 2001; Didier et Weiss 2006). Nejnovější poznatky ukazují i na nebezpečí infekcí u imunokompetentních osob (Sak et al. 2011).

2.2.1 Historie

Parazita poprvé popsal v roce 1857 Nägeli v housenkách bource morušového a pojmenoval ho *Nosema bombycis* (Nägeli 1857). U savců byla poprvé popsána mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* v roce 1922 a to u králíků (Wright et Craighead 1922). Dodnes byl tento druh zaznamenán u širokého spektra savců včetně člověka. První infekce u lidí byla zaznamenána v roce 1959 (Matsubayashi et al. 1959). Nejvíce klinicky významný druh spojený s AIDS je *Enterocytozoon bieneusi*, který souvisí s lidskou mikrosporidiózou (Mathias et al. 2005). V současné době je popsáno více než 1300 druhů (Cappella-Gutierrez et al. 2012) ve 160 rodech (Wittner et Weiss 1999).

2.2.2. Životní cyklus

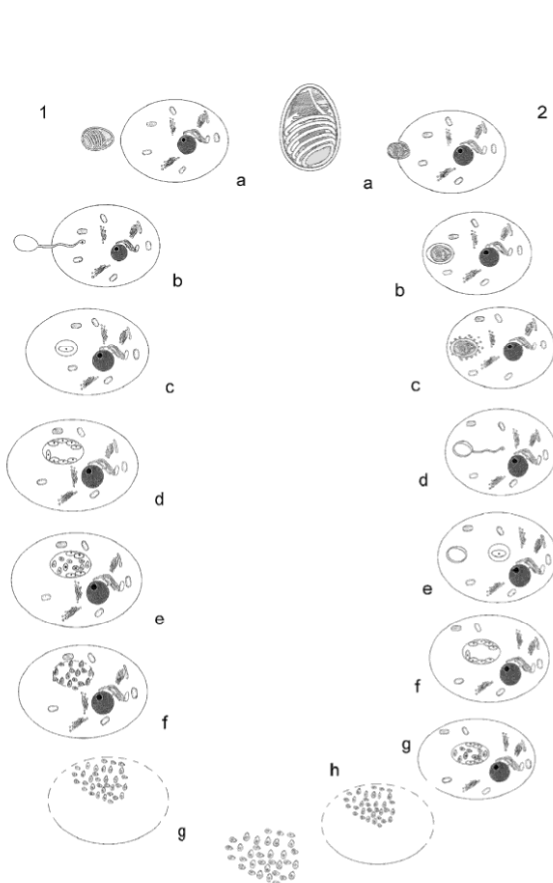
Mikrosporidie byly dříve milně považovány za jedny z nejstarších organizmů, protože jim chyběly typické mitochondrie, Golgiho aparát a perixomy a mají malé ribozomy jako prokaryota (Vossbrinck et al. 1987). Na základě molekulárně-fylogenetických analýz se ukázalo, že jde o dobře přizpůsobené a specializované parazity patřící buď do říše hub (Keeling et Slamovits 2004) nebo je vztah k nim velmi blízký (Gill et Fast 2006) (obrázek 3).

Životní cyklus mikrosporidií se skládá ze tří fází: proliferace, sporogonie a infekční fáze (Wittner et Weiss 1999). Místo infekce záleží na způsobu přenosu, typický je výskyt v epitelových buňkách gastrointestinálního traktu nebo respiračního ústrojí. Životaschopné infekční spory mikrosporidií jsou přítomné v průběhu infekce v různých tělních tekutinách (stolice, moč, sekrety dýchacích cest, apod.) (Schwartz et al. 1993b,c).

Spora je vybavena dlouhou, spirálovitě točenou pólovou trubicí, která je velmi důležitá pro infekci hostitelské buňky. Pomocí ní je do cytoplazmy hostitelské buňky injektována sporoplazma a začíná merogonie. Vznikající meronti se rozmnožují binárním dělením nebo rozpadem plazmodií na merozoity (dceřiné buňky). Následuje fáze sporogonie, dochází k dělení sporontů, vyvíjí se sporoblast a dozrává v konečné stádium spory (Vávra et Larsson 1999).

Jiným způsobem infekce hostitelské buňky je fagocytóza. Spora je pohlcena buňkou a fagozom s pohlcenou sporou dospívá v lysozom. Sporoplasma je schopna uniknout z lysozomu a vystřelením pólové trubice infikovat cytoplazmu hostitelské buňky (Franzen 2005).

Obrázek 3. Životní cyklus mikrosporidií



Při vhodných podmínkách proniká polární trubice do hostitelské buňky a infikuje ji sporoplazmou (1 b). Sporoplasma dozrává v meronty (1 c). Meronti se množí binárním dělením a nakonec se vyvinou ve sporonty (1 d). Sporonti se dále dělí na sporoblast, ze kterého se nakonec vyvinou zralé spory. Nové spory jsou uvolňovány z parazitoformní vakuoly (1 f) a z hostitelské buňky (1 g). Existuje i jiný způsob umožňující vstup do hostitelské buňky. Spory jsou fagocytovány buňkou (2 a), fagosom s fagocytovanou sporou zraje v lysozom (2 c). Sporoplasma je schopná proniknout ze zrajícího lysozomu a infikovat cytoplazmu buňky polární trubicí (2 d). Uvnitř hostitelské buňky sporoplasma dozrává na meronty a vývoj probíhá tak jak je popsáno výše (2 e – h).

Zdroj: Franzen 2005

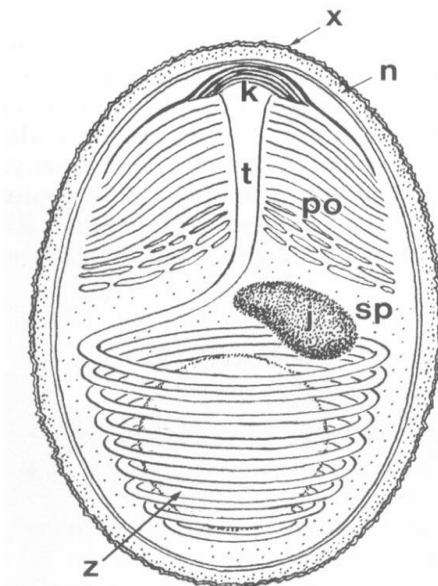
2.2.3. Exogenní vývojové stádium – spora

Jedním z hlavních rysů spor mikrosporidií je jejich stěna. Její mechanické vlastnosti jí poskytují odolnost vůči podmínkám vnějšího prostředí a umožňuje zvýšení hydrostatického tlaku, který umožňuje vystřelení spor (Frixione et al. 1997). Obal tvoří 3 vrstvy: vnější vrstva je tvořena glykoproteiny, střední a vnitřní tvořena chitinem. Stěna na vrcholu spory je zeslabena. Uvnitř spory je cytoplazma s jedním (*Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Pleistophora* a *Trachipleistophora*) nebo dvěma (*Brachiola*, *Nosemy* a *Vittaforma*) jádry (Keohane et Weiss 1999).

Pólové vlákno je má unikátní strukturu (obrázek 4), je připojené k vnitřní straně předního konce spory kotvicím diskem, od poloviny spory se spirálovitě stáčí do závitů. Se změnou pH nebo osmotického tlaku protoplast a zadní vakuola bobtnají v důsledku absorpce vody a vyvíjejí tlak a vytlačí obsah spory vláknem ven (Undeen 1990; Keohane et Weiss 1999).

Spory mají schopnost přežít mimo hostitele, některé spory přežívají ve vodě mnoho let (Cali et Takvorian 2004).

Obrázek 4. Schéma spóry mikrosporidie



x – exospora, n – endospora, k – kotvicí aparát, po – polaroplast, t – pólové vlákno,
sp – sporoplasma, j – jádro, z – zadní vakuola
Zdroj: Lom a Dyková 1992

2.2.4. Epidemiologie

Mikrosporidie byly uznány jako oportunní patogeny u imunokompromitovaných pacientů, ale mikrosporidíóza je častějším jevem u imunokompetentních pacientů (Lorez et al. 2002). Většinu lidských infekcí způsobují *Enterocytozoon bieneusi* nebo *Encephalitozoon intestinalis* (Cali et al. 1993, Desportes et al. 1985). *Encephalitozoon intestinalis* je druhou nejčastější mikrosporidií napadající GIT, na druhé straně *E. cuniculi* nejčastěji napadá domácí zvířata, včetně králíků, psů, koček, skotu, ovcí a koní. Symptomatické infekce lidí tohoto druhu jsou vzácné (Harcourt-Brown et Holloway 2003).

Mikrosporidie byly nalezeny ve zdrojích pitné vody, v půdě, u domácích a volně žijících zvířat, což naznačuje možnou infekci z vody a alimentární přenos (Mathis et al. 2005; Li et al. 2012).

2.3. Vliv faktorů vnějšího prostředí odolnost exogenních stádií

Obě exogenní stádia, jak oocysta, tak spora, jsou velmi odolná a snadno při určitých podmínkách přežívají ve vnějším prostředí. Mezi faktory, které ovlivňují jejich přežití, patří zejména teplota, čas nebo pH.

2.3.1. Vliv teploty

Oocysty jsou vysoce odolné vůči nepříznivým podmínkám přírodního prostředí a chemickým desinfekcím. Patrně se vyvinuly v rozptýlených mobilních populacích tam, kde byl silný selekční tlak, výsledkem je produkce oocyst, které přežívají po dlouhou dobu (Blewett 1989). Několik laboratorních studií se zabývalo snížením počtu životaschopných nebo infekčních oocyst po působení různých fyzikálních faktorů jakou je teplo, chlad, UV záření, tlak a vysušení. Při teplotách 5-15 °C, zůstalo několik oocyst *C. parvum* infekčních po dobu 6 měsíců. Byly získány z výkalů a skladovány ve vodě. Klesne-li teplota pod 5 °C nebo se zvýší nad 15 °C, zkracuje se doba přežití (Fayer et al. 1998). Zachování životaschopnosti při různých teplotách je závislé na sacharidových zásobách energie uložených ve sporozoitech.

Při vyšších teplotách dochází k rychlejšímu spotřebování amylopektinových granulí. Amylopektin poskytuje energii potřebnou pro excystaci a invazi hostitelské buňky (Fayer et al. 1998; Jenkins 2003). Ztráta infekčnosti je také spojována se sníženým obsahem ATP, který mají za následek vyšší metabolické aktivity oocyst (King 2005). Při působení teplot 64,2 °C a vyšších podobu 5 minut a 72,4 °C po dobu 1 minutu jsou oocysty neinfekční (Fayer 2004).

Stěny spor jsou tvořeny chitinem, který jim poskytuje ochranu před různými vlivy vnějšího prostředí. Za experimentálních podmínek spory *E. cuniculi* zůstaly infekční po inkubaci po dobu 16 dní při 22 °C a po 98 dnech při 4 °C (Waller 1979). Infekční zůstali i spory, které byly vysušeny a následně inkubovány při teplotě 22 °C a relativní vlhkosti 2 % po dobu 28 dní. Inkubace v destilované vodě nebo zmrazení a rozmrazení nedokáže zabít všechny spory *E. cuniculi* (Shaddock et Polley 1978).

2.3.2. Vliv pH

V laboratorním pokusu byl zkoumán vliv pH na přežití oocyst. Pokud pH bylo upraveno přibližně z 1,5 na 6 přidáním NaOH nebo CaOH nebyl zjištěn žádný vliv na životaschopnost oocyst. Přítomností iontů železa a zvýšení pH již životaschopnost oocyst ovlivnilo (Robertson et al. 1992).

Studie zabývající se inaktivací oocyst *C. parvum* ukazuje, že expozice pro hodnoty pH odpovídající těm, které souvisí s koncentrací amoniaku, vykazaly minimální účinky alkalického pH na životaschopnost oocyst. Z hlediska životního prostředí příslušné koncentrace volného amoniaku může výrazně zvýšit inaktivaci oocyst v prostředí s amoniakem. Dokonce i nejnižší koncentrace amoniaku výrazně snížila životaschopnost oocyst po 24 hodinách expozice. Zvyšující se koncentrací amoniaku vzrůstá inaktivační stupeň, který se pohyboval od 0,014-0,066 hodin. Při nejvyšší koncentraci amoniaku stále zůstává malý zlomek životaschopných oocyst. (Jenkins et al. 1998).

Vzhledem k tomu, že mikrosporidie mají široké hostitelské spektrum, suchozemské i vodní hostitele, tak různé druhy vyžadují rozdílné podmínky pro vypouštění a aktivaci spor. Podmínky, které podporují vypouštění a aktivaci spor zahrnují inkubaci v alkalickém nebo kyselém prostředí, posun z kyselého do

alkalického pH nebo z alkalického do neutrálního pH (Undeen et Avery 1984; Unden et Epsky, 1990). Některé druhy prokázaly vypouštění spor za kyselého i alkalického pH (Hashimoto et al. 1976). Spory *E. cuniculi* přežívají 24 hodinovou inkubaci při pH 4 a pH 9 (Shadduck et Polley 1978).

2.3.3. Schopnost exogenních stádií přežít v půdě

Z výzkumů zabývajících se schopností přežitím oocyst *C. parvum* v půdě vyplynulo, že v půdách s vyšším podílem jílu a s tím související vyšší retenční schopností vody, přežívají oocysty nejdéle. Se stoupajícím podílem písku a stoupající teplotou okolí jsou oocysty rychleji inaktivovány. V mírných klimatických podmínkách mohou oocysty přežít několik měsíců v zemědělské půdě, a představují tak hrozbu pro povrchové vody (Jenkins et al. 2002). Ukládáním hnoje na zemědělskou půdu může také dojít ke kontaminaci podzemních vod. Záleží na typu půdy a podloží, protože přenos oocyst je méně přímočarý a vyžaduje pohyb půdou. Nižší teploty mohou mít vliv na zvýšenou míru uvolňování oocyst z hnoje a vyluhování půdou. Chladnější teplota (10 °C) má vliv na přežití a udržení infekčnosti oocyst po dobu 3 měsíců a déle (Boyer et al. 2009).

Ze studií zabývajících se působením trusu na životaschopnost oocyst se zjistilo, že při uložení trusu ve tmě při 4 °C zůstává po 25 týdnech 40 % oocyst životaschopných a 10 % oocyst přežívá déle než 400 dní (Robertson et al. 1992; Jenkins et al. 1997).

Vegetační ochranný pás se využívá k zachycení půdních částic a živin na zemědělské půdě a tím se zabraňuje znečištění povrchových vod. Měřením pozemního přenosu pohybu oocyst, hloubky infiltrace půdy, přilnavost k vegetaci na holém a rostlinami porostlém povrchu půdy se zjistilo, že vegetační pás snižuje pohyb oocyst, umožňuje jim vniknutí do půdního profilu a následně přilnutí nebo zachycení v jílovitých agregátech, v menší míře přilnutí k vegetaci (Mc Laughlin et al. 2013).

2.3.4. Schopnost exogenních stádií přežít ve vodě

Infikovaní hostitelé vylučují většinu oocyst sporulujících a infekčních a jsou odolné proti celé řadě podmínek vnějšího prostředí. Laboratorní studie prokázaly, že oocysty uložené ve vodním roztoku zůstávají životaschopné při pokojové teplotě (15–20 °C) až po dobu 3 měsíců a v ledničce (4–6 °C) i po dobu jednoho roku. Ke ztrátě infekivity došlo zahřátím na 65 °C po dobu 30 minut nebo sušením po dobu 4 hodin (O'Donoghue 1995).

Spory mikrosporidií jsou odolné vůči vlivům vnějšího prostředí a přežívají určitou dobu ve vodě, spory jsou malé a není snadné je zachytit filtrací, infekční dávka je poměrně nízká (Franzen et Müller 1999a). Mnoho druhů mikrosporidií, které infikují člověka bylo identifikováno z různých vodních zdrojů (Hutin et al. 1998; Dascomb et al. 2000). Mikrosporidie mají schopnost přetrvávat ve sladké, slané vodě (po inkubaci v médiu pro tkáňové kultury) nebo delší dobu po dehydrataci (Li et al. 2003).

3. Cíle práce

Posoudit a najít vhodný způsob konzervace trusu nebo stolice při terénních odběrech pro další zpracování.

4. Materiál a metodiky

4. 1. Paraziti

Cryptosporidium parvum

Oocysty *C. parvum* byly získány z přirozeně infikovaného 18-ti denního telete.

Encephalitozoon cuniculi

Spory kmene *E. cuniculi* EC2 byly původně izolovány z dexamethazonem léčených laboratorních myší a kultivovány *in vitro* v ledvinových buňkách opic (VERO, řada E6) skladovaných v RPMI-1640 médiu (SIGMA) teplem inaktivovaným boviním sérem (Koudela et al. 1994).

4.2 Barvení preparátů dle Miláčka-Vítovce

Zásobní roztoky

Roztok methylvioleti

- 0,6 g methylvioleti
- 1 ml anilinu
- 1 g fenolu
- 30 ml 96% alkoholu
- 70 ml deionizované vody

Roztok tartazinu

- 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

Roztok 2% kyseliny sírové

Pracovní postup

- Špejlí rozetřít tenkou vrstvou trusu (obsahu střeva) na podložní sklíčko.
- Sklo s nátěrem fixovat pomocí metanolu plamenem.
- Obarvit roztokem methylvioletí; doba barvení 30 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 2 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Dobarvit nátěr v roztoku tartrazinu po dobu 4 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Nechat uschnout při laboratorní teplotě. Prohlížet mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

4.3. Purifikace oocyst *Cryptosporidium parvum*

Sacharózový gradient (Arrowood et Sterling 1987)

Zásobní roztoky

Sheaterův cukerný roztok

259 ml deionizované vody

405 g cukru

7,29 g fenolu

1% PBS TWEEN (do 1 l PBS přidat 0,5 ml TWEEN 20)

Pracovní sheaterovy roztoky

roztok A: 1+2 (1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly PBS TWEEN)

roztok B: 1+4 (1 díl Sheaterova roztoku + 4 díly PBS TWEEN)

Pracovní postup

- Vzorek trusu rozmíchat v deionizované vodě a přecedit přes sítko.
- Navrstvit sacharózové gradienty: 30 ml roztoku A, 30 ml roztoku B a 15 ml suspenze oocyst.
- Centrifugovat 30 minut při 1370 g.
- Odsát vrchní vrstvu, supernatant přenést do čisté zkumavky.
- Objem doplnit deionizovanou vodou.
- Centrifugovat 20 minut při 1370 g.
- Odsát polovinu objemu, doplnit deionizovanou vodou a centrifugovat 30 minut při 1370 g. Toto opakovat ještě jednou.
- Odsát všechnu supernatant.
- Pelet s oocystami uchovávat při 4 °C.

Cesium chloridový gradient (Arrowood et Donaldson 1996)

Zásobní roztoky

CsCl - cesium chloridový roztok (hustota 1,15 g/ml)

21,07 g CsCl

100 ml destilované vody

PBS

0,025 M PBS; pH 7,2

Pracovní postup

- Oocysty přečištěné na sacharózovém gradientu centrifugovat 10 minut při 1450 g.
- Sediment rozmíchat v PBS.
- Do 2 ml zkumavky napipetovat 1 ml CsCl a na něj navrstvit 0,5 ml suspenze oocyst v PBS.
- Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
- Odebrat prstenec obsahující oocysty do čisté zkumavky, doředit PBS.
- Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.

- Odebrat supernatant a pelet rozmíchat v PBS.
- Centrifugovat při 16 000 g.
- Odebrat supernatant, pelet rozmíchat s přibližně 200 µl PBS.
- Oocysty uchovávat při 4 °C v PBS.

4.4. Purifikace spor *Encephalitozoon cuniculi*

Spory se izolují a čistí od buněk centrifugací 50 % Percoll (SIGMA) na 1, 1006 g po dobu 30 minut. Před uložením do deionizované vody s přidavkem antibiotik (SIGMA, 100 U/ml penicilin, 100 mg/ml streptomycin, 2,5 mg/ml amfotericinu B) při 4°C se třikrát promyjí deionizovanou vodou (Kotková et al. 2013).

4.5. Design experimentu

Celkem bylo připraveno 200 sterilních zkumavek s trusem, ke kterým byl přidán 2,5% dichroman draselný, 70% etanol, 96% etanol, RNA later, 4% formaldehyd a sada vzorků byla uložena bez média. Zkumavky byly uskladněny při teplotách 37 °C, 4 °C, RT, -20 °C. Jedna sada vzorků (n=8) byla vysušena při 40 °C a skladována při laboratorní teplotě. Po dobu 10 měsíců, byla od 1. do 6. měsíce měsíčně z každé kombinace skladovací teploty a média vybrána náhodně jedna zkumavka a byla provedena izolace DNA (kapitola 4. 6.), následně pak 8. a 10. měsíc.

Obsah jedné zkumavky:

- navážka 200 mg trusu ± 0,1 mg
- množství parazitů 1 g trusu - 100 000 oocyst *C. parvum* a 100 000 spor *E. cuniculi*)
- 1 ml příslušného média

Použitá média: 2,5 % dichroman draselný, 70 % etanol, 96 % etanol, RNA later, 4 % formaldehyd. Jedna sada zkumavek byla skladována bez použití média.

Použití teploty uskladnění: -20 °C, 4 °C, RT, 37 °C.

4.6. Izolace DNA

Materiál

200 mg vzorku trusu s médiem, PSP Spin Stool DNA Kit (Invitek)

Proteináze K lyofylizát: rozpustit přidáním 1,5 ml deionizované vody. Po rozpuštění skladovat při -20 °C.

Elution Buffer: odpipetovat do 1,5 ml mikrozkuřavky a inkubovat předem při 70 °C.

Postup

- Materiál dát do Safe - Lock – Tube, přidat skleněné zirkonové kuličky a 0,8 ml Lysis Buffer P, vortexovat 1 minutu a rozbít Fast Prepem 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
- Inkubovat 10 minut při 95 °C v termobloku, během inkubace protřepat.
- Centrifugovat 1 minutu při 11 000 g.
- Přenést veškerý supernatant do InviAdsorb-Tube, 15 s vortex, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat při 14 000 g.
- Supernatant přepipetovat do čistých 1,5 ml mikrozkuřavek, centrifugovat při 14 000 g.
- Do čistých 1,5 ml mikrozkuřavek napipetovat 25 µl Proteinase K a přidat 400 µl supernatantu, vortexovat.
- Inkubovat 10 minut při 70 °C, během inkubace protřepat.
- Připipetovat 200 µl Binding Buffer A, vortexovat.
- Přepipetovat veškerý objem do spin Filter + Tube, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 11 000 g.
- Vylít obsah z mikrozkuřavek, napipetovat 500 µl Wash I, centrifugovat 1 minutu při 11 000 g.
- Vylít obsah mikrozkuřavek, napipetovat 700 µl Wash II, centrifugovat 1 minutu při 11 000 g.
- Vylít odpad a opět centrifugovat 4 minuty při 14 000 g.
- Na kolonu dát čistou 1,5 ml mikrozkuřavku, napipetovat 200 µl Elution Buffer D (předehřátého) na kolonu, inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 11 000 g.

4.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Z vyizolované DNA byla pro detekci specifické DNA *C. parvum* provedena amplifikace části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku a pro detekci DNA *E. cuniculi* amplifikace ITS regionu ribozomální podjednotky za použití nested PCR a setů specifických primerů.

DNA byla amplifikována v termocykleru pomocí následujícího programu.

- Počáteční denaturace po dobu 3 min při 94 °C.
- 35 cyklů zahrnujících denaturaci 45 s při 94 °C.
- Nasedací teploty primerů – 45 s
 - ◆ Kryptosporidie – 55 °C u primární i sekundární reakce
 - ◆ Mikrosporidie – 57 °C u primární a 58 °C u sekundární reakce
- Extenze 60 s při 72 °C.
- Finální extenze 7 min při 72 °C.

K amplifikaci sekundárního PCR produktu bylo využito 2 µl primárního produktu PCR. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek obsahující DNA *C. muris*. Set použitých specifických primerů je uveden v tabulce 1 a 2 Protokol pro reakční směs PCR je uveden v tabulce 3.

Tabulka 1. Sety primerů pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku *Cryptosporidium* spp. (Jiang et al. 2005)

PRIMÁRNÍ REAKCE									
F1	TTC	TAG	AGC	TAA	TAC	ATG	CG		
R1	CCC	ATT	TCC	TTC	GAA	ACA	GGA		
SEKUNDÁRNÍ REAKCE									
F2	GGA	AGG	ATT	ATA	TTT	ATT	AGA	TAA	AG
R2	CTC	ATA	AGG	TGC	TGA	AGC	AGT	A	

Tabulka 2. Sety primerů pro amplifikaci ITS regionu ribozomální podjednotky mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* (De Bosscuere et al. 2007; Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996)

PRIMÁRNÍ REAKCE									
F1	TGA	ATG	(G,T)GT	CCC	TGT				
R1	GTT	CAT	TCG	CAC	TAC	T			
SEKUNDÁRNÍ REAKCE									
F2	GGA	ATT	CAC	ACC	GCC	CGT	C(A,G)(C,T)	TAT	
R2	CCA	AGC	TTA	TGC	TTA	AGT	CCA	GGG	AG

Tabulka 3. Reakční směs pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku *Cryptosporidium* spp. a ITS regionu ribozomální podjednotky mikrosporidií rodu *Encephalitozoon*.

Primární reakce			Sekundární reakce		
	Koncentrace	objem (μ l)		Koncentrace	objem (μ l)
H₂O	-----	12,30	H₂O	-----	12,30
MgCl₂	25 mM	1,20	MgCl₂	25 mM	1,20
10X buffer	1X	2,00	10X buffer	1X	2,00
dNTP	10 mM	0,40	dNTP	10 mM	0,40
Forward primer	10 μ M	0,40	Forward primer	10 μ M	0,40
Reverse primer	10 μ M	0,40	Reverse primer	10 μ M	0,40
BSA	10 mg/ml	0,80	BSA	10 mg/ml	0,80
Taq polymerase	1U/1 μ l	0,50	Taq polymerase	1U/1 μ l	0,50
DNA	-----	2,00	DNA	-----	2,00
Suma	-----	20,00	Suma	-----	20,00

4.8. Elektroforéza

U výsledných produktů ze sekundární reakce PCR byla provedena separace pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu.

Chemikálie

- TAE pufr (242 g tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA
- pH 8,00
- Agaróza (Serva Electrophoresis, Germany).
- Ethidium-bromid (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, USA).
- 10 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc., Canada).

Postup

- TAE pufr smíchat s agarózou (120 ml TAE pufru + 1,2 g agarózy).
- Nechat rozpustit v mikrovlnné troubě a následně zchladit pod tekoucí vodou na teplotu přibližně 50 °C.
- Přidat ethidium-bromid a promíchat.
- Gel nalít do formy, vložit hřebeny, nechat cca 20 minut tuhnout.
- Po ztuhnutí vyjmout hřebeny a gel vložit do vany na elektroforézu s TAE pufrem.
- Do první jamky napipetovat ladder, do ostatních jamek napipetovat 20 µl produktu sekundární PCR.
- Spustit elektroforézu - napětí 85 V po dobu potřebnou k separaci fragmentů DNA.

5. Výsledky

Výsledky našeho experimentu prokázaly, že DNA mikrosporidií je obecně lépe uchovávána než DNA kryptosporidií. Bez ohledu na použité médium či teplotu byla v 138/200 testovaných vzorcích detekována DNA mikrosporidií. Oproti tomu DNA kryptosporidií byla detekována pouze v 83 z 200 vzorcích.

5.1. Vliv konzervačního média a teplot na uchování DNA *Cryptosporidium parvum*

Bez ohledu na teplotu skladování bylo prokázáno 25, respektive 23 pozitivních výsledků amplifikace DNA *Cryptosporidium parvum* z 32 testovaných vzorcích skladovaných v RNA lateru a dichromanu draselném. V materiálu uchovávaném bez média bylo detekováno 15 pozitivních z 32. Při použití 70 % a 96 % etanolu nebo 4 % formaldehydu bylo detekováno pouze 11, 2, respektive 7 vzorků jako pozitivních. Ve vysušených vzorcích se nepodařilo prokázat přítomnost *C. parvum* ani v jednom z testovaných vzorků (tabulka 4).

Přítomnost DNA *C. parvum* byla prokázána v RNA lateru při teplotách -20 °C, 4 °C ve všech vzorcích po dobu 10 měsíců. Při RT byly vzorky pozitivní ještě 8 měsíc a při 37 °C pouze 2 měsíce. V dichromanu byly všechny vzorky za 10 měsíců pozitivní při -20 °C, 4 °C, při RT po 6 měsících a při 37 °C pouze po 1 měsíci. Ve vzorcích bez média byla DNA *C. parvum* prokázána nejdéle při -20 °C, a to po dobu 8 měsíců. Naopak skladování při 37 °C se ukázalo jak zcela nevhodné. Vzorky uchovávané v 70 % etanolu byly pozitivních při -20 °C po dobu 8 měsíců a se stoupající teplotou se detekovatelnost DNA výrazně snižovala. Uchovávání v 96 % etanolu se ukázalo jako ještě méně vhodné (tabulka 4). Ve 4 % formaldehydu byla prokázána přítomnost DNA u vzorků skladovaných maximálně do 4 měsíců.

Tabulka 4. Vliv teploty a média na uchování DNA *Cryptosporidium parvum*

Typ média	Teplota	Měsíc sledování									
		1	2	3	4	5	6	8	10		
K₂Cr₂O₇	-20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	4 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	RT	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	37 °C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
70% etanol	-20 °C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	4 °C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	RT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	37 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
96% etanol	-20 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	RT	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	37 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RNA later	-20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	4 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	RT	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	37 °C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
Bez média	-20 °C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	4 °C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	RT	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	37 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4% formaldehyd	-20 °C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	4 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	RT	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	37 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
vysušený		-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ Pozitivní amplifikace; - neaplifikováno; RT laboratorní teplota

5.2. Vliv konzervačního média a teplot na uchování DNA *Encephalitozoon cuniculi*

Na rozdíl od *C. parvum* byla přítomnost DNA *E. cuniculi* prokázána ve všech 8 vysušených vzorcích, také 32 vzorků z 32 uložených bez média bylo pozitivní. Ve vzorcích s RNA laterem bylo pozitivně testováno 26 z 32. U vzorků uchovávaných v dichromanu draselném bylo 23 z 32 vzorků pozitivních. V 96 % etanolu bylo 21 pozitivních z 32 a 22 pozitivních vzorků bylo v 70 % etanolu. Ve 4 % formaldehydu bylo pouze 6 pozitivních z 32.

Přítomnost DNA *E. cuniculi* byla prokázána ve vzorcích bez média po dobu 10 měsíců, a to bez ohledu na skladovací teplotu. Taktéž vysušení vzorku přispělo k

dlouhotrvající detekovatelnosti specifické DNA *E. cuniculi*. V dichromanu byly téměř všechny vzorky pozitivní po dobu 10 měsíců vyjma vzorků uchovávaných při 37 °C. RNA later spolehlivě uchoval DNA po dobu 6 měsíců bez ohledu na teplotu a v případě skladování při -20 °C i po dobu 10 měsíců. Shodně jako v případě kryptosporidií, taktéž skladování spor *E. cuniculi* ve 4% formaldehydu výrazně ovlivnilo detekovatelnost specifické DNA. V případě použití jak 70%, tak 96% etanolu se jako optimální ukázala teplot -20 °C, při které byla DNA detekována po dobu 10 měsíců. Se stoupající teplotou se doba, při které jsme byli schopni DNA *E. cuniculi* uložené v etanolu amplifikovat, výrazně zkracovala (tabulka 5).

Tabulka 5. Vliv teploty a média na uchování DNA *Encephalitozoon cuniculi*.

Typ média	Teplota	Měsíc sledování									
		1	2	3	4	5	6	8	10		
K₂Cr₂O₇	-20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	4 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	RT	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	37 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
70% etanol	-20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	4 °C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	RT	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
	37 °C	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
96% etanol	-20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	4 °C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	RT	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	37 °C	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
RNA later	-20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	4 °C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	RT	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	37 °C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Bez média	-20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	4 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	RT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
4% formaldehyd	-20 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4 °C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	RT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	37 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
vysušený		+	+	+	+	+	+	+	+	+	

+ Pozitivní amplifikace;
 - neamplifikováno;
 RT laboratorní teplota

Obecně lze shrnout, že s prodlužující se dobou skladování se doba uchování, respektive možnost prokázání její přítomnosti pomocí metod PCR zkracovala. V rámci sledování přítomnosti DNA *C. parvum* se v závislosti na druhu média a teplotě skladování jako kritická doba „degradace“ DNA ukázal 3-5 měsíc. V případě detekce specifické DNA *E. cuniculi* došlo k nemožnosti amplifikace v závislosti na druhu média a teplotě od 4 do 7 měsíce skladování (tabulky 4 a 5).

6. Diskuse

Klidová stádia parazitů nacházející se v životním prostředí se velmi dobře vyrovnávají s vnějšími vlivy, které na ně působí. Jsou schopna přežít po dlouhou dobu, vyrovnat se s nepříznivými teplotami a udržet si infekčnost. Jednou s přesných metod detekce mnoha infekčních agens je metoda PCR – polymerázová řetězová reakce. Polymerázová řetězová reakce je nejvyužívanější metoda používaná v mnoha odvětvích vědy. Mezi její klady patří potřeba malého množství DNA, vysoká citlivost, která je současně její nevýhodou. Metoda je tak citlivá, že dokáže odhalit jedinou molekulu ve vzorku.

- Pro uchování vzorků je potřeba použít vhodné skladovací médium v kombinaci s teplotou a časem. V našem výzkumu jsme použili 2,5 % dichroman draselný, 70 % etanol, 96 % etanol, RNA later, žádné médium, 4 % formaldehyd a vysušené vzorky.

Po dobu desíti měsíců byly pozitivní všechny vysušené vzorky, ve kterých bylo detekováno *E. cuniculi*, podobně tak bylo ve výzkumu Shadducka et Polley (1978), kdy vzorky se sporami vysušili a inkubovali při teplotě 22 °C při relativní vlhkosti 2 % podobu 28 dní byly infekční. *Encephalitozoon cuniculi* odolává i velmi nízkým teplotám, dle Koudely et al. (1999) jsou spory infekční, i když byly vystaveny teplotě -70 °C po dobu 8 hodin bez kryoprotektiv, schopnost infekce měli spory uložené při teplotách -12 °C a -24 °C po dobu 1, 8 a 24 hodin. V námi zkoumaných vzorcích byly ve všech skladovacích médiích kromě 4 % formaldehydu, při -20 °C po dobu 10 měsíců přítomny spory *E. cuniculi*. To dokazuje, že jsou schopné při této teplotě velmi dobře přežít ne jenom několik hodin, ale i měsíce. DNA *C. parvum* byla přítomna po 10 měsíců při většině zkoumaných teplot v 2,5 % dichromanu draselném a RNA lateru. Ve své studii Fayer et Nerad (1996), ve které se zabývali vlivem nízkých teplot na životaschopnost oocyst *C. parvum*, uchovávali vzorky trusu v 2,5 % dichromanu draselném při teplotě 4 °C po dobu dvou měsíců.

Vysušení nepříznivě ovlivnilo přítomnost *C. parvum*, což také zmiňuje Robertson et al. (1992), který zjistil, že vysychání je pro oocysty devitalizující.

Dichroman draselný byl vhodný jak pro *C. parvum*, tak pro *E. cuniculi*, kdy pomocí PCR byly detekovány při teplotách -20 °C, 4 °C po 10 měsíců. Také v několika dalších studiích je používán 2,5 % dichroman draselný jako skladovací

médium při 4 °C (Hamer et al. 1994; Buraud et al. 1991). Vlivem použití 2,5 % dichromanu draselného a formaldehydu se zabýval Johnson et al. (1995). Ve svém výzkumu došli k závěru, že 2,5 % dichroman draselný může být použit jako vhodné skladovací médium. Zároveň doporučují důkladné promytí vzorku před extrakcí, protože dichroman inhibuje PCR. Formaldehyd jako skladovací médium nedoporučují. Také naše výsledky ukazují, že formaldehyd je nevhodný. *Cryptosporidium parvum* bylo přítomno pouze první až třetí měsíc při -20 °C a při RT první až čtvrtý měsíc a *E. cuniculi* při 4 °C od prvního až do šestého měsíce.

7. Závěr

S ohledem na zjištěné výsledky a fakt, že vzorky získané při terénní práci může obsahovat celou řadu různých stádií patogenních agens, je z ekonomického a praktického hlediska účelné uchovávat vzorky trusu při stejných podmínkách.

- Na základě našeho výzkumu můžeme jako nejvhodnější skladovací médium k odběru trusu v terénu doporučit RNA later a dichroman draselný. Takto fixované vzorky lze skladovat v rozmezí teplot -20 až 21 °C, a to i v případě, kdy není možnost uskladnění v chladničce.
- Uchovávání kryptosporidií a mikrosporidií v 70 % a 96 % etanolu a 4 % formaldehydu je nevhodné.
- Ve vysušených vzorcích nelze detekovat DNA *C. parvum*.

8. Literatura

- ARROWOOD M. J., STERLING C. R. (1987). Isolation of *Cryptosporidium* oocyst and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.*73:314–319.
- ARROWOOD M. J., DONALDSON K. (1996). Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43: 89S
- BECNEL J. J., ANDREADIS T. G. (1999). Microsporidia in insects, 1 - 6. In M. Wittner (ed.), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D. C.
- BLEWETT D. A. (1989) Disinfection and oocysts, in *Proc. 1st Int. Workshop on Cryptosporidiosis*, Angus, K.W.and Blewett, D.A., Eds. Edinburgh, 107–115.
- BOYER D. B., KUCZYNSKA E., FAYER R. (2009). Transport, fate, and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts released from manure and leached through macroporous soil. *Enviro. Geology* 58: 1011–1019.
- BURAU M., FORGET E., FAVENNEC L., BIZET J., GOBERT J. G., DELUOL A. M. (1991). Sexual stage development of cryptosporidia in the caco – 2 cell line. *Infect. Immun.*59: 4610–4613.
- CALI A., KOTLER D. P., ORENSTEIN J. M. (1993). *Septata intestinalis* n. g., n. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol* 40: 101–112.
- CALI A., TAKVORIAN P. M. (2004). The Microsporidia: pathology in man and occurrence in nature. *SE Asian J. Trop. Med. Med.* 35:58–64
- CANNING E. U., LOM J., DYKOVÁ I. (1986). *The microsporidia of vertebrates*. Academic Press, London, United Kingdom. ISBN 0-12-158790-8, p. 340.

- CAPELLA-GUTIERREZ S., MARCET-HOUBEN M., GABALDON T. (2012). Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi . BMC Biol. 10 :47 doi: 10.1186/1741-7007-10-47
- CARRENO R. A., MARTIN D. S., BARTA J. R. (1999). *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitol. Res. 85: 899–904.
- CORLISS J. O. (1994). An interim utilitarian ('user friendly') hierarchical lymphocytes classification and characterization of the protozoa. Acta Protozool. 33: 1–51.
- COUZINET S., CEJAS E., SCHITTNY J., DEPLAZES P., WEBER R., ZIMMERLI S. (2000). Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. Infect. Immun. 68: 135–140.
- CURRENT W., GARCIA L. S. (1991). Cryptosporidiosis. Clin. Microbiol. Rev. 4: 325–358.
- DASCOMB K., FRAZER T., CLARK R. A., KISSINGER P., DIDIER E. (2000). Microsporidiosis and HIV J. acquire. Immune. Defic. Syndr. 24: 290–292.
- DE BOSSCUERE H., WANG Z., ORLANDI P. A. (2007). First diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. hellem* in a European brown hare (*Lepus europaeus*) with kidney lesions. Zoon. Pub. Heal. 54: 131–134.
- DESPORTES I., KE CHARPENTIER Y., GALIAN A., BERNARD F., COCHAND-PRIOU B., ET AL. (1985). Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. J Protozool 32: 250–254.
- DIDIER E. S., WEISS L. M. (2006). Microsporidiosis: current status. Curr. Opin. Infect. Dis. 19: 485–492.
- FAYER R., DUBEY J. P., LINDSAY D. S. (2004): Zoonotic protozoa, from land to sea. Trends Parasitol. 20: 531–536.

- FAYER R., NERAD T. (1996). Effect of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Envi. Micro.* 1431–1433.
- FAYER R., SPEER C. A., DUBEY J. P. (1997). The general biology of *Cryptosporidium*. In Fayer R. (Ed.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRP Press, Boca Raton, FL, pp. 2–33.
- FAYER R., TROUT J. M., JENKINS M. C. (1998). Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 84: 1165–1169.
- FRANZEN C. (2005). How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol.* 52: 36–40.
- FRANZEN C., MÜLLER A. (2001). Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect.* 3: 389–400.
- FRAZEN C., MÜLLER A. (1999a). *Cryptosporidium* and microsporidia – waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34: 245–262.
- FRIXIONE E., RUIZ L., CERBON J., UNDEEN A. H. (1997). Germination of *Nosema algerae* (Microspora) spores: conditional inhibition by D₂O, ethanol and Hg-2+ suggests dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways. *J Eukaryot Microbiol.* 44: 109–116.
- GILL E. E., FAST N. M. (2006). Assessing the microsporidia–fungi relationship: combined phylogenetic analysis of eight genes. *Gene.* 375: 103–109.
- HAMER H. D., WARD H., TZIPORY S., PEREIRA M. E. A., ALROY J. P., KEUSCH G. T. (1994). Attachment of *Cryptosporidium parvum* sporozoites to MDCK cells in vitro. *Am Socie Microbiol.* 62: 2208–2213.
- HARCOURT - BROWN F. M., HOLLOWAY H. K. R. (2003). *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Vet. Rec.* 152: 427–431.

- HARRIS J. R., PETRY F. (1999). *Cryptosporidium parvum*, structural components of the oocyst wall. J. Parasitol. 85: 839–849.
- HARRIS J. R., ADRIAN M., PETRY F. (2004). Amylopectin, a major constituent of the residual body in *Cryptosporidium* oocysts. Parasitology 128: 269–282.
- HASHIMOTO K., SASAKI Y., TAKINAMI K. (1976). Conditions for extrusion of the polar filament of the spore of *Plistophora anguillarum*, a microsporidian parasite in *Anguilla japonica*. Bull Jpn Soc Sci Fish. 42: 837–845.
- HIJAWI N. S., MELONI B. P., MORGAN U. M., THOMPSON R. C. (2001). Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. Int. J. Parasitol. 31: 1048–1055.
- HOFREITER, JAENICKE M., SERRE V., D. ET AL. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. Nucleic Acid Research 29: 4793–4799.
- HŮRKOVÁ L., MODRÝ D. (2003). *Cryptosporidium muris* – původce žaludeční kryptosporidiózy hlodavců. Fakulta veterinárního lékařství Veterinární a farmaceutické university Brno 53: 230–232.
- HUTIN Y. J., SOMBARDIER M. N., LIGUORI O., SARFATI C., DEROUIN F., MODAI J., MOLINA J. M. (1998). Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case – control study. J. Infect. Dis. 178: 904–907.
- JENKINS M. C., TROUT M. J., HIGGINS J., DORSCH M., VEAL D., FAYER R. (2003). Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. Parasitol. Res. 89: 1–5.
- JENKINS M. B., ANGUISH L. J., BOWMAN D. D., WALKER M. J., GHIORSE W. C. (1997). Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocyst. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3844–3850.

- JENKINS M. B., BOWMAN D. D., FOGARTY A. E., GHIORSE W. C. (2003). *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in three soil types at various temperatures and water potentials. *Soil Biol. Bioch.* 34: 1101–1109.
- JIANG J., ALDERISIO K. A., XIAO L. (2005). Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event. water samples from three watersheds in New York. *Appl. Envi. Micro.* 71: 4446–4454.
- KAESTLE F. A., HORSBURGH K. A. (2002). Ancient DNA in anthropology: Methods, applications, and ethics. *Yearbook of physical anthropology.* 45: 92–130.
- KATZWINKEL-WLADARSCH S., LIEB M., HELSE W., LOSCHER T., RINDER H. (1996). Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health* 1: 373–378.
- KEELING P. J., SLAMOVITS C. H. (2004). Simplicity and complexity of microsporidian genomes. *Eukaryot Cell.* 3:1363–1369.
- KEOHANE E. M., WEISS L. M. (1999). The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In: Wittner, M., Weiss, L. M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 196–224.
- KING B. J., KEEGAN A. R., MONIS P. T., SAINT C. P. (2005). Experimental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. *Appl. Envi. Micro.* 71: 3848–3857.
- KOTKOVÁ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., KVÁČ M. (2013). Latent Microsporidiosis Caused by *Encephalitozoon cuniculi* in Immunocompetent Hosts: A Murine Model Demonstrating the Ineffectiveness of the Immune System and Treatment with Albendazole. *Rigorózní práce*, 2.
- KOUDELA B., LOM J., VÍTOVEC J., KUČEROVÁ Z., DITRICH O. (1994). In vivo efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41: 49–50.

- KOUDELA B., KUEROVÁ Z., HUDCOVEC T. (1999). Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitol.* 46: 171–174.
- LI N., XIAO L., WONG L., ZHAO S., ZHAO Y., ET AL. (2012). Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bienusi* by genotyping and subtyping parasites in wastewater. *PLoS Negl Trop. Dis.* 6: e1809.
- LI X., TROUT J.M., JENKINS M.C., PALMER R., FAYER R. (2002). Infectivity of microsporidia spores stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 89: 185–188.
- LOM J. (2002). A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Syst. Parasitol.* 53: 81–99.
- LORES B., LÓPEZ-MIRAGAYA I., ARIAS C., FENOY S., TORRES J., DEL AGUILA C. (2002). Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienusi* in elderly human immunodeficiency virus - negative patients from Vigo, Spain. *Clin Infec. Dis.* 34: 918–921.
- MATHIS A., WEBER R., DEPLOZES P. (2005). Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 423–445.
- 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., ROSE J. B., DAVIS J. P., 1994: A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public watersupply. *N. Eng. J. Med.* 331: 161-167.
- MC LAUGHLIN S. J., KALITA P. K., KUHLENSMIDT M. S. (2013). Fate of *Cryptosporidium parvum* oocyst within soil, water and plant environment. *J. Environ. Manage.* 15: 121– 128.

- MEISEL J. L., PERERA D. R., MELIGRO C., RUBIN C. E. (1976). Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70: 1156–1160.
- MELICHEROVÁ J., ILGOVÁ J., KVÁČ M., SAK B., KOUDELA B., VALIGUROVÁ A. (2014). Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology* 141: 287-303.
- MEUTIN D. J., VAN KRUININGEN H. J., KEIN D. H. (1974). Cryptosporidiosis in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165: 914–917.
- NÄGELI K. W. (1857). Über die neue Krankheit der Seidenraupe und cerwandte Organismen. *Bot. Z.* 15: 760–761.
- NIME F. A., BUREK J. D., PAGE D. L., HOLSCHER M. A., YARDLEY J. H. (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70: 592–598.
- O'DONOGHUE P. J. (1995). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25: 139–195.
- O'ROURKE D. H., HAYES M. G., CARLYLE S. W. (2000). Ancient DNA studies in physical anthropology. *Ann. Rev. Anthro.* 29, 217-242.
- PARK J. S. ET AL. (2009). Haloarchaeal diversity in 23, 121, and 419 MYA salts. *Geobiology* 7: 515-523.
- PANCIERA R. J., THOMASSEN R. W., GARNER F. M. (1971). Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.*, 8: 479–484.
- POINAR H. N. (2003). The top 10 list: criteria of autenticity for DNA from ancient and forensic samples. *Inter. Con. Ser.* 1239: 575–579.
- REDUKER D. W., SPEER C. A., BLIXT J. A. (1985). Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high pressure scanning electron microscopy. *J. Protozool.* 32:708–711.

- ROBERTSON L. A., CAMPBELL A. T., SMITH H. V. (1992). Survival of *Cryptosporidium parvum* oocyst under various enviromental pressures. Appl. Envi. Micro. 58: 3494–3500.
- ROGAN P. K., SALVO J. J. (1990). Study of nucleic acids isolated from ancient remains. Yearbook of Physical Antropology 33: 195–214.
- SAK B., KVÁČ M., KUČEROVÁ Z., KVĚTOŇOVÁ D., SAKOVÁ K. (2011). Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals – a longitudinal study. P.Lo.S. Negl. Trop. Dis. 5: e1162.
- SHADDUCK J. A., POLLEY M. B. (1978). Some factors influencing the in vitro infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi*. J. Protozool. 25: 491–496.
- SHAW R.W. (1999). Fish microsporidia, In M. Wittner (ed.), Microsporidia and microsporidiosis. ASM Press, Washington, D.C. 447–501.
- SCHWARTZ D. A., VISVESVARA G. S., LEITCH G. J., TASHJIAN L., POLLACK M., HOLDEN J., BRYAN R. T. (1993). Pathology of symptomatic microsporidial (*Encephalitozoon hellem*) bronchiolitis in the acquired immunodeficiency syndrome: a new respiratory pathogen diagnosed from lung biopsy, bronchoalveolar lavage, sputum, and tissue culture. Hum Pathol. 24: 937–943.
- SLAVÍN D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). J. Comp. Pathol. 65: 262–270.
- SMITH C. I., CHAMBERLAIN A. T., RILEY M. S., STRINGER C., COLLINS M. J. (2003). The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. J. Hum. Evol. 45: 203–217.
- SUNNOTEL O., LOWERY C. J., MOORE J. E., DOOLEY J. S. G., XIAO L., MILLAR B. C., ROONEY P. J., SNELLING W. J. (2006). Under the microscope: Cryptosporidium. Lett. Appl. Microbiol. 43: 7–16.

- TYZZER E. E. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenkd. 26: 394–412.
- TYZZER E. E. (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 5: 12–13.
- UNDEEN A. H., ALGER N. E. (1976). *Nosema algerae*: infection of the white mouse by a mosquito parasite. Exp. Parasitol. 40: 86–88.
- UNDEEN A. H., AVERY S. E. (1984). Germination of experimentally nontransmissible microsporidia. J. Inv. Pathol. 43 :299–301.
- UNDEEN A. H., EPSKY N. D. (1990). In vitro and vivo germination of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) spores. J. Inv. Pathol. 56 :371–379.
- VÁVRA J., LARSSON J. I. R. (1999). Structure of the microsporidia. In: The microsporidia and microsporidiosis. Wittner M., Weiss L. (Eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D. C., pp. 7–84.
- VOSSBRINCK C. R., MADDOX J. V., FRIEDMAN S., ET AL. (1987). Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. Nature. 326: 411–414.
- WITTNER M., WEISS L. M. (1999). The microsporidia and microsporidiosis. ASM Press. USA, Washington D. C. 533.
- XIAO L., FAYER R., RYAN U., UPTON S. J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin. Micro. Rev. 17: 72 - 97.
- ZAMBRISKI J. A., NYDAM D. V., BOWMAN D. D., BELLOSA M. L., BURTON A. J., LINDEN, T. C., LIOTTA J. L., OLLIVETT T. L., TONDELLO-MARTINS L., MOHAMMED H. O. (2013). Description of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally challenged dairy calves. Parasitol. Res. 112: 1247–1254.