

Biologická fakulta  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích



Bakalářská práce

# **Infektivita *Cryptosporidium andersoni* pro různé druhy hlodavců**

Vypracovala: **Zuzana Ondráčková**

Vedoucí práce: **Ing. Martin Kváč, PhD.**

**České Budějovice 2007**

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích dne 9.5.2007

.....  
Ondráčková Zuzana

**Ondráčková, Z. 2007:** Infektivita *Cryptosporidium andersoni* pro různé druhy hlodavců. [Infectivity of *Cryptosporidium andersoni* for different species of rodents] 42 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

### **Annotation**

The infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* (bovine isolate) for neonatal and adult southern multimammate mice (*Mastomys coucha*) as well as different species of gerbils was studied using transmission experiments. *Cryptosporidium andersoni* isolate used in this study was not infective for BALB/c mice, but experimental infection proved susceptibility of neonatal and adult *M. coucha*, neonatal and adult *M. unguiculatus*, adult *Meriones tristrami*, *Seeketamys calurus* and *Gerbillus gerbillus* to the infection. No signs of clinical illness or macroscopic findings during autopsy were detected in infected animals. Since adult *G. gerbillus* were the most susceptible to *C. andersoni* infection these animals seem to be a useful laboratory model for study of *C. andersoni* infection.

### **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi byli nápomocni při mé práci. Největší dík patří mému školiteli Ing. Martinovi Kváčovi, PhD. za vedení mé práce a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům laboratoře Lékařské a veterinární parazitologie za cenné rady a přátelskou atmosféru. Za poskytnutí experimentálních zvířat děkuji doc. MVDr. Davidovi Modrému, PhD.

Na závěr ještě děkuji rodičům a příteli Petrovi Mítáčkovi za podporu a pomoc při práci. Poděkování patří také kamarádům Honzovi Altmanovi za rady při práci na počítači a Jirkovi Machovi za psychickou podporu.

# Obsah

<b>1. Úvod a historie</b> .....	<b>5</b>
1.1 Taxonomie.....	5
1.2 Morfologie oocyst.....	6
1.3 Vývojový cyklus.....	7
1.4 Žaludeční kryptosporidie savců.....	8
1.4.1 <i>Cryptosporidium andersoni</i> .....	8
1.4.2 <i>Cryptosporidium muris</i> .....	9
1.4.3 Ostatní žaludeční kryptosporidie.....	9
<i>Cryptosporidium galli</i> .....	9
<i>Cryptosporidium serpentis</i> .....	9
<i>Cryptosporidium molnari</i> .....	10
1.5 Žaludeční kryptosporidie u hlodavců.....	10
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>12</b>
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	<b>13</b>
3.1. Purifikace oocyst.....	13
3.1.1 Sacharózový gradient (Arrowood et Sterling 1987).....	13
3.1.2 Cesium-chloridový gradient (Kilani et Sekla 1987).....	14
3.2 Morfometrická analýza.....	15
3.3 Molekulární analýza.....	15
3.4 Experimentální zvířata.....	16
3.5 Experimentální infekce.....	16
3.6 Koprologické vyšetření.....	17
3.6.1 Barvení kryptosporidií (Miláček et Vítovec 1985).....	17
3.7 Vyhodnocení intenzity infekce.....	18
3.8 Histologické vyšetření.....	18
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>19</b>
4.1 Molekulární charakteristika izolátu <i>Cryptosporidium andersoni</i> .....	19
4.2 Morfologie oocyst.....	19
4.3 Dynamika infekce.....	19
4.4 Intenzita infekce.....	24
4.5 Klinické a makroskopické vyšetření.....	28
4.6 Histopatologické vyšetření.....	28
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>30</b>
<b>6. Závěry</b> .....	<b>33</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>34</b>
<b>Přílohy</b> .....	<b>40</b>

# 1. Úvod a historie

Kryptosporidie jsou jednobuněční, celosvětově rozšíření paraziti, kteří infikují převážně epitel sliznice střeva a žaludku celé řady studenokrevných i teplokrevných obratlovců včetně člověka (O'Donoghue 1995). Onemocnění způsobené prvoky rodu *Cryptosporidium* se nazývá kryptosporidióza a je řazeno mezi oportunní infekce a zoonózy. Tito parazitické prvoci jsou nebezpeční zejména pro jedince trpící chronickým onemocněním, malnutricí nebo osoby se sníženou imunitní odpovědí organismu. Pro AIDS pacienty a podvyživené děti může mít kryptosporidióza letální následky (MacFarlane et Horner-Bryce 1987, Manabe et al. 1998). U imunokompetentních jedinců, kdy je onemocnění velmi často provázeno vodnatými průjmy s abdominálními bolestmi a křečemi, dochází k samovyléčení tzv. „self-cure“ nebo „self-limited“ (Chappel et al. 2003).

Kryptosporidie byly poprvé popsány Ernestem Edwardem Tyzzerem v roce 1907, který našel tyto prvoky ve sliznici žaludku laboratorních myší (*Mus musculus*) a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). V roce 1912 popsal tentýž autor další druh kryptosporidií s lokalizací vývojového cyklu v tenkém střevě myší a nazval ho *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912).

## 1.1 Taxonomie

Kryptosporidie jsou řazeny do kmene Apicomplexa. Vzhledem k tomu, že jejich vývojový cyklus probíhá v gastrointestinálním traktu hostitele stejně jako u rodů *Eimeria*, *Isospora* a *Cyclospora*, byly kryptosporidie donedávna začleněny mezi kokcidie (Fayer et al. 1997). Molekulární analýzy však ukázaly bližší příbuznost ke gregarinám než ke kokcidiím (Carreno et al. 1999). V současné době je všeobecně uznáváno 15 platných druhů kryptosporidií (tabulka 1) a bylo popsáno velké množství genotypů, u kterých lze předpokládat, že budou v budoucnu popsány jako samostatné druhy (Xiao 2004).

Tabulka 1. Platné druhy rodu *Cryptosporidium*

Druh	Lokalizace	Hostitel	Citace
<i>C. andersoni</i>	Žláznatý žaludek (abomasum)	Skot	Lindsay et al. 2000
<i>C. bailey</i>	Střevo	Savci	Current et al. 1986
<i>C. canis</i>	Střevo	Psi	Fayer et al. 2001
<i>C. felis</i>	Tenké střevo	Kočky	Iseki 1979
<i>C. galli</i>	Žláznatý žaludek (proventriculum)	Ptáci	Ryan et al. 2003
<i>C. hominis</i>	Tenké a tlusté střevo	Člověk	Morgan-Ryan et al. 2002
<i>C. meleagridis</i>	Respirační trakt, střevo	Ptáci, savci	Slavin 1955
<i>C. molnari</i>	Žaludek, občas střevo	Ryby	Alvarez-Pellitero et Sitja-Bobadilla 2002
<i>C. muris</i>	Žláznatý žaludek	Myš	Tyzzer 1907
<i>C. nasorum</i>	Tenké střevo	Ryby	Levine 1984
<i>C. parvum</i>	Tenké střevo	Myš	Tyzzer 1912
<i>C. pestis</i>	Tenké střevo	Savci	Šlapeta 2007
<i>C. saurophilum</i>	Střevo	Plazi	Koudela et Modrý 1998
<i>C. serpentis</i>	Žaludek	Plazi	Levine et al. 1980
<i>C. suis</i>	Tenké a tlusté střevo	Prase	Ryan et al. 2004
<i>C. wrairi</i>	Střevo	Morče	Vetterling et al. 1971a,b

## 1.2 Morfologie oocyst

Na základě lokalizace endogenních vývojových stádií v hostiteli a morfometrie exogenních stádií (oocyst) je možné v rámci rodu *Cryptosporidium* rozlišit dvě odlišné skupiny kryptosporidií: (i) střevní kryptosporidie, jejichž vývoj je lokalizován ve sliznici střeva hostitele a oocysty jsou kulatého tvaru o velikosti okolo 5  $\mu\text{m}$ . (ii) Druhou skupinou jsou žaludeční kryptosporidie infikující žlázy žláznatých žaludků hostitelů (Morgan et al. 1999b, Xiao et al. 2000); oocysty jsou oválné a větší okolo 7  $\mu\text{m}$ . U této skupiny kryptosporidií, probíhá vývoj také extraintestinálně (v burze Fabricii, dýchacím ústrojí ptáků) u *C. bailey* (Current et al. 1986, Pavlásek 1993, Morgan et al. 2001).

### 1.3 Vývojový cyklus

Vývojový cyklus probíhá u všech zástupců rodu *Cryptosporidium* shodně, s výjimkou druhu *Cryptosporidium baileyi*. Parazit je přenášen z hostitele na hostitele fekálně-orální cestou. Oocysty sporulují endogenně a spolu s trusem se dostávají do vnějšího prostředí jako plně infekční. Kryptosporidie během svého vývoje nikdy nepronikají do buněčné cytoplazmy, jsou lokalizovány intracelulárně a extraplazmaticky a kromě pohyblivých sporozoitů, merozoitů a mikrogamet zůstávají uzavřeny v parazitoforní vakuole v prostoru mikroklků hostitelské buňky. Během vývojového cyklu v hostiteli rozeznáváme čtyři fáze vývojového cyklu: excystace, merogonie, gametogonie, sporogonie.

Pozřené oocysty se dostávají do gastrointestinálního nebo respiračního traktu, kde excystují a uvolnění sporozoiti napadají epiteliální buňky. Následuje asexuální množení-merogonie, při němž vznikají dva typy morfologicky odlišných merontů. První typ obsahuje 6-8 merozoitů, druhý typ 4 merozoity. Merozoity II. typu vznikají ve druhé fázi merogonie. Poté následuje pohlavní rozmnožování, nebo-li gametogonie, kde se z merozoitů II. typu tvoří gamonty, samčí mikrogamonty a samičí makrogamonty. Mikrogamety vzniklé z mikrogamontů oplodňují samičí makrogamety vzniklé z makrogamontů a dochází k formování zygoty. Zygota prochází meiosisou (sporogonií) a uvnitř se formují 4 sporozoity. Výsledkem sporogonie je zralá oocysta. Asi 80 % oocyst má silnou stěnu. Formují se poté, co je dokončen vývojový cyklus a odcházejí z hostitele spolu s trusem. Přibližně 20 % oocyst je tenkostěnných, tyto excystují v hostiteli a jsou zdrojem autoinfekce (Tyzzer 1910, Tyzzer 1912, Uni et al. 1987).

Jak již bylo dříve uvedeno, *C. baileyi* se liší vývojovým cyklem od ostatních druhů, má tři generační typy merontů. První generace merontů obsahuje osm merozoitů; druhá generace obsahuje čtyři merozoity; třetí generace obsahuje osm merozoitů (Current et al. 1986).

## 1.4 Žaludeční kryptosporidie savců

### 1.4.1 *Cryptosporidium andersoni*

Jsou známy dva odlišné velikostní „kmeny“. Upton a Current (1985) uvádějí velikost oocyst izolovaných ze skotu 7,4×5,6 μm. Oocysty *C. andersoni*, které popsal Lindsay et al. (2000) v USA a Kváč and Vítovec (2003) v České republice, měly rozměry 8,4×6,2 μm, což je bližší rozměrům *C. muris*. Uvnitř oocysty jsou čtyři sporozoiti a výrazné reziduální tělísko. Stěna oocysty je tenká (méně než 1 μm) a hladká, na jednom z pólů je lokalizována sutura sloužící k excystaci sporozoitů.

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

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

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

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



U dalších hlodavců byla vnímavost zatím popsána pouze u pískomila mongolského (*Meriones unguiculatus*) (Koudela et al. 1998) a u myši z čeledi myšovitých (*Mastomys coucha*) (Kváč et al. 2007). V roce 2001 byla infekce prokázána u HIV pozitivního pacienta ve Francii (Guyot et al. 2001).

U zvířat ani u lidí nebyly dosud zaznamenány klinické příznaky doprovázející infekci *C. andersoni* s výjimkou skotu, kde žaludeční kryptosporidióza může být doprovázena poklesem produkce mléka a nižšími váhovými přírůstky (Esteban et Anderson 1995).

#### **1.4.2 *Cryptosporidium muris***

Plně vysporulované oválné oocysty měří okolo  $8,4 (7,5-9,8) \times 6,3 (5,5-7,0) \mu\text{m}$  (Iseki et al. 1986). Typickými hostiteli *Cryptosporidium muris* jsou hlodavci z čeledi myšovitých (*Muridae*) a křečkovitých (*Criceridae*). Experimentální transmisní studie ukázaly, že izoláty *C. muris* z laboratorních myši jsou infekční i pro jiná zvířata, včetně psů, morčat, králíků, jehňat a pískomilů (Fayer 1990). Přirozená infekce byla popsána i u damana (*Procapra capensis*) ze ZOO (Fayer et al. 1997) a u velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) s chronickou kryptosporidiózou (Tzipori et Griffiths 1998, Anderson et al. 1991). Dnes jsou známy také přirozené infekce *C. muris* u člověka (Fayer 1997). Dřívější práce, uvádějící jako hostitele *C. muris* také skot, se zřejmě týkají *C. andersoni*.

#### **1.4.3 Ostatní žaludeční kryptosporidie**

##### ***Cryptosporidium galli***

Přirozená infekce druhem *C. galli* byla poprvé popsána u uhynulé 17-ti měsíční slepice (*Gallus gallus*), průměrná velikost oocyst byla  $8,0 \times 6,4 \mu\text{m}$  (Pavlásek 1999). *Cryptosporidium galli* infikuje proventriculus ptáků. Klinicky se infekce projevuje akutním průjmem s vysokou mortalitou (Blagburn et al. 1990, Lindsay et al. 1991, Morgan et al. 2001).

##### ***Cryptosporidium serpentis***

První nálezy oocyst rodu *Cryptosporidium* u hadů popsali Brownstein et al. (1977). Experimentálně infikovali 14 druhů plazů, ale vzhledem k tomu, že zkřížený přenos mezi těmito druhy byl neúspěšný, pravděpodobně se mohlo jednat o víc druhů. V roce 1980 popsal

Levin kryptosporidie infikující žaludek hadů a nazval je *Cryptosporidium serpentis*. Oocysty *C. serpentis* měří 6,2×5,3 μm (Tilley et al. 1991). Infekce *C. serpentis* je u hadů velmi často doprovázena klinickými příznaky onemocnění, naopak u ještěrek probíhá kryptosporidióza způsobená *C. serpentis* většinou inaparentně (Fayer et al. 1997, 2000). Byly také objeveny malé genetické rozdíly mezi izoláty z hadů a ještěrek (Xiao et al. 1999).

### ***Cryptosporidium molnari***

Tento druh byl popsán u dvou druhů kostnatých ryb (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*) v roce 2002 (Pilar Alvarez-Pellitero et Ariadna Sitja-Bobadilla). Oocysty byly lokalizovány v epitelu žaludeční sliznice a epitelu tenkého střeva. Velikost oocyst je 4,7×4,5 μm.

## **1.5 Žaludeční kryptosporidie u hlodavců**

Kryptosporidiózu u hlodavců popsal Tyzzer (1907, 1910) na počátku historie výzkumu kryptosporidií. Od té doby byla zjištěna u 32 druhů hlodavců. Jedná se o čtyři zástupce rodu: *C. parvum*, *C. muris*, *C. wrairi* a *C. andersoni*. Přičemž *C. parvum* infikuje největší spektrum savčích hostitelů (O'Donogue 1995) z toho byla nalezena u 30 druhů hlodavců. Infekce *C. wrairi* byla zatím popsána jen u morčete domácího (*Cavia aperea*). Spektrum hostitelů žaludečních kryptosporidií *C. muris* a *C. andersoni* je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2. Spektrum hostitelů *Cryptosporidium muris* a *Cryptosporidium andersoni*

Přirozený hostitel	Experimentální hostitel	Citace
<b><i>Cryptosporidium muris</i></b>		
Myš	Myš ( <i>Mus musculus</i> )	Tyzzler 1907
	Potkan ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Iseki 1979
Potkan	Myš ( <i>Mus musculus</i> )	Iseki et al. 1989
	Morče ( <i>Cavia</i> sp.)	Iseki et al. 1989
	Králík ( <i>Oryctolagus</i> sp.)	Iseki et al. 1989
	Kočka ( <i>Felis</i> sp.)	Iseki et al. 1989
Velbloud	Pes ( <i>Canis</i> sp.)	Iseki et al. 1989
	Myš ( <i>Mus musculus</i> )	Anderson 1991
	Potkan ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Aydin et Özkul 1996
Myš	Pískomil ( <i>Meriones unguiculatus</i> )	Aydin et Özkul 1996
	Morče ( <i>Cavia</i> sp.)	Aydin et Özkul 1996
	Králík ( <i>Oryctolagus</i> sp.)	Aydin et Özkul 1996
	Pes ( <i>Canis</i> sp.)	Aydin et Özkul 1996
Hraboš ( <i>Clethrionomys glareolus</i> )		Chalmers et al. 1997
Křečík	Myš ( <i>Mus musculus</i> )	Pavlásek 1999
Daman	Daman ( <i>Procapra capensis</i> )	Fayer et al. 1997
Kočka		Pavlašek et Ryan 2007
Opice ( <i>Macaca fascicularis</i> )		Xiao et al. 2004
Tuleň ( <i>Phoca hispida</i> )		Santin et al. 2005
Burunduk ( <i>Eutamias sibiricus</i> )		Hůrková et al. 2003
Člověk		Gatai et al. 2002
<b><i>Cryptosporidium andersoni</i></b>		
Skot	Skot ( <i>Bos taurus</i> )	Kváč (osobní sdělení)
	Mastomyš ( <i>Mastomys coucha</i> )	Kváč et al. 2007
Velbloud ( <i>Camelus bactrianus</i> )		Ryan et al. 2003
Svišt ( <i>Marmota bobac</i> )		Ryan et al. 2003
Zubr ( <i>Bison bonasus</i> )		Ryan et al. 2003
Člověk		Guyot et al. 2001
<b><i>Genotypy žaludečních kryptosporidií</i></b>		
Opice ( <i>Macaca fascicularis</i> )		Dubey et al. 2002
Skot	Pískomil ( <i>Meriones unguiculatus</i> )	Koudela et al. 1998
Gazela ( <i>Gazella gazella</i> )		Pospischil et al. 1987
Kojot ( <i>Canis latrans</i> )		Trout et al. 2006

## 2. Cíle práce

1. Zpracovat kriticky literární rešerši o tématu.
2. V experimentu sledovat dynamiku infekce *C. andersoni* pro hlodavce z podčeledi *Gerbillinae*.
3. Na základě výsledků (bod 2.) vybrat nejvhodnější druh pískomilů jako modelový organismus.

### 3. Materiál a metodika

#### 3. Izolát

Použitý izolát *Cryptosporidium andersoni* pocházel z dvouleté krávy Holštýnského plemene z chovu Černý Dub.

#### 3.1. Purifikace oocyst

Vzorek trusu byl rozmělněn v třecí misce a převeden přes sítko do 100 ml zkumavky a centrifugován při 1350 g po dobu 20 minut, následovalo odsátí supernatantu. Následně byl sediment obsahující oocysty kryptosporidií přečištěn na sacharózovém gradientu (Arrowood et Sterling 1987) a cesium-chloridovém gradientu (Kilani et Sekla 1987).

##### 3.1.1 Sacharózový gradient (Arrowood et Sterling 1987)

*Použité roztoky:*

Sheaterův roztok: 259 ml vody  
405 g cukru  
7,29 g fenolu

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

Pracovní Sheaterův roztok: 1 + 2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween)  
1 + 4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

*Pracovní postup:*

1. zbavit trus hrubých nečistot přecezením přes sítko
2. navrstvit sacharózový gradient 30 ml roztoku 1 + 2; 30 ml roztoku 1 + 4; 15 ml vzorku
3. centrifugovat 30 minut při 1370 g
4. odsát vodní vývěvou čistou vrstvou supernatantu a převést celý supernatant do čisté zkumavky

5. doplnit objem deionizovanou vodou
6. centrifugovat 20 minut při 1370 g
7. odsát vodní vývěvou ½ supernatantu a doplnit objem deionizovanou vodou
8. krok 6 a 7 opakovat 3×
9. purifikované oocysty kryptosporidií (sediment) uchovávat ve tmě při 4 °C

### 3.1.2 Cesium-chloridový gradient (Kilani et Sekla 1987)

#### *Použité roztoky:*

Zásobní roztoky: roztok A: 1,8 g/ml CsCl  
roztok B: 50 mM Tris a 10 mM EDTA, pH 7,2

Pracovní roztoky: roztok C: 1 díl roztoku A + 1 díl roztoku B  
roztok D: 1 díl roztoku A + 7 dílů roztoku B  
roztok E: 1 díl roztoku A + 15 dílů roztoku B

#### *Pracovní postup:*

1. do 50 ml zkumavek (typ Falcon) napipetovat 8 ml roztoku C
2. převrstvit 10 ml roztoku D, 10 ml roztoku E a 5-8 ml promyté suspenze oocyst (výsledek po sacharózovém gradientu) resuspendovaných v roztoku B
3. centrifugovat při 12000 g 1 hodinu
4. oocysty kryptosporidií, koncentrovány mezi roztoky D a E, sesbírat a zředit 2 díly vody
5. centrifugovat 20 minut při 1370 g
6. vodní vývěvou odstranit první 1/3 supernatantu a suspenzi doplnit deionizovanou vodou
7. vzorek centrifugovat 20 minut při 1370 g
8. zopakovat 3× bod 6 a 7
9. purifikované kryptosporidie uchovávat ve tmě při 4 °C

### 3.2 Morfometrická analýza

Velikost oocyst *C. andersoni* byla změřena pomocí digitální analýzy obrazu (software M.I.C. Quick Photo Pro v.2.0 software, Olympus Camedia C-5060 WIDEZOOM, 5.1 pixels digitální kamera; mikroskop Olympus IX70; zvětšení 1000×). Byla měřena délka a šířka oocyst a byl vypočítán index tvaru. Byla provedena morfometrická analýza původního izolátu (n=50) a oocyst izolovaných z vnímaných druhů experimentálních zvířat 30. den po infekci (n=50).

### 3.3 Molekulární analýza

Celková DNA byla extrahována z 50 µl suspenze po přečištění vzorku sacharózovým a cesium chloridovým gradientem pomocí kitu DNeasy Tissue Kit (Quiagen, Valencia, Kalifornie). Byl použit nested PCR protokol pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rDNA). PCR produkt byl amplifikován pomocí primární PCR za použití primerů 5'-TCTAGAGCTAATACATGCG-3' a 5'-CCTAATCCTTCGAAACAGGA-3' (Xiao et al. 1999). PCR reakce obsahovala 2,5 µl PCR pufru (Top-Bio, Praha, Czech Republic), 64 µM dNTP (každého) (Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany), 0,3 U Taq (Top-Bio), 20 nM každého primeru a 0,5 µl DNA do celkové 25 µl reakce. Celkem bylo provedeno 35 cyklů skládajících se z denaturace 94 °C po 45 s, annelingu 55 °C po 45 s a extenze 72 °C po 60 s, počáteční denaturace 94 °C po 45 s a finální extenze 72 °C 7 minut. Sekundární PCR reakce: sekundární PCR produkt byl amplifikován za použití 2 µl primárního PCR produktu primerů 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' a 5'-AGGAGTAAGGAACAACC TCCA-3' (Jiang et al. 2005) PCR mix byl totožný s primární PCR.

U skupiny mastomyší (*M. coucha*) byl použit PCR protokol dle Satoh et al. (2003), za použití primerů 5'-AACTTTACGGATCGCATCTCTGA-3' a 5'-CCCATCACGATGCATCTCATAA-3'. PCR reakce obsahovala 2,5 µl PCR pufru 10× obsahujícího 15 mM MgCl<sub>2</sub> (Top-Bio, Praha, Czech Republic), 200 nM dNTP (každého) (Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany), 1.0 U Taq (Top-Bio) a 100 nM každého primeru a 1 µl DNA v celkovém objemu 25 µl reakce. PCR protokol: prvních 5 cyklů se skládalo z denaturace 94 °C po 60 s, annelingu 44 °C po 90 s a extenze 72 °C po 120 s, následovalo 25 cyklů denaturace 94 °C po

60 s, annealing 48 °C po 90 s a extenze 72 °C po 120 s. Počáteční denaturace byla 95 °C 5 minut a finální extenze 72 °C 10 minut.

Výsledný PCR produkt (799 bp, respective 1207 bp bez primerů) byl detekován na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (320 nm). Získaný PCR produkt byl sekvenován z obou stran za použití primerů pro sekundární PCR reakci v celkovém objemu 15 µl (BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem, Forest City, California) na ABI3130 sekvenátoru (Applied Biosystem). Sekvence byly uspořádány a komplementovány pomocí programu DNA SeqMan 5.06 program (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin). Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi v GenBank.

Ze všech pozitivní zvířat byly 30. DPI vyizolovány oocysty *C. andersoni* a byla provedena kontrolní genotypizace pomocí výše uvedených metod.

### 3.4 Experimentální zvířata

Pro experimentální infekce byla použita následující zvířata: *Meriones tristrami*, *Meriones unguiculatus*, *Gerbillus gerbillus*, *Sekeetamys calurus*, *Mastomys coucha*. Zvířata byla získána z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně. V experimentálních pokusech bylo použito deset 8-týdenních a deset 7-denních *Mastomys coucha*, osm 8-týdenních a osm 7-denních *Meriones unguiculatus*, 10 dospělých jedinců *Gerbillus gerbilus* (věk 2-4 měsíce) pět dospělých jedinců *Sekeetamys calurus* (věk 2-4 měsíce) a čtyři dospělci *Meriones tristrami* (věk 2-4 měsíce), jako kontrola bylo použito deset 8-týdenních a deset 7-denních BALB/c myši (ANLAB).

Pokusná zvířata byla rozdělena podle druhů a pohlaví a umístěna do plastových nádob. Neonatální zvířata byla do věku 8 týdnů chována spolu s matkou, následně byla rozdělena dle pohlaví. Zvířata byla krmena komerční granulovanou směsí pro hlodavce a napájena *ad-libitum*.

### 3.5 Experimentální infekce

Každé zvíře bylo infikováno per-orálně jícní sondou dávkou  $1 \times 10^6$  oocyst *C. andersoni*. Pro snadnější manipulaci byla zvířata předem uspána inhalační éterovou narkózou.



### 3.6 Koprologické vyšetření

Vzorky trusu byly odebírány denně od 10. dne po infekci až do prvního záchytu oocyst v trusu, následně byly vzorky odebírány každý druhý den. Přítomnost kryptosporidií v trusu infikovaných zvířat byla zjišťována specifickou barvicí metodou - barvení anilin-karbol-methyl-violetí s dobarvením tartrazinem (Miláček et Vítovec 1985).

#### 3.6.1 Barvení kryptosporidií (Miláček et Vítovec 1985)

*Použité roztoky:*

Roztok methylvioletí:	methylviolet'	0,6 g
	anilin	1 ml
	fenol	1 g
	96% ethanol	30 ml
	deionizovaná voda	70 ml

Kyselina sírová: 2% vodný roztok

Tartrazin: 1% tartrazin v 1% kyselině octové

*Pracovní postup:*

1. tenký nátěr trusu na podložním skle fixovat methanolem v plameni
2. barvit methylvioletí po dobu 30 minut
3. opláchnout slabým proudem vody
4. nátěr diferencovat v kyselině sírové po dobu 1-2 minuty
5. opláchnout slabým proudem vody
6. dobarvit tartrazinem po dobu 1-2 minuty
7. opláchnout slabým proudem vody
8. po zaschnutí prohlížet světelným mikroskopem při zvětšení 1000×

### 3.7 Vyhodnocení intenzity infekce

Bylo zjišťováno množství trusu (v gramech), které bylo použito pro pořízení nátěru. Váha trusu byla získána jako rozdíl hmotnosti trusu natřeného na sklíčku a odečtením hmotnosti čistého sklíčka. Byly spočítány všechny oocysty na sklíčku, přičemž při vysoké intenzitě infekce byl spočten počet oocyst ve 30 náhodných zorných polích při zvětšení 1000×. Ze zjištěných údajů (hmotnost trusu, počet zorných polí na sklíčku a počet oocyst na sklíčku) byla odhadnuta intenzita infekce a vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu (OPG).

### 3.8 Histologické vyšetření

Tři zvířata z každé skupiny byla usmrcena 30. den po infekci (DPI), ostatní jedinci byli usmrceni 90. DPI, kromě pískomilů druhů *Meriones tristrami* a *Sekeetamys calurus*, kteří byli utraceni všichni 37. DPI z důvodů malého množství pokusných zvířat. Zažívací trakt všech experimentálních zvířat byl makroskopicky posouzen a pro histologické vyšetření byly odebrány vzorky žaludku (žláznatá a nežláznatá část), tenkého střeva (duodenum, jejunum a ileum), tlustého střeva (caecum a colon).

*Pracovní postup histologického zpracování materiálu:*

1. vzorky tkání ihned po jejich získání fixovat 4% formaldehydem
2. vzorky odvodnit vzestupnou alkoholovou řadou (30, 70, 80, 96, 100% ethanol), 100% xylenem, v každé části alkoholové řady vzorky ponechat 60 minut, v xylenu 90 minut
3. prosytit odvodněné tkáně ve 100% histoplastu po dobu 24 hodin při teplotě 58 °C
4. z jednotlivých vzorků zhotovit histologické bločky a řezy o tloušťce 5 µm
5. řezy odparafinovat xylenem a sestupnou řadou ethanol-voda
6. řezy barvit
  - hematoxylinem-eosinem
  - Wolbachovou modifikací Giemsova barvení
  - druhově nespecifickou fluorescenční protilátkou proti stěně oocyst kryptosporidií (*Cryptosporidium* IF Test, Crypto cel, Medac)

## 4. Výsledky

### 4.1 Molekulární charakteristika izolátu *Cryptosporidium andersoni*

Částečné sekvence 18S rDNA (1207 bp a 799 bp bez primerů) původního bovinní izolátu *C. andersoni* použitého k experimentálním infekcím a sekvence získané po izolaci z infikovaných zvířat 30. den po infekci (DPI) byly identické se sekvencí *C. andersoni* uloženou v GenBank (AB089285).

### 4.2 Morfologie oocyst

Oocysty *C. andersoni* izolované 30. DPI z trusu experimentálně infikovaných zvířat byly morfometricky shodné s původně použitým bovinním izolátem (7,7 (6,8-8,5) × 6,2 (5,6-6,9) μm (n=6×50)).

### 4.3 Dynamika infekce

Prepatentní perioda u zvířat vnímavých k infekci *C. andersoni* se pohybovala v rozmezí od 19 do 25 DPI a lišila se v závislosti na věku a druhu zvířat (tabulka 3). U zvířat infikovaných ve věku 7 dní (*M. coucha* a *M. unguiculatus*) byla zjištěna delší prepatentní perioda (23 DPI) než u jedinců stejného druhu, kteří byli infikováni ve věku 8 týdnů (19 DPI) (tabulka 3). U dospělých pískomilů druhu *G. gerbillus* byla zjištěna prepatentní perioda 19 DPI, naopak u druhů *S. calurus* a *M. tristrami* byla pozorována delší prepatentní perioda (25 DPI) (tabulka 3).

Patentní perioda u obou věkových skupin *M. coucha* se nelišila (46-59 DPI). Naproti tomu u dvou různých věkových skupin pískomilů druhu *M. unguiculatus* byl zjištěn výrazný rozdíl v patentní periodě v závislosti na věku zvířat. U jedinců *M. unguiculatus* infikovaných ve věku 7 dní nedošlo během 90-ti denního sledování k vyléčení většiny sledovaných zvířat (75 %). Oproti tomu, u skupiny 8-týdenních pískomilů jsme zaznamenali patentní periodu v rozmezí 58-65 DPI, pouze u jednoho zvířete byla zjištěna přetrvávající infekce (více než 90 DPI). Pískomilové druhu *G. gerbillus* vylučovali oocysty *C. andersoni* po celou dobu pozorování. U druhů *M. tristrami* a *S. calurus* nebyla patentní perioda z důvodu malého množství pokusných zvířat sledována.

Námi použitý izolát *C. andersoni* nebyl infekční pro BALB/c myši obou věkových kategorií.

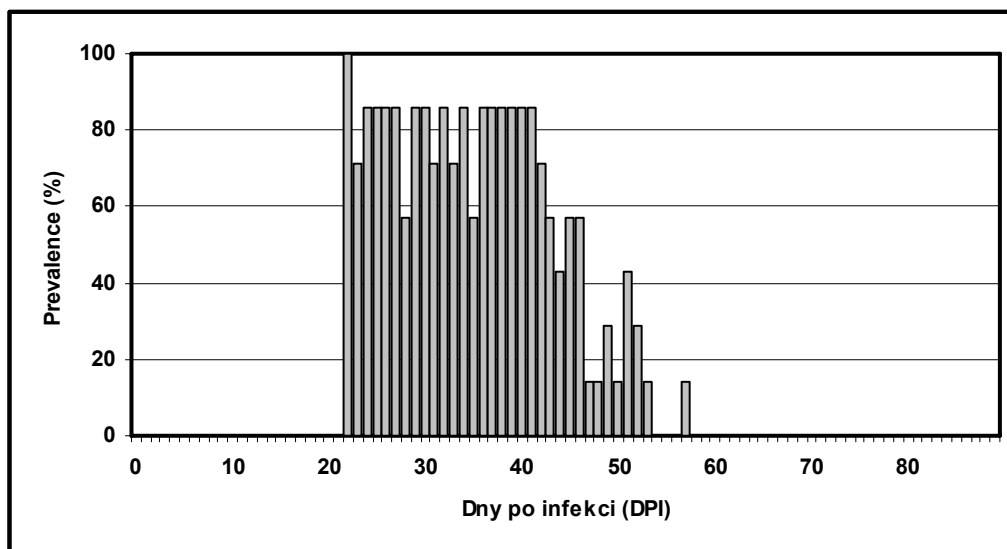
Tabulka 3. Prepatentní a patentní perioda u experimentálně infikovaných druhů zvířat

<b>Druh</b>	<b>Věk při infekci</b>	<b>Prepatentní perioda</b>	<b>Patentní perioda</b>
<i>Mastomys coucha</i>	7 dní	23	48-59
<i>Mastomys coucha</i>	8 týdnů	19	46-59
<i>Meriones unguiculatus</i>	7 dní	23	>90
<i>Meriones unguiculatus</i>	8 týdnů	19	58-65 (>90)
<i>Meriones tristrami</i>	> 8 týdnů	25	N
<i>Seeketamys calurus</i>	> 8 týdnů	25	N
<i>Gerbillus gerbillus</i>	> 8 týdnů	19 (13)	>90
<i>Mus musculus</i> (BALB/c)	7 dní	0	0
<i>Mus musculus</i> (BALB/c)	8 týdnů	0	0

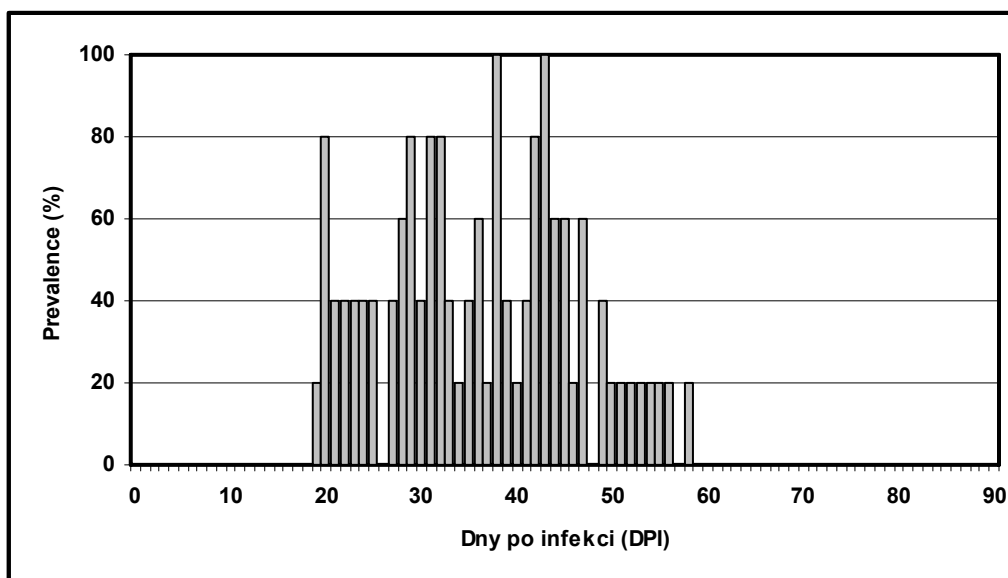
> 8 týdnů přesný věk zvířat nebyl znám (dospělí jedinci); N - z důvodu malého počtu jedinců nebyla patentní perioda sledována; > 90 - vylučování oocyst do konce experimentu (90 DPI),

Nebyl zjištěn výrazný rozdíl v průměrné prevalenci v prvních dvou týdnech patentní periody (75-100 %) u jednotlivých experimentálních skupin (grafy 1-7), s výjimkou skupiny 8-týdenních *M. coucha*, kde se průměrná prevalence pohybovala okolo 40 % (graf 2).

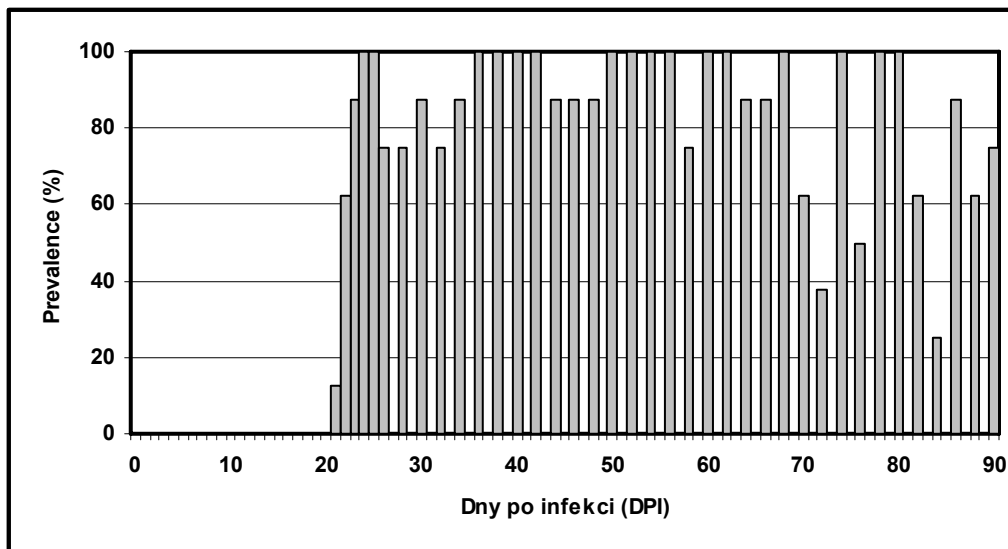
Graf 1. Průběh dynamiky infekce u skupiny 7-denních *Mastomys coucha*



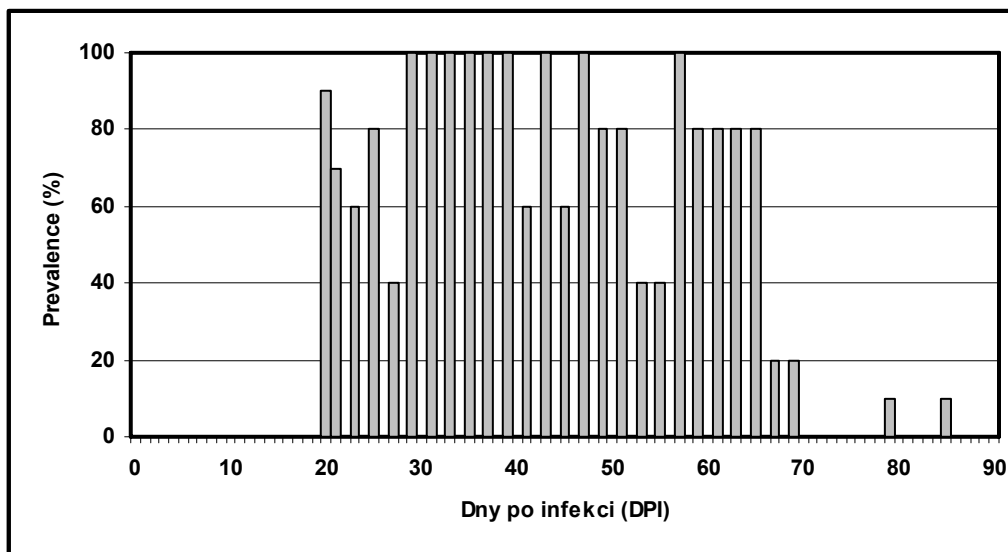
Graf 2. Průběh dynamiky infekce u skupiny 8-týdenních *Mastomys coucha*



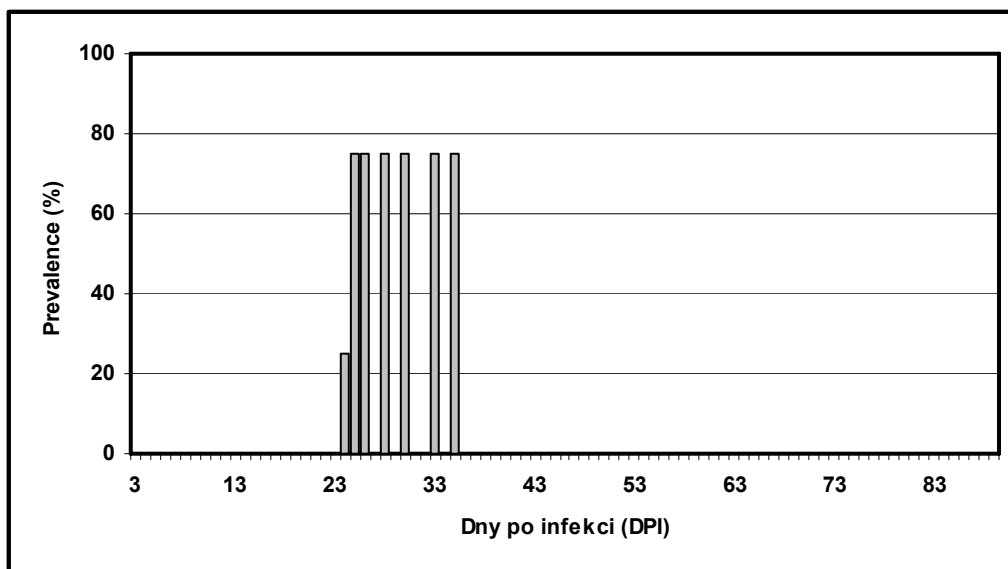
Graf 3. Průběh dynamiky infekce u skupiny 7-denních *Meriones unguiculatus*



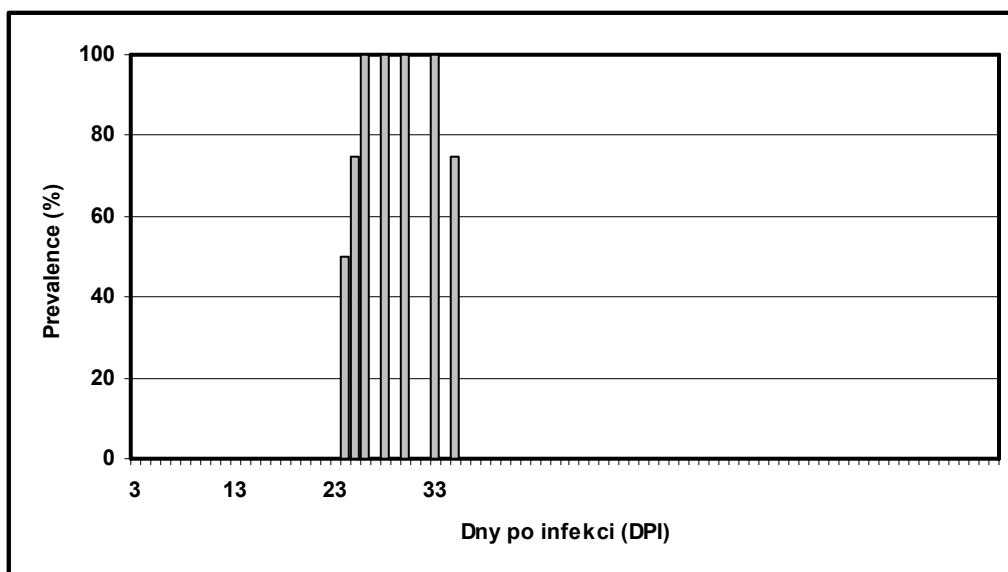
Graf 4. Průběh dynamiky infekce u skupiny 8-týdenních *Meriones unguiculatus*



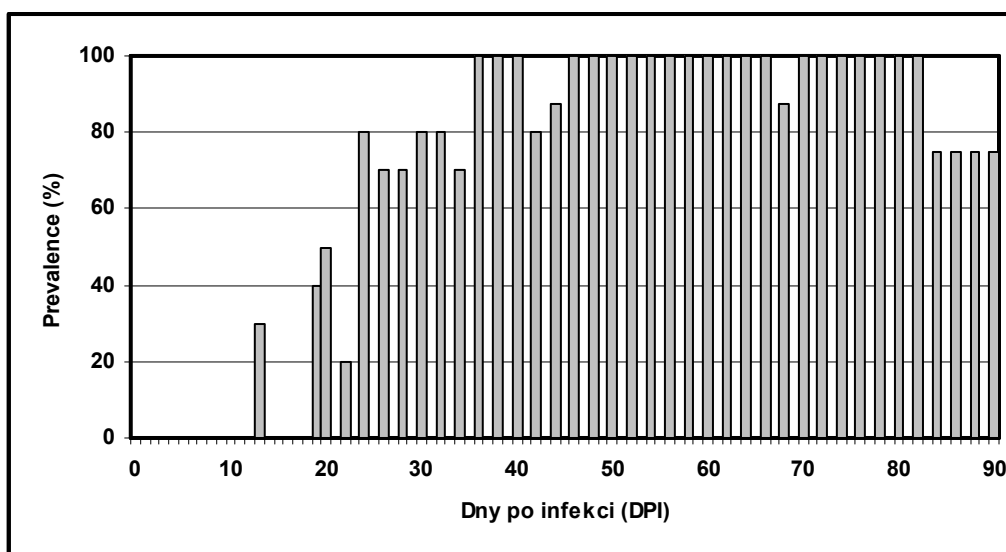
Graf 5. Průběh dynamiky infekce u skupiny *Meriones tristrami*



Graf 6. Průběh dynamiky infekce u skupiny *Seeketamys calurus*



Graf 7. Průběh dynamiky infekce u skupiny *Gerbillus gerbillus*



#### 4.4 Intenzita infekce

Byly zjištěny rozdíly v intenzitě infekce v závislosti na druhu a věku infikovaných zvířat (tabulka 4). Z výsledků vyplývá, že zvířata, která byla infikována jako neonatální (7 dní věku) byla více vnímavá k infekci *C. andersoni* než dospělí jedinci stejného druhu (grafy 8-11). Zejména u druhu *M. unguiculatus* byla vnímavost k infekci v závislosti na věku velmi výrazná (grafy 10 a 11).

U druhů pískomilů *S. calurus* a *M. tristrami* byla zjištěna průměrná intenzita infekce okolo  $1 \times 10^5$  až  $3 \times 10^5$  OPG, z důvodu malého počtu zvířat nebylo možné sledovat průběh infekce po dobu 90 dnů.

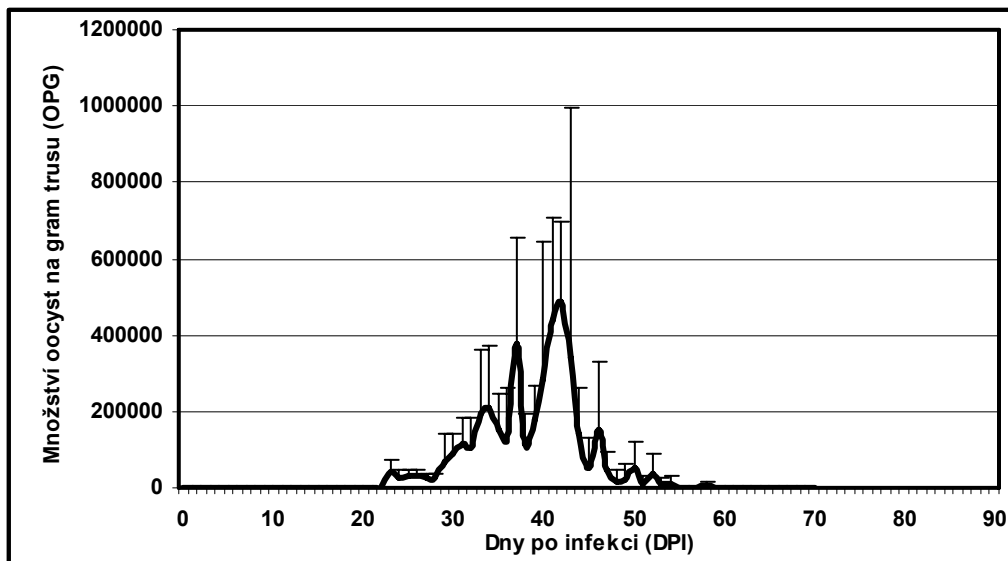
Nejvíce vnímavým druhem byl *G. gerbillus* s průměrnou intenzitou infekce  $2,5 \times 10^5$  OPG po celou dobu experimentu (graf 12). Za pozornost stojí, že zatímco u ostatních druhů vnímavých hostitelů (*M. unguiculatus* a *M. coucha*) infikovaných v dospělém věku došlo u většiny jedinců v průběhu sledování ke spontánnímu vyléčení kryptosporidiózy, u druhu *G. gerbillus* byl pozorován pozvolný vzestup intenzity infekce po celou dobu sledování s nejvyšší zaznamenanou intenzitou infekce  $1,5 \times 10^6$  OPG 90. DPI (graf 12).



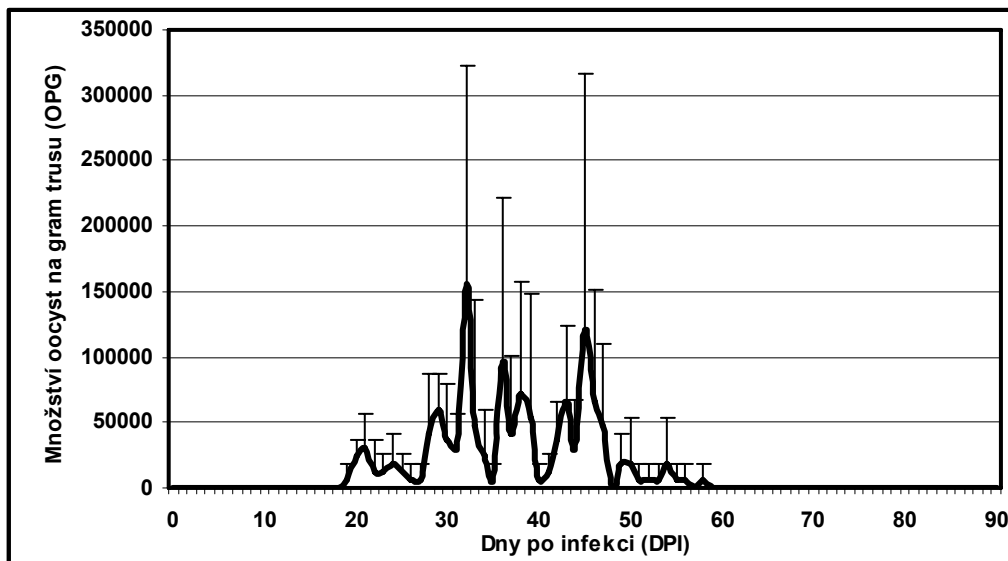
Tabulka 4. Srovnání intenzity infekce jednotlivých druhů experimentálně infikovaných zvířat

Druh	Věk při infekci	Nejvyšší zjištěná intenzita infekce	
		OPG	DPI
<i>Mastomys coucha</i>	7 dní	$4,9 \times 10^5$	42
<i>Mastomys coucha</i>	8 týdnů	$1,6 \times 10^5$	32
<i>Meriones unguiculatus</i>	7 dní	$3,2 \times 10^5$	54 a 70
<i>Meriones unguiculatus</i>	8 týdnů	$9,9 \times 10^3$	36
<i>Meriones tristrami</i>	> 8 týdnů	$3,1 \times 10^5$	29
<i>Seeketamys calurus</i>	> 8 týdnů	$1,9 \times 10^5$	29
<i>Gerbillus gerbillus</i>	> 8 týdnů	$6 \times 10^5$	90
<i>Mus musculus</i> (BALB/c)	7 dní	0	0
<i>Mus musculus</i> (BALB/c)	8 týdnů	0	0

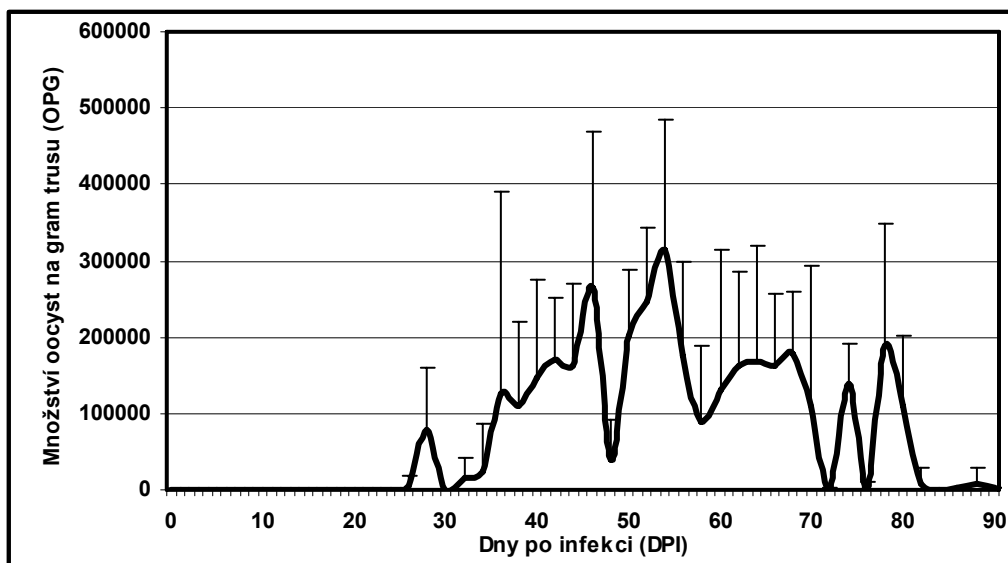
Graf 8. Intenzita infekce u 7-denních *Mastomys coucha*



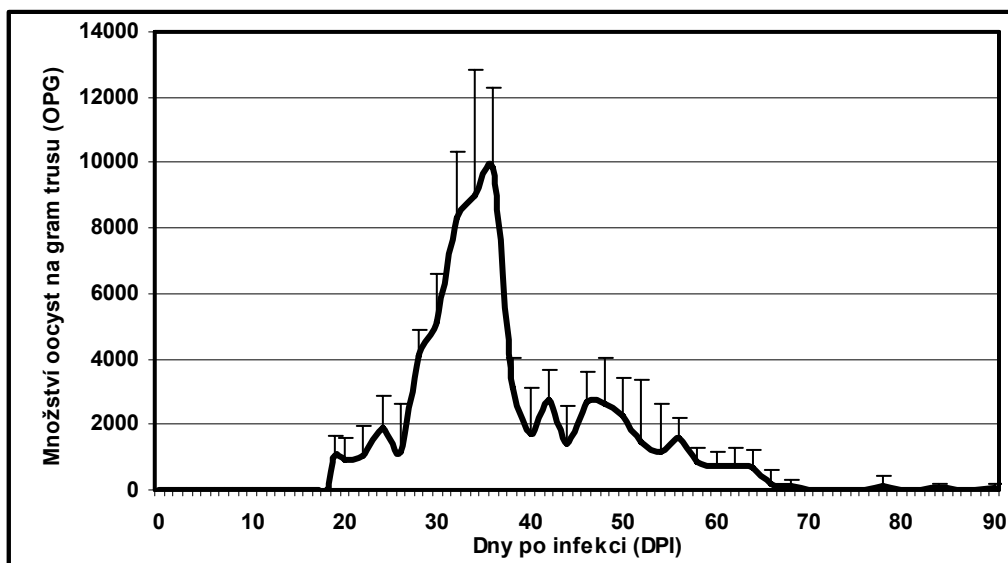
Graf 9. Intenzita infekce u 8-týdenních *Mastomys coucha*



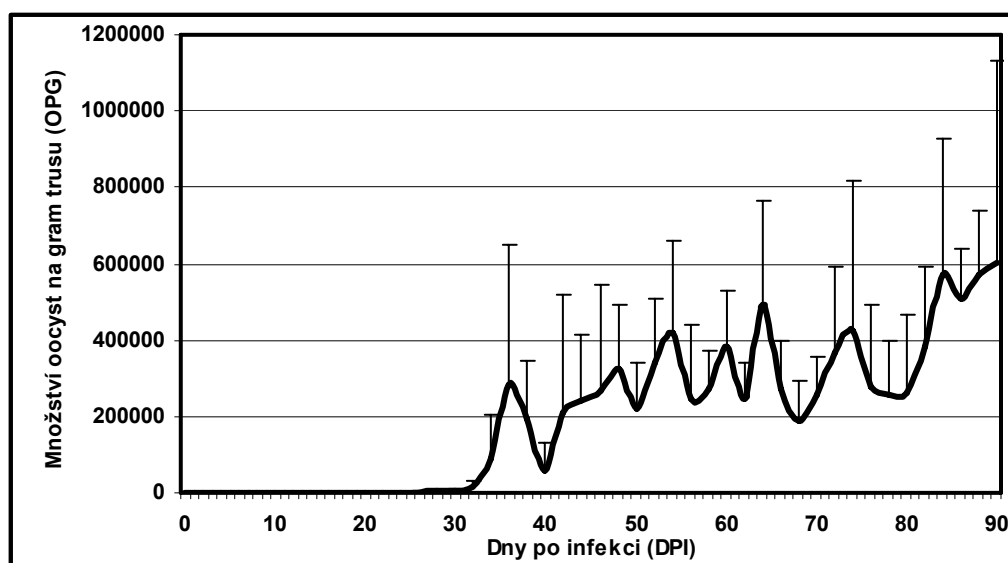
Graf 10. Intenzita infekce u 7-denních *Meriones unguiculatus*



Graf 11. Intenzita infekce u 8-týdenních *Meriones unguiculatus*



Graf 12. Intenzita infekce u *Gerbillus gerbillus*



#### 4.5 Klinické a makroskopické vyšetření

V průběhu experimentálních infekcí nebyly pozorovány žádné klinické příznaky kryptosporidiózy u sledovaných skupin. Při pitvě zvířat nebyly zaznamenány makroskopické změny v zažívacím traktu infikovaných zvířat.

#### 4.6 Histopatologické vyšetření

Histopatologické vyšetření prokázalo výskyt vývojových stádií *C. andersoni* u všech vnímavých jedinců pouze ve žláznaté části žaludku 30. DPI, respektive 37. DPI (obrázky 1-6 viz. příloha).

U obou věkových skupin BALB/c myši, které v průběhu experimentu nevyučovaly žádné oocysty kryptosporidií v trusu, neprokázalo histologické vyšetření přítomnost vývojových stádií *C. andersoni* v žádné z odebraných částí zažívacího traktu. Rovněž nebyly u této skupiny zvířat zjištěny žádné patologické změny.

Histopatologické změny v žaludeční sliznici vnímavých zvířat byly nezánětlivého charakteru zahrnující dilataci lumen infikovaných žláz s metaplastickým oploštěním epiteliální výstelky, které bylo výraznější u silných infekcí. Infekce byla převážně lokalizována v horních partiích žláznového epitelu žaludku.

Patologické změny a množství infikovaných žláz bylo výraznější u skupin 7-denních zvířat s lokalizací vývojových stádií kryptosporidií ve střední a spodní části epitelu, ale i tyto infekce probíhaly bez zánětlivé odezvy v proprii.

U skupiny 8-týdenních pískomilů druh *M. unguiculatus* byly 90. DPI pozorovány při basální membráně sliznice žaludku ložiskovité shluky lymfocytů a lymfocytární infiltráty v proprii.

## 5. Diskuze

Otázka hostitelské specifity žaludečních kryptosporidií (*C. andersoni* a *C. muris*) není ještě zcela vyřešena. V minulosti se předpokládalo, že druh *C. andersoni* není infekční pro hlodavce, což bylo podpořeno řadou experimentálních prací (Anderson 1991, Koudela et al. 1998, Lindsay 2000, Morgan et al. 2000b). Výsledky této práce však přinášejí nové poznatky o vnímavosti některých druhů hlodavců k infekci *C. andersoni*.

Námi použitý izolát kryptosporidií *C. andersoni* nebyl infekční pro BALB/c myši. Stejně tak neinfekčnost *C. andersoni* (bovinní izoláty *C. muris*-like) pro myši potvrdili už dříve Anderson (1991), Koudela et al. (1998), Lindsay et al. (2000) a Morgan et al. (2000b). Naproti tomu Matsubayashi et al. (2005) popsali bovinní izolát *C. andersoni* kmen Kawatabi, který byl infekční pro SCID myši. Tento izolát byl podroben molekulární analýze SSU rDNA, která potvrdila jeho odlišnost od *C. andersoni*.

Typickým hostitelem *C. andersoni* je skot (*Bos taurus*). Enemark et al. (2002) popsali prepatentní periodu *C. andersoni* u 4-denního experimentálně infikovaného telete v délce 25 DPI. V námi provedeném experimentu se délka prepatentní periody žaludeční kryptosporidiózy způsobené *C. andersoni* lišila v závislosti na druhu a věku hostitele. Zaznamenali jsme prepatentní periodu v délce 25 DPI u dospělých jedinců dvou druhů pískomilů (*S. calurus* a *M. tristrami*), což odpovídá údajům publikovaných u skotu.

Koudela et al. (1998) úspěšně infikovali 8-týdenní pískomily druhu *M. unguiculatus* bovinním izolátem *C. muris*-like (pravděpodobně *C. andersoni*) s prepatentní periodou 15-19 DPI. V námi provedeném experimentu byla zjištěna u stejného druhu a věkové kategorie pískomilů obdobná délka prepatentní periody (19 DPI), přičemž stejná prepatentní perioda byla zjištěna i u dalších vnímavých adultních druhů hlodavců (*M. coucha* a *G. gerbillus*). Naopak u 7-denních pískomilů druhů *M. coucha* a *M. unguiculatus* byla zjištěna delší prepatentní perioda (23 DPI) než u adultních jedinců stejného druhu, což ukazuje na určitou věkovou specifitu.

Koudela et al. (1989) popsali druh *G. gerbillus* jako nevnímavý k infekci *C. muris*-like (bovinní genotyp), naopak námi zjištěné výsledky ukázaly, že zmíněný druh pískomila byl nejvnímavější k infekci *C. andersoni* ze všech námi experimentálně infikovaných druhů hlodavců.

Patentní perioda u typického hostitele (skot) může trvat až několik let (Lindsay et al. 2000). U skupiny infikovaných dospělých jedinců druhů *G. gerbillus* a neonatálních *Meriones unguiculatus* jsme zjistili dlouhodobě přetrvávající infekci s vysokou intenzitou. Současně u skupiny adultních pískomilů druhu *M. unguiculatus* byla zjištěna výrazně kratší patentní perioda, což ukazuje na rozdíly ve vnímavosti k infekci v závislosti na věku. U skupin neonatálních a adultních *M. coucha* však nebyl tento vliv potvrzen. Obdobnou délku patentní periody, jakou jsme zjistili v našich experimentech, popsal Iseki et al. (1989) u SPF myši infikovaných druhem *C. muris*. Naopak Koudela et al. (1989) a Matsubayashi et al. (2005) uvádějí výrazně kratší patentní periodu u druhu *M. unguiculatus* (18-36 DPI), respektive u C.B.-17/Icr-+/+ myši (19 DPI) infikovaných bovinními izoláty žaludečních kryptosporidií.

Intenzita infekce se u jednotlivých druhů výrazně lišila. Největší intenzita vylučovaných oocyst byla zaznamenána u druhu *G. gerbillus* ( $2,5 \times 10^5$  OPG), jedinci tohoto druhu vylučovali oocysty po celou dobu pozorování a maximální intenzita byla zaznamenána 90. DPI. Podobnou intenzitu infekce zaznamenal Matsubayashi et al. (2005) u imunokompetentních myši infikovaných druhem *C. andersoni* ( $0,6-2,4 \times 10^5$ ). Naproti tomu, stejný autor zaznamenal mnohem vyšší intenzitu infekce *C. andersoni* u SCID myši ( $1 \times 10^7$  OPG). U skotu přirozeně infikovaného druhem *C. andersoni* se intenzita infekce pohybuje v rozmezí  $3,2 \times 10^4 - 4,4 \times 10^6$  u telat a  $7,8 \times 10^4 - 2,6 \times 10^6$  u dospělých matek (Kváč et Vítovec 2003). Iseki et al. (1989) popsali infektivitu *C. muris* kmene RN66 pro laboratorní myši a různé druhy domácích zvířat (křeček, králík, pes a kočka), zjistili maximální intenzitu infekce u SPF myši v rozsahu  $11-46 \times 10^6$  OPG. U koček byla intenzita infekce také dosti vysoká. Naproti tomu, u křečků, králíků a psů byla vnímavost k infekci podstatně nižší (bez udání OPG). V našem sledování byla maximální intenzita infekce  $1,5 \times 10^6$  OPG zjištěna u druhu *G. gerbillus*. Z uvedených výsledků vyplývá, že intenzita infekce *C. andersoni* u námi sledovaných hlodavců je výrazně nižší než u infekcí způsobených druhem *C. muris* a současně i u infekcí *C. andersoni* u typického hostitele.

Histologické vyšetření prokázalo lokalizaci vývojového cyklu *C. andersoni* u všech námi infikovaných druhů hlodavců pouze v žláznaté části žaludku, což odpovídá již dříve publikovaným údajům (Koudela et al. 1998, Lindsay et al. 2000, Kváč et Vítovec 2003).

Anderson (1987), Özkul et Aydin (1994, 1996) a Kváč et Vítovec (2003) charakterizovali histopatologické změny způsobené infekcí *C. andersoni* jako hypertrofii, atrofii a metaplázií žláznatého epitelu a rozšíření infikovaných žláz s absencí zánětlivé reakce v propriu. Naopak Taylor et al. (1999) popsali zánětlivou odpověď v žaludeční svalovině u outbredních myší infikovaných  $1 \times 10^6$  oocyst *C. muris*, přičemž připustili, že změny imunokompetentních myší mohou být jiné. V naší studii byly histopatologické změny v žaludku vnímavých hlodavců infikovaných druhem *C. andersoni* charakteristické metaplázií a rozšířením žaludečních žláz a nebyla nalezena zánětlivá odpověď v lamina propria a abomasální svalovině.



## 6. Závěry

- Byly popsány nové druhy hlodavců *G. gerbillus*, *M. tristrami*, *S. calurus*, *M. coucha* vnímavých k infekci *C. andersoni* (část výsledků publikováno, viz. příloha).
- Prepatentní perioda *C. andersoni* u neonatálních jedinců je delší oproti adultním jedincům
- Neonatální jedinci jsou více vnímaví k infekci *C. andersoni* - výrazně vyšší intenzita infekce.
- Nebyly zjištěny žádné rozdíly v patologii.
- Nejvhodnější modelový druh pro pomnožování *C. andersoni* v laboratoři je druh *G. gerbillus*, u kterého byla zaznamenána nejvyšší intenzita infekce s dlouhou patentní periodou.
- Druhy *M. unquiculatus* a *M. coucha* jsou z důvodů krátké patentní periody vhodné pro sledování průběhu infekce a reinfekce.

## 7. Literatura

- Alvarez-Pellitero, P., Sitja Bobadilla, A. 2002:** *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus urata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. Int. J. Parasitol. 32: 1007-1021.
- Anderson, B.C. 1987:** Abomasal cryptosporidiosis in cattle. Vet. Pathol. 24: 235-238.
- Anderson, B.C. 1991:** Prevalence of *Cryptosporidium muris*-like oocysts among cattle populations of the United States Preliminary report. J. Protozool. 38: 14-15.
- Arrowood, M.J., Sterling, C.R. 1987:** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. J. Parasitol. 73: 314-319.
- Aydin, Y., Özkul, I.A. 1996:** Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. Vet. Parasitol. 66: 257-262.
- Blagburn, B.L., Lindsay, D.S., Hoerr, F.J., Atlas, A.L., Toivio-Kinnucan, M. 1990:** *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganoplera bella*: Passeriformes, Estrildidae). Avian Dis. 34: 1027-1030.
- Brownstein, D.G., Strandberg, J.D., Montali, R.J. Bush, M., Fortner, J. 1977:** *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. Vet. Pathol. 14: 606-617.
- 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 analyses of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitol. Res. 85: 899-904.
- Current, W.L., Upton, S.J., Haynes, T.B. 1986:** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n.sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. J. Protozool., 33: 289-296.
- Dubey, J.P., Markovits, J.E., Killary, K.A. 2002:** *Cryptosporidium muris* - like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Vet. Parasitol. 39: 363-371.
- Enemark, H.L., Ahrens, P., Lowery, C.J., Thamsborg, S.M., Enemark, J.M.D., Bille-Hansen, V., Lind, P. 2002:** *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterisation. Vet. Parasitol. 107: 37-49.
- Esteban, E., Anderson, B.C. 1995:** *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistence, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. J. Dairy. Sci. 78: 1068-1072.

- Fayer, R., Guidry, A., Blagburn, B.L. 1990:** Immunotherapeutic efficacy of bovine colostrum immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infect. Immun.* 58: 2962-2965.
- Fayer, R., Morgan, U.M., Upton, S.J. 2000:** *Cryptosporidium* as a parasitic zoonotic. *Int. J. Parasitol.* 30: 1305-1321.
- Fayer, R., Speer, C.A., Dubey, J.P. 1997:** The general biology of *Cryptosporidium*. In: R. Fayer (Ed.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC press, Boca Raton, pp. 1-42.
- Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lal, A.A., Dubey, J.P. 2001:** *Cryptosporidium canis* n. sp from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87: 1415-1422.
- Gatai, W., Ashord, R.W., Beeching, N.J., Kamwati, S.K., Greenshie, J., Hart, C.A. 2002:** *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. 8: 204-206.
- Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelievre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., Cailliez, J.C., Camus, D., Dei-Cas, E. 2001:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3472-3480.
- Hůrková, L., Hajdušek, O., Modrý, D. 2003:** Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporidiea) in Siberian chipmunks. *J. Wildl. Dis.* 39: 441-444.
- Chalmers, R.M., Strudee, A.P., Bull, S.A., Miller, A., Wright, S.E. 1997:** The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol. Res.* 83: 478-482.
- Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Sterling, C.R., Wang, C., Jakubowski, W., et DuPont, H.L. 1999:** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 157-164.
- Iseki, M. 1979:** *Cryptosporidium felis* sp.n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jap. J. Parasitol.* 28: 285-307.
- Iseki, M. 1986:** Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Japn. J. Parasitol.* 35: 521-526.
- Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S., Takada, S. 1989:** Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75: 218-222.

- Jiang, J., Alderisio, K.A., Xiao, L. 2005:** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4446-4454.
- Kilani, R.T., Sekla, L. 1987:** Purification of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites by cesium chloride and Percoll<sup>®</sup> gradients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 505-508.
- Koudela, B., Modrý, D., Vítovec, J. 1998:** Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. *Vet. Parasitol.* 76: 181-188.
- Kváč, M., Ondráčková, Z., Květoňová, D., Sak, B., Vítovec, J. 2007:** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 143: 229-233.
- Kváč, M., Vítovec, J. 2003:** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med. B.* 50: 451-457.
- Levine, N.D. 1984:** Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *J. Protozool.* 31: 94-98.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vávra, J., Wallace, F.G. 1980:** A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27: 37-58.
- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Hoerr, F.J., Smith, P.C. 1991:** Cryptosporidiosis in zoo and pet birds. *J. Protozool.* 5: 579-84.
- Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blagburn, B.L. 2000:** *Cryptosporidium andersoni* sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos Taurus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47: 91-95.
- MacFarlane, D., Horner-Bryce, J. 1987:** Cryptosporidiosis in well-nourished and malnourished children. *Acta. Pediatr. Scand.* 76: 474-477.
- Manabe, Y., Clark, D., Moore, R., Lumadue, J., Dahlman, H., Belitsos, P., Chaisson, R., Sears, C. 1998:** Cryptosporidiosis in patients with AIDS: Correlates of disease and survival. *Clin. Infect. Dis.* 27: 536-542.
- Matsubayashi, M., Kimata, I., Abe, N., Tani, H., Sasai, K. 2004:** The detection of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* oocyst in cattle in Japan. *Parasitol. Res.* 93: 504-506.

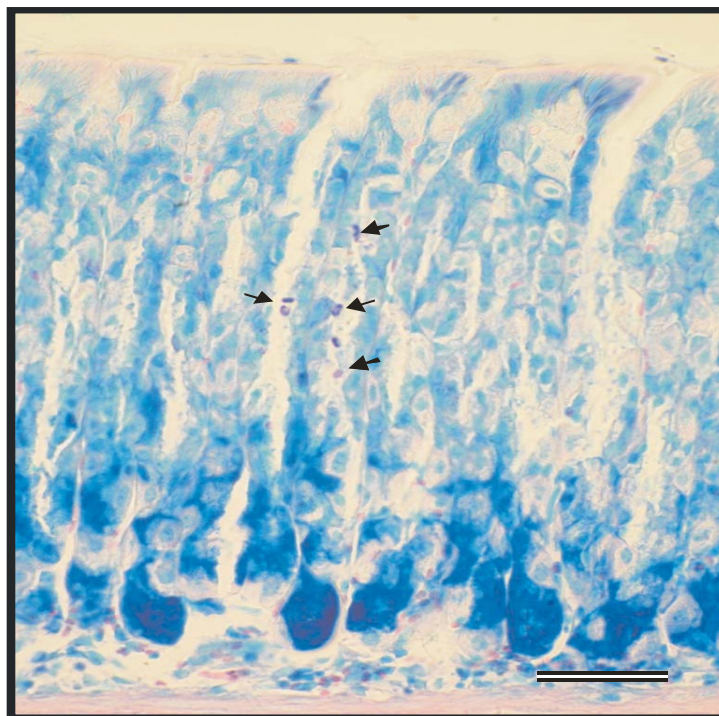
- Matsubayashi, M., Kimata, I., Iseki, M., Hajiri, T., Tani, H., Sasai, K., Baba, E. 2005:** Infectivity of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 129: 165-168.
- Miláček, P., Vítovec, J. 1985:** Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa, *Folia Parasitol.* 32: 50.
- Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijai, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C., Olson, M., Lal, A.A., Xiao, L. 2002:** *Cryptosporidium hominis* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 433-440.
- Morgan, U.M., Monis, P., Xiao, L., Limor, J., Raidal, S., O'Donoghue, P., Gasser, R., Murray, A., Fayer, R., Blagburn, B., Lal, A.A., Thompson, R.C.A. 2001:** Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.* 31: 289-296.
- Morgan, U.M., Weber, R., Xiao, L., Sulaiman, I., Thompson, R.C.A., Ndiritu, W., Lal, A.A., Moore, A., Deplazes, P. 2000a:** Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates obtained from HIV-infected individuals living in Switzerland, Kenya and the USA. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1180-1183.
- Morgan, U.M., Xiao, L., Fayer, R., Lal, A.A., Thompson, R.C.A. 1999:** Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *Int. J. Parasitol.* 29: 1733-1751.
- Morgan, U.M., Xiao, L., Monis, P., Sulaiman, I., Pavlasek, I., Blagburn, B., Olsen, M., Lal, A.A., Thompson, R.C.A. 2000b:** Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. *Parasitol.* 120: 457-464.
- O'Donoghue, P.J. 1995:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25: 139-195.
- Özkul, I.A., Aydin, Y. 1994:** Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 55: 129-132.
- Özkul, I.A., Aydin, Y. 1996:** Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 55: 129-32.
- Pavlásek, I. 1993:** The black headed gull (*Larus ridibundus* L.) a new host for *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Vet. Med. (Praha.)* 38: 629-638.

- Pavlásek, I., Ryan, U. 2007:** The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Vet. Parasitol.* 144: 349-352.
- Pospischil, A., Stiglmaier-herb, M.T., von Hegel, G., Wiesner, H. 1987:** Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Vet. Rec.* 17: 379-380.
- Ryan, U.M., Monis, P., Enemark, H.L., Sulaiman, I., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, R., Robertson, I., Zhou, L., Thompson, R.C.A., Xiao, L. 2004:** Provide genetic and biological data to support their description of *Cryptosporidium suis* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) for one of the two genotypes of *Cryptosporidium* spp. found in swine, *J. Parasitol.* 90: 769-773
- Ryan, U.M., Samarasinghe, B., Reid, C., Buddle R., Robertson, I., Thompson, R.C.A. 2003:** Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3970-3974.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A.A., Pavlásek, I. 2003:** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4302-4307.
- Santin, M., Dixon, B.R., Fayert, R. 2005:** Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from ringed seals (*Phoca hispida*) in Northern Quebec, Canada. *J. Parasitol.* 91: 712-716.
- Satoh, M., Hikosaka, K., Sasaki, T., Suyama, Y., Yanai, T., Ohta, M., Nakai, Y. 2003:** Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 691-692.
- Slavin, D. 1955:** *Cryptosporidium meleagridis* (sp.nov.). *J. Comp. Pathol.* 65: 262-266.
- Šlapeta, J. 2007:** *Cryptosporidium* species found in cattle: a proposal for a new species. *Trends Parazitol.* 22: 41-42.
- Taylor, M.A., Marshall, R.N., Green, J.A., Catchpole, J. 1999:** The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN66) in outbred nude mice. *Vet. Parasitol.* 86: 41-48.
- Tilley, M., Upton, S.J., Chrisp, C.E. 1991:** A comparative study of the biology of *Cryptosporidium* sp. from guinea pigs and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *Can. J. Microbiol.* 37: 949 pp.
- Trout, J.M., Santin, M., Fayer, R. 2006:** *Giardia* and *Cryptosporidium* species and genotypes in coyotes (*Canis latrans*). *Zoo Wildl Med.* 37: 141-444.

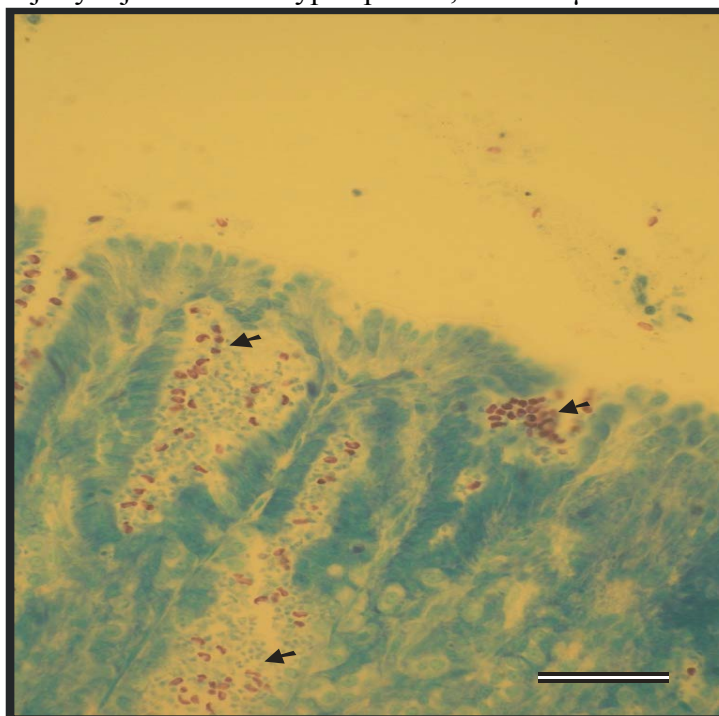
- Tyzzar, E.E. 1907:** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proc. Doc. Exp. Biol. Med. 5: 12-13.
- Tyzzar, E.E., 1910:** An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. J. Med. Res. 23: 487.
- Tyzzar, E.E. 1912:** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenkd. 26: 394-412.
- Tzipori, S., Griffiths, J.K. 1998:** Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. Adv. Parasitol. 40: 5-36.
- Uni, S., Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Takada, S. 1987:** Ultrastructure of *Cryptosporidium muris* (strain RN66) parasitizing the murine stomach. Parasitol. Res. 75: 218-222.
- Upton, S.J., Current, W.L. 1985:** The species of *Cryptosporidium* infecting mammals. J. Parasitol. 71: 625-629.
- Vetterling, J.M., Jervis, H.R., Merrill, I.G., Sprinz, H. 1971a:** *Cryptosporidium wrairi* sp. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. J. Protokol. 18: 243-247.
- Vetterling, J.M., Takeuchi, A., Madden, P.A. 1971b:** Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. J. Protozool. 18: 248-260.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, L., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R., et Lal, A.A. 1999a:** Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small subunit ribosomal RNA gene locus. Appl. Envir. Microbiol. 65: 1578-1583.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J. 2004:** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev. 17: 72-97.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Fayer, R., Thompson, R.C.A., Lal, A.A. 2000:** *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. Parasitol. Today 7: 287-292.
- Xiao, L., Morgan, U., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Schulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R., Lal, A.A. 1999b:** Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Appl. Envir. Microbiol. 65: 3386-3391.

## Přílohy

Obrázek 1. Histologický řez žaludeční sliznicí dospělého jedince *Mastomys coucha*, 30. DPI, šipky ukazují vývojová stádia kryptosporidií, bar = 50 $\mu$ m

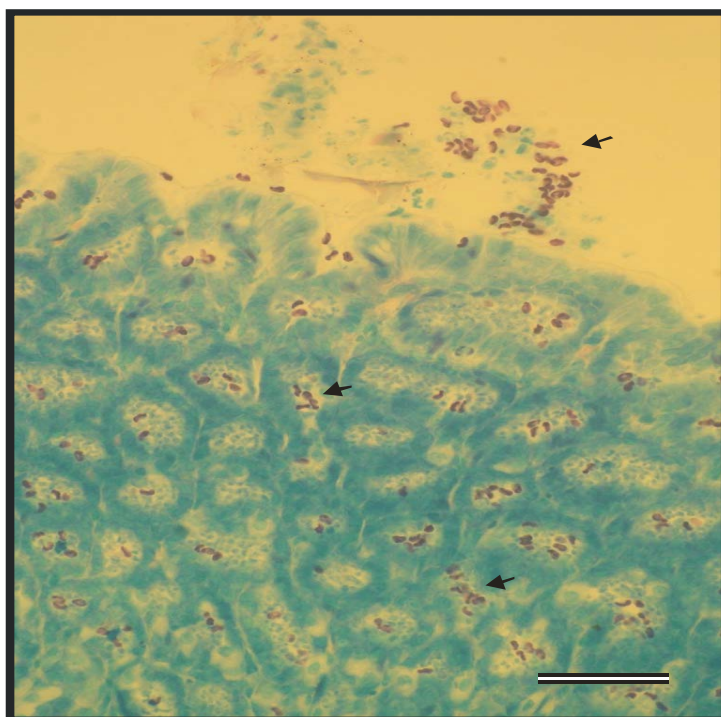


Obrázek 2. Histologický řez žaludeční sliznicí novorozeného jedince *Meriones unguiculatus*, 30. DPI, šipky ukazují vývojová stádia kryptosporidií, bar = 50 $\mu$ m

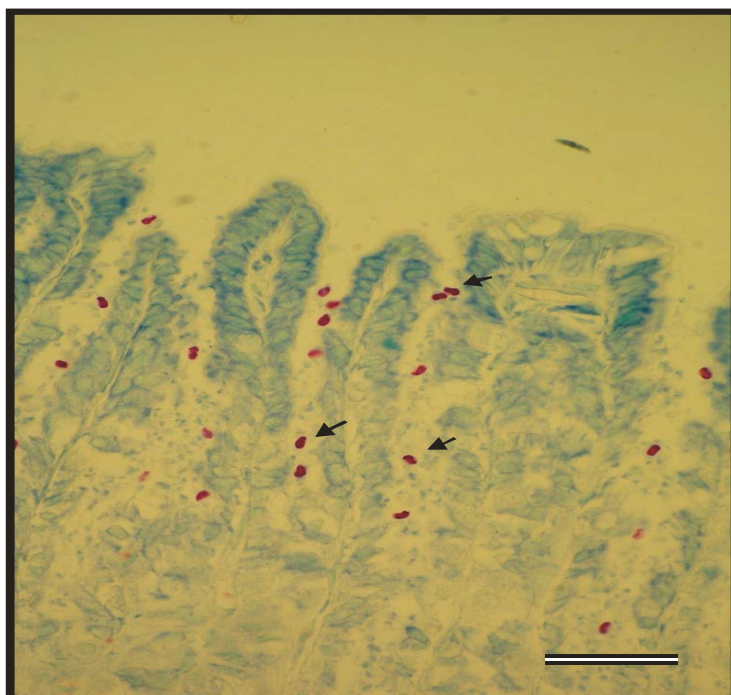




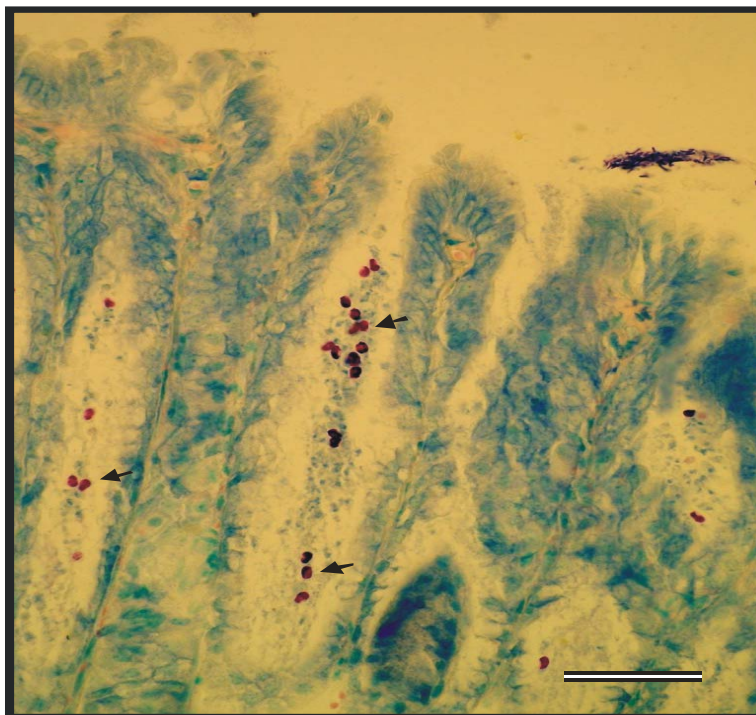
Obrázek 3. Histologický řez žaludeční sliznice dospělého jedince *Meriones unguiculatus*, 30. DPI, šipky ukazují vývojová stádia kryptosporidií, bar = 50  $\mu$ m



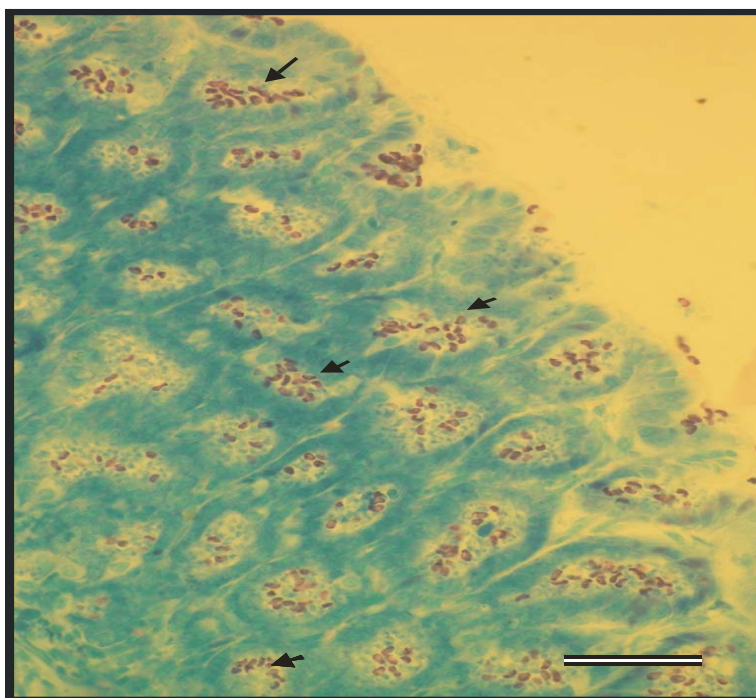
Obrázek 4. Histologický řez žaludeční sliznice dospělého jedince *Meriones tristrami*, 37. DPI, šipky ukazují vývojová stádia kryptosporidií, bar = 50  $\mu$ m



Obrázek 5. Histologický řez žaludeční sliznice dospělého jedince *Seeketamys calurus*, 37. DPI, šipky ukazují vývojová stádia kryptosporidií, bar = 50  $\mu$ m



Obrázek 6. Histologický řez žaludeční sliznice dospělého jedince *Gerbillus gerbillus*, 30. DPI, šipky ukazují vývojová stádia kryptosporidií, bar = 50  $\mu$ m



## **Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*)**

### **Names of authors**

Martin Kváč<sup>a, c, d</sup>, Zuzana Ondráčková<sup>b</sup>, Dana Květoňová<sup>a</sup>, Bohumil Sak<sup>a</sup>, Jiří Vítovec<sup>c</sup>

### **Abstract**

The infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* (bovine isolate) for neonatal and adult southern multimammate mice (*Mastomys coucha*) was studied using transmission experiments. *Cryptosporidium andersoni* isolate used in this study was not infective for BALB/c mice, but experimental infection proved susceptibility of neonatal and adult *M. coucha* to the infection. The prepatent period was 20-24 days, the patent period varied between 46 and 59 days. No signs of clinical illness or macroscopic findings were detected in infected animals. *Cryptosporidium* developmental stages were detected only in the glandular part of the stomach of *M. coucha* in histological sections stained with Wolbach's modification of Giemsa and using immunofluorescence. Histopathological changes were characterized by dilatation and epithelial metaplasia of infected gastric glands without inflammatory response in the lamina propria. Neonatal *M. coucha* were more susceptible to *C. andersoni* infection than adults. *Mastomys coucha* seems to be a useful laboratory model for study of *C. andersoni* infection.

### **Překlad**

Užitím transmisních pokusů byla studována infektivita a patogenita *Cryptosporidium andersoni* (bovinní izolát) pro novorozené a dospělé mastomyši (*Mastomys coucha*). Použitý izolát *Cryptosporidium andersoni* nebyl infekční pro BALB/c myši, ale experimentální infekce prokázala vnímavost novorozenců a dospělců *M. coucha* k infekci. Prepatentní perioda byla 20-24 dní po infekci, patentní perioda se pohybovala od 46 do 59 dne po infekci. V průběhu experimentálních infekcí nebyly pozorovány žádné klinické příznaky kryptosporidiózy ani makroskopické změny v zažívacím traktu infikovaných zvířat. V histologických řezech barvených Wolbachovou modifikací Giemsa a použitím imunofluorescence byla detekována vývojová stádia kryptosporidií jen v žlaznaté části

žaludku *M. coucha*. Histopatologické změny v žaludeční sliznici vnímavých zvířat byly nezápovědného charakteru zahrnující dilataci lumen infikovaných žláz s metaplastickým oploštěním epitelialní výstelky. Novorození jedinci byli více vnímavý k infekci *C. andersoni* než dospělci. *Mastomys coucha* se zdá být vhodný laboratorní model pro studium infekce *C. andersoni*.