

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

Katedra medicínské biologie



Bakalářská práce

Příprava monoklonálních protilátek proti *Cryptosporidium muris*

Markéta Vopalecká

Vedoucí práce: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.
Školitel specialista: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

České Budějovice 2011

Vopalecká M, (2011): Příprava monoklonálních protilátek proti *Cryptosporidium muris* [Preparation of monoclonal antibodies against *Cryptosporidium muris*. Bc. Thesis, in Czech] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This work is focused on a preparation of monoclonal antibodies against *Cryptosporidium muris* using the hybridoma technology. The prepared monoclonal antibodies are characterized by IFAT and tested against other species of the genus *Cryptosporidium*.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním svého 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 své kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29. 4. 2011

.....
Markéta Vopalecká

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především školiteli RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, trpělivost a cenné připomínky. Poděkování také patří doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., RNDr. Daně Květoňové a vůbec celému kolektivu laboratoře veterinární a humánní protistologie za cenné rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Za pomoc při konstrukci hybridomů a poskytnuté informace chci poděkovat doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc.

A v neposlední řadě děkuji své mamince za podporu během studia.

OBSAH

1 Úvod.....	1
2 Literární přehled	2
2.1 Historie.....	2
2.2 Taxonomie.....	3
2.3 Specifičnost hostitele	3
2.4 Životní cyklus.....	5
2.5 <i>Cryptosporidium muris</i>	7
2.6 Prepatentní perioda.....	7
2.7 Zdroj a přenos infekce.....	8
2.8 Kryptosporidióza.....	8
3 Monoklonální protilátky	9
3.1 Charakteristika monoklonálních protilátek.....	9
3.2 Produkce monoklonálních protilátek	9
3.3 Zkřížená reaktivita	10
3.4 Použití monoklonálních protilátek	10
4 Imunologické metody	11
4.1 Detekce antigenu pomocí fluorescenčně značené protilátky	11
4.2 Detekce antigenu pomocí enzymem značené protilátky.....	11
4.2.1 Enzym Immunoassay.....	12
4.2.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	12
4.2.3 Copro-Antigen Detection Immunoassays.....	13
4.2.4 Immunochromatographic Assays	13
5 Cíle práce	14
6 Materiál a Metodika.....	15
6.1 Experimentální zvířata	15
6.2 Paraziti.....	15
6.3 Skladování a uchování vzorku	15
6.4 Parazitologické vyšetření	16
6.5 Purifikace oocyst.....	17
6.5.1 Sacharózový gradient.....	17
6.5.2 Cesium chloridový gradient.....	18
6.5.3 Odstranění bakterií antibiotiky	18
6.5.4 FACS sorter	19

6.6 Příprava monoklonálních protilátek	19
6.6.1 Imunizace	19
6.6.2 Buněčná fúze	19
6.6.3 Klonování	21
6.6.4 Produkce monoklonálních protilátek	21
6.6.5 Nepřímá imunofluorescence	22
7 Výsledky	24
7.1 Příprava monoklonálních protilátek	24
7.2 Charakterizace monoklonálních protilátek	24
7.3 Zkřížená reaktivita	25
8 Diskuse	27
9 Závěr	30
10 Literatura	31

1 ÚVOD

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření jednobuněční intracelulární paraziti infikující epitelální buňky gastrointestinálního traktu ryb, plazů, ptáků a savců, včetně člověka. Některé druhy rodu *Cryptosporidium* infikují celou řadu hostitelů, naproti tomu jiné druhy jsou specializované na určitou skupinu hostitelů. Kryptosporidie lze rozlišit na dvě morfologicky odlišné linie podle lokalizace vývojového cyklu v hostiteli – kryptosporidie infikující žaludek a kryptosporidie infikující sliznici střeva, tenkého i tlustého. Výjimkou jsou ptačí kryptosporidie, které byly lokalizovány v gastrointestinálním traktu, ale i v dýchacím ústrojí a burze Fabricii. Na základě všeobecné dostupnosti molekulárních metod byla popsána řada tzv. environmentálních genotypů, pro které není znám hostitel. Lokalizace parazita v hostiteli je odhadována podle výsledků fylogenetických analýz.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Historie

První zmínka o kryptosporidiích pochází ze studií Ernesta Edwarda Tyzzer z roku 1907. V roce 1907 popsal jejich asexuální a sexuální fáze (Tyzzer 1907). Také poznamenal, že výtrusy (oocysty) jsou vylučovány do výkalů. Identifikoval parazita nejistého taxonomického zařazení a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris*. Roku 1910 popsal parazita podrobněji a navrhl jméno *Cryptosporidium* pro nový rod a *C. muris* jako typový druh (Tyzzer 1910).

V roce 1912 Tyzzer popsal další druh, *Cryptosporidium parvum*. Demonstroval, že *C. parvum* se vyvíjí jen v tenkém střevě experimentálně infikovaných myší a že oocysty *C. parvum* jsou menší než *C. muris* (Tyzzer 1912).

Po dobu 48 let od první Tyzzerovy publikace nebyly kryptosporidie považovány za ekonomicky, lékařsky nebo veterinárně významné, proto nebyl výzkum intenzivně prováděn a nebyly získávány žádné nové informace o rodu (Wetzel 1938). Roku 1955 byl popsán nový druh rodu *Cryptosporidium* - *C. meleagridis*. Tento druh infikuje střevní epitel drůbeže a je spojován se mortalitou hostitele. Navzdory tomu zájem o tento rod zůstal stále minoritní (Slavin 1955). Na začátku roku 1970 byl zájem o kryptosporidiové infekce zvýšen v souvislosti s průjmem skotu (Meutin et al. 1974; Panciera et al. 1971).

V roce 1976 byly zaznamenány první případy lidské kryptosporidiózy (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976). Ačkoli bylo do roku 1980 hlášeno relativně málo případů, byla kryptosporidióza spojována s vleklým průjmem u pacientů se syndromem získané imunodeficiency (AIDS). To podnítilo intenzivní výzkumy na lékařské a veterinární úrovni zabývající se epidemiologií, diagnostikou, léčbou a prevencí kryptosporidiózy (Current et al. 1983).

Roku 1993 zájem dramaticky vzrostl v důsledku masivní epidemie způsobené kontaminací vodního zdroje v Milwaukee (Wisconsin, USA), která postihla více než 400 000 osob (MacKenzie et al. 1994). Široká veřejnost, zdravotní agentury, ekologické skupiny, dodavatelé pitné vody a další vyjádřili znepokojení a podnítili studium základní biologie kryptosporidií s důrazem na vyvíjení metod pro detekci oocyst, prevenci a léčbu onemocnění.

2.2 Taxonomie

Všichni zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou jednobuněční intracelulární eukaryotičtí paraziti patřící mezi apikomplexa a někteří jsou důležitými původci chorob člověka a zvířat. V současné době je popsáno 23 platných druhů kryptosporidií (Tab. I). Existuje více než 80 izolátů *Cryptosporidium* uvedených jako genotypy (Levine 1970).

Většina zástupců kmene apikomplexa má složitý životní cyklus skládající se ze sexuálních a asexuálních fází. Mezi rody, které se vyvíjí v trávicím traktu obratlovců a projdou všemi fázemi jejich životního cyklu uvnitř jednoho hostitele, se řadí kromě rodu *Cryptosporidium* také *Eimeria*, *Isospora* a *Cyclospora*.

I navzdory mnoha morfologickým shodám a podobnosti životního cyklu kryptosporidií a kokcidií byl na základě molekulárních studií prokázán užší fyziologický vztah mezi druhy *Cryptosporidium* a *Gregarina* (Carreno et al. 1999).

2.3 Specifičnost hostitele

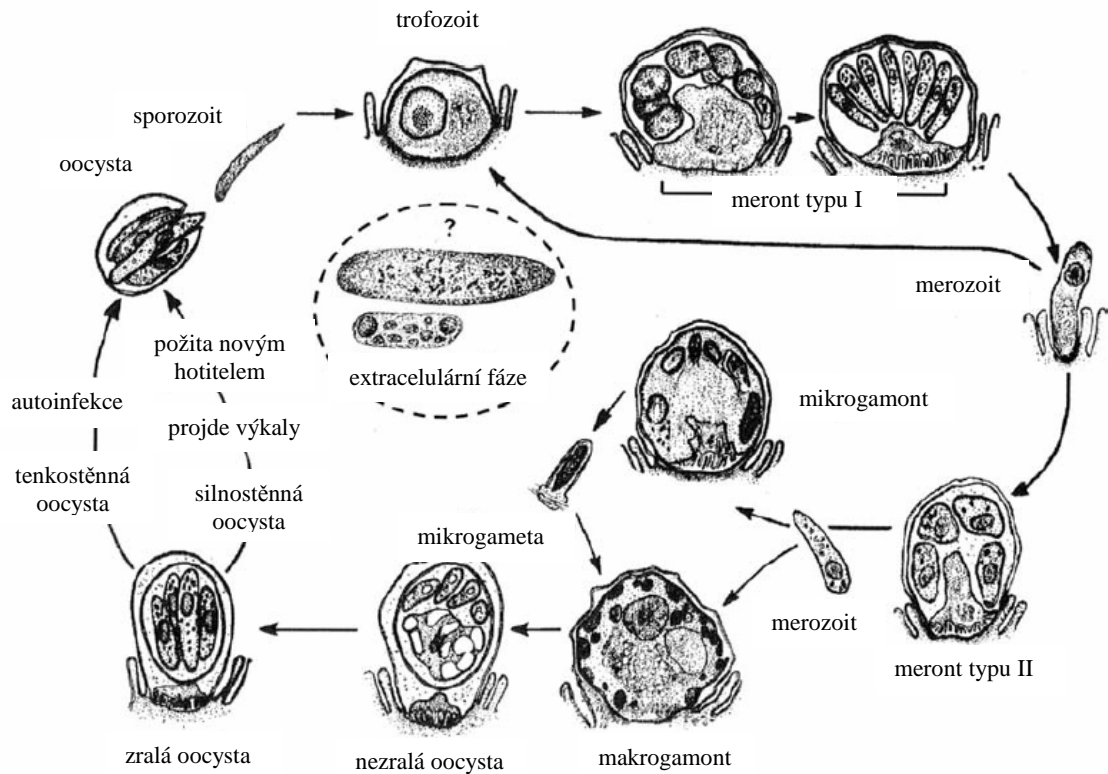
Pokud chceme určit rozsah vnímavých hostitelů pro druh nebo genotyp kryptosporidie, oocysty získané z jednoho druhu zvířat použijeme k infekci druhu jiného. Je-li životní cyklus dokončen u dalších hostitelských druhů a vylučované oocysty jsou identické těm, které iniciovaly infekci, je rozsah hostitelů rozšířen. Obecně platí, že izoláty z jedné třídy obratlovců nebyly infekční pro zvířata z jiné třídy (Ditrich et al. 1991; Gatei et al. 2003; Guyot et al. 2001; Pedraza-Diaz et al. 2000; Xiao et al. 2001).

Tab. I: Platně pojmenované druhy rodu *Cryptosporidium*.

Druh	Hostitel	Lokalizace	Autor
<i>C. andersoni</i>	<i>Bos taurus</i>	žláznatý žaludek	Lindsay et al., 2000
<i>C. baileyi</i>	<i>Gallus gallus</i>	bursa Fabricia	Current et al., 1986
<i>C. bovis</i>	<i>Bos taurus</i>	tenké střevo	Fayer et al., 2005
<i>C. canis</i>	<i>Canis familiaris</i>	tenké střevo	Fayer et al., 2001
<i>C. cuniculus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	tenké střevo	Robinson et al., 2010
<i>C. fayeri</i>	<i>Macropus rufus</i>	střevo	Ryan et al., 2008
<i>C. felis</i>	<i>Felis catis</i>	tenké střevo	Iseki, 1979
<i>C. fragile</i>	<i>Duttaphrynus melanostrictus</i>	žaludek	Jirků et al., 2008
<i>C. galli</i>	<i>Gallus gallus</i>	žláznatý žaludek	Pavlásek, 1999
<i>C. hominis</i>	<i>Homo sapiens</i>	tenké střevo	Morgan-Ryan et al., 2002
<i>C. macropodum</i>	<i>Macropus giganteum</i>	střevo	Power et Ryan, 2008
<i>C. meleagridis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i>	tenké střevo	Slavin, 1955
<i>C. molnari</i>	<i>Sparus aurata,</i> <i>Dicentrarchus labrax</i>	žaludek, tenké střevo	Alvarez-Pellitero et Sitja-Bobadilla, 2002
<i>C. muris</i>	<i>Mus musculus</i>	žaludek	Tyzzler, 1910
<i>C. parvum</i>	<i>Mus musculus</i>	tenké střevo	Tyzzler, 1912
<i>C. ryanea</i>	<i>Bos taurus</i>	střevo	Fayer et al., 2008
<i>C. scophthalmi</i>	<i>Scophthalmi maximus</i>	střevo	Alvarez-Pellitero et al., 2004
<i>C. serpentis</i>	<i>Elaphe guttata,</i> <i>E. subocularis</i> <i>Sanzinia madagascarensus</i>	žaludek	Levine, 1980
<i>C. suis</i>	<i>Sus scrofa</i>	tlusté střevo	Ryan et al., 2004
<i>C. ubiquitum</i>	<i>Bos taurus</i>	střevo	Fayer et al., 2010
<i>C. varanii</i>	<i>Varanus prasinus</i>	žaludek, tenké střevo	Pavlásek et al., 1995
<i>C. wrairi</i>	<i>Cavia porcellus</i>	tenké střevo	Vetterling et al., 1971
<i>C. xiaoi</i>	<i>Ovis aries</i>	střevo	Fayer et Santín, 2009

2.4 Životní cyklus (Obr. 1)

Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxení (Thompson et al. 2005). Životní cyklus kryptosporidií se skládá z pěti fází: 1. excystace, 2. invaze, 3. merogonie, 4. gamogonie, 5. sporogonie. Nejlépe je popsán u *C. parvum*. U ostatních druhů rodu *Cryptosporidium* se předpokládá velmi podobný průběh.



Obr. 1: Schematické znázornění životního cyklu *Cryptosporidium parvum*.

Sporulovaná oocysta je vylučována z těla infikovaného hostitele. Každá oocysta obsahuje čtyři infekční sporozoity, které jsou obklopeny třívrstevnou stěnou, jež umožňuje přežití sporozoitů za nepříznivých podmínek.

Endogenní fáze začíná po požití oocysty vhodným hostitelem. Jakmile je oocysta uvnitř těla vhodného hostitele, dochází k excystaci – stěna oocysty se otevře podél švu (sutura) na jednom pólu a dojde k uvolnění pohyblivých sporozoitů (Fayer et al. 1990). K excystaci dochází díky působení žluči proteolytických enzymů ve střevě nebo kyselého prostředí v žaludku na oocystu.

Sporozoiti uvolnění z oocysty jsou pohybliví a přichycují se k hostitelské buňce apikálním koncem a aktivně ji napadají (Wetzel et al. 2005), využívají přítomnost sekrečních organel k invazi do hostitelské buňky (O'Hara et al. 2005). Sporozoit se nejdříve přichytí k hostitelské buňce a mikronemy a denzní granula přejdou do oblasti apikálního komplexu (Huang et al. 2004; Valigurová et al. 2007). Součástí apikálního komplexu kryptosporidií je glykoprotein CSL, který pomáhá k přichycení sporozoita k epitelialním buňkám hostitele (Langer et Riggs 1999; Riggs et al. 1997). Při kontaktu sporozoita s hostitelskou buňkou dochází k evaginaci plazmatické membrány hostitelské buňky, ta se prodlužuje a obrůstá přichycený sporozoit, jejím spojením vzniká parazitoformní vakuola (Elliott et al. 2001; Valigurová et al. 2007; Yoshikawa et Iseki 1991). Sporozoit má z počátku tvar štíhlý a srpkovitý, ale po přichycení se mění na oválný nebo kulatý (Huang et al. 2004). Tato oblast s vakuolou spolu s hostitelskou buněčnou membránou formuje rozhraní mezi hostitelem a parazitem (Umamiya et al. 2005). Sporozoiti v parazitoformní vakuole jsou intracelulární, ale nejsou přímo v kontaktu s cytoplazmou hostitelských buněk, mají tedy epicelulární lokalizaci (Valigurová et al. 2008). Vakuola jako struktura na apikálním konci sporozoitu se zdá být připojena přímo k cytoplasmě hostitelské buňky pomocí tzv. feeder organely. Jak tento proces internalizace postupuje, ze sporozoita se stává trofozoit (Lumb et al. 1988).

Nepohlavní rozmnožování tzv. merogonie je výsledkem rozdělování jader trofozoitů. Obecně platí, že kryptosporidie mají dva typy merogonie. U typu I vzniká 6 – 8 jader, každé se stane součástí merozoita. Každý zralý merozoit typu I opustí meront k infikování dalších buněk hostitele a vyvine se do dalšího typu I, nebo do meronta typu II. Meront typu II produkuje čtyři merozoity (Aydin 1997). Výjimkou je *C. baileyi*, tento druh má tři typy merontů. Ve třetím typu se tvoří 8 merozoitů (Current et al. 1986).

Pouze merozoiti typu II zahájí pohlavní rozmnožování (gametogonie) infikováním nových hostitelských buněk tím, že se diferencují na mikrogamont (samčí stádia), nebo makrogamont (samičí stádia). Jádro mikrogamontu se mnohonásobně dělí a vzniká 16 pohyblivých mikrogamet. Makrogamont zůstane jednojaderný. Není známo, jak mikrogamety lokalizují makrogamont, ale musí se připojit a projít buněčnou membránou hostitele. Po vstupu mikrogamet do cytoplasmy makrogamontu

buď mikrogamety vstoupí do jádra, nebo předají svůj jaderný obsah přes jadernou membránu makrogamontu. Pouze oplodněné makrogamonty se mohou vyvinout v oocysty (Current 1988).

Když oocysty sporulované *in situ* uzrají, obsahují 4 sporozoity. Oocysty z gastrointestinálního traktu jsou vylučovány s výkaly, ty v dýchacích cestách vystupují z těla s respiračním nebo nasálním sekretem (Current 1985, 1988). U druhu *C. parvum* vznikají dva druhy oocyst: 1. silnostěnné oocysty (80 %) jsou vylučovány trusem z těla hostitele; 2. tenkostěnné oocysty (20 %), které v organismu hostitele pronikají do neinfikovaných mikroklků, a tím se podílejí na autoinfekci (Current 1988).

2.5 *Cryptosporidium muris*

Cryptosporidium muris byla první popsána kryptosporidií vůbec (Tyzzer 1907). *Cryptosporidium muris* je lokalizována v žaludečních žlázách hostitelů. Hlavními hostiteli jsou hlodavci (Rodentia) (Iseki et al. 1989). Všechny vývoj je epicelulární je zde pravděpodobná autoinfekce sporozoity v žaludku. Na základě studií a dalších experimentů bylo zjištěno širší spektrum hostitelů zahrnující některé druhy z kmenů Primates, Lagomorpha, Carnivora, Pinnipedia, Hyracoidea, Artiodactyla. Průměrná velikost oocysty *C. muris* je $7 \times 5 \mu\text{m}$ (Tyzzer 1910).

V rámci tohoto druhu je rozlišováno několik izolátů, které se od sebe liší molekulární charakteristikou genu pro malou ribozomální podjednotku.

Cryptosporidium muris může mít velký význam ve vztahu k lidem žijícím ve špatných hygienických podmínkách. První případ infekce *C. muris* byl zaznamenán u dvou indonéských dětí v roce 2000 (Katsumata et al. 2000). O *C. muris* existuje málo prací, které se zabývají výskytem a prevalencí tohoto druhu v přirozených hostitelích.

2.6 Prepatentní perioda

Prepatentní perioda je nejkratší doba od požití infekční oocysty, jež má dokončený životní cyklus do první nově vyvinuté oocysty, která byla vyloučena. Tato doba se mění s hostitelem a druhem kryptosporidie a také závisí na infekční dávce.

Prepatentní perioda je u jednotlivých druhů kryptosporidií velmi rozličná. Experimentálně byla prokázána prepatentní perioda v rozmezí 2 – 7 dní pro *C. parvum* u telat (Tzipori 1983) a pro člověka 4 – 22 dní (DuPont et al. 1995), 6 – 21 dní pro *C. muris* u myší (Matsui et al. 1999).

2.7 Zdroj a přenos infekce

Oocysty mají vysokou životaschopnost. Jsou schopné díky své trilaminární stěně být odolné vůči nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí. Odolávají i běžným dezinfekčním úpravám vody (Dolejš 2004, Domenéch-Sánchez et al. 2008).

K přenosu infekce z hostitele na hostitele dochází fekálně orální cestou a přenos oocyst je omezen hostitelskou specifitou. Přenos infekce může být buď přímý, kdy dojde ke kontaktu s infikovaným jedincem, nebo pozřením potravin či vody kontaminovanými výkaly (Fayer et al. 2000), ale také pohlavním stykem (Newman et al. 1994).

2.8 Kryptosporidióza

Klinické projevy kryptosporidiózy závisí na imunitním stavu hostitele, druhu a lokalizaci parazita. Hlavním symptomem infekce kryptosporidiiemi u imunokompetentních pacientů, u kterých byl parazit lokalizován v tenkém střevě, je silný průjem (Sterling et al. 1986). Dále se mezi příznaky doprovázející průjem řadí malátnost, zvracení, únava, horečka, zvýšené pocení, nechutenství a bolest břicha (Fayer 2003; Thompson et al. 2005). Při nákaze žaludečními kryptosporidiiemi probíhá onemocnění bez typických symptomů (asymptomaticky), ale byly zaznamenány i symptomy související s kachexií (Anderson 1987; Pospischil et al. 1987). Chronicky se infekce projevuje u imunodeficientních jedinců, kde se infekce může rozšířit do dalších orgánů (slinivka, respirační trakt atd.) (Current et Garcia 1991). Následkem dehydratace a malnutrice může dojít u HIV pozitivních pacientů ke smrti (Blanshard et al. 1992; Navin et Hardy 1987).

3 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

3.1 Charakteristika monoklonálních protilátek

Protilátková afinita – suma jednotlivých nekovalentních interakcí mezi paratopem protilátky a epitopem antigenu. Protilátky s nízkou afinitou slabě váží antigen a naopak protilátky s vysokou afinitou váží antigen silněji.

Homogenita – protilátky jsou nejlépe charakterizované přírodní makromolekuly s definovanou biologickou aktivitou.

Specifičnost – protilátky jsou bílkovinné produkty B lymfocytů imunitního systému vznikající v reakci na cizí bílkoviny, tzv. antigeny. Protilátky slouží jako markery. Po vazbě na antigen může být tento antigen rozpoznán a zničen fagocytózou. Krátká sekvence aminokyselin na antigenu, kterou je monoklonální protilátka schopná rozpoznat, se nazývá epitop (Franěk et al. 1986).

3.2 Produkce monoklonálních protilátek

Fúzí plasmatických buněk s myelinovými buňkami byly získány hybridní buňky, které dostaly nesmrtelnost od myelinových buněk a schopnost produkovat protilátky od plasmatických buněk.

Produkce MAbs se skládá ze tří základních kroků: 1. konstrukce B hybridomů, 2. testování získaných klonů na produkci protilátky požadované specifity, 3. pomnožení vybraných hybridomů. Fúzované buňky se nasazují do 96-ti jamkových mikrotitračních panelů se selektivním HAT (hypoxantin, aminopterin, thymidin) médiem. Po 5 – 10 dnech jsou viditelné kolonie hybridomových buněk. K testování hybridomů na produkci požadovaných protilátek se užívá technika: ELISA, RIA a IFAT (Köhler et Milstein 1975).

3.3 Zkřížená reaktivita

Zkřížená reaktivita nastává, pokud protilátka vyvolaná jedním antigenem reaguje s antigenem jiným. K této reakci může dojít, pokud odlišné antigeny nesou společný epitop nebo pokud se protilátka specifická pro jeden epitop váže na epitop jiný, ale chemicky podobný. Pokud protilátka reaguje s jiným antigenem, váže se na něj s nižší afinitou (Franěk et al. 1986).

3.4 Použití monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky lze použít jako proby pro proteiny a hormony, jako specifická agens se používají pro testování histokompatibility, identifikaci a likvidaci nádorových buněk, imunoterapii, purifikaci proteinů, identifikaci povrchových antigenů na lymfocytech a nádorových buňkách. Stovky monoklonálních protilátek usnadňují diagnostiku infekčních chorob, detekci množství drog a terapeutických léků, detekci diabetu, průkaz těhotenství, mapování HLA antigenů a diagnostiku parazitických onemocnění (Nakanuta 1983).

4 IMUNOLOGICKÉ METODY

4.1 Detekce antigenu pomocí fluorescenčně značené protilátky

Vazba antigen – protilátka je vizualizována označením protilátky fluorochromem. Nejčastěji využívanými flouochromy jsou: fluorescein a rhodamin. Oba mohou být konjugovány s Fc oblastí protilátkové molekuly aniž by došlo k poškození antigen – vazebné kapacity. V přímé metodě je fluorochromem značena protilátka proti sledovanému antigenu. V nepřímé metodě se k vizualizaci této protilátky se používá značené antiizotypové protilátky nebo značeného proteinu A, nebo je jedna z protilátek konjugována s biotinem a k jejímu průkazu se použije streptavidin konjugovaný s flouofchromem. Nepřímá metoda je citlivější než přímá (Dráber et al. 1987).

Některé kity obsahují Evansovu modř, která snižuje nespecifickou fluorescenci a vytváří červené pozadí fluorescence. Nespecifická fluorescence je žlutá. Vždy by měla být provedena pozitivní kontrola, aby bylo zajištěno, že velikost, tvar a barva daných oocyst jsou v souladu s ustanoveními pozitivní kontroly. Modrý filtr (excitace 490 nm; emise 510 nm) se používá k zobrazení FITC-C-MAbs a ultrafialová excitace (excitace 355 nm; emise 450 nm) může být použita k určení přítomnosti 4',6-diamidino-2-fenyl indolu (DAPI), který barví jádra sporozoitů (Nichols et al. 2006).

Jsou doporučována tři kritéria pro identifikaci oocyst kryptosporidií pomocí

- imunofluorescence:
1. charakteristická zelená fluorescence vymežující stěnu oocysty
 2. kulovité nebo mírně vejčité objekty
 3. velikost 4 – 6 μm v průměru

4.2 Detekce antigenu pomocí enzymem značené protilátky

Zpočátku se EIA (Enzym Immunoassay) a ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) systémy lišily v provedení testu, ale obě techniky jsou založeny na principech oddělování vázané a nevázané reagentie ke zvýšení stanovení specifčnosti, citlivosti a přesnosti a detekce analytu protilátky. K dispozici jsou

komerční kity založené na enzymem značené protilátce k určení antigenu kryptosporidií. Antigeny kryptosporidií lze hledat ve vzorcích stolice s nebo bez přítomnosti oocyst (Smith 2008).

4.2.1 Enzym Immunoassay

EIA je užitečná, protože: 1. látky, jako jsou protilátky nebo antigeny, mohou být pasivně absorbovány do povrchu pevných látek; 2. jeden z reaktantů je připojen k pevné fázi, tak je oddělení vázané a nevázané reagensie snadno proveditelné. EIA může nabídnout větší specifickou, citlivost, přesnost prostřednictvím MAbs a praktičnost, také například stabilitu, rychlost provedení a automatizaci potenciálu.

Ne všechny komerční protilátky rozpoznají všechny antigeny oocyst *C. parvum* a *C. hominis*, a ačkoli jak rozpustné tak nerozpustné antigeny jsou zachyceny EIA, protilátky použité v kitu EIA nemohou reagovat nebo reagují slabě s antigeny některých druhů *Cryptosporidium*, které jsou geneticky vzdálené od *C. parvum* a *C. hominis*. V tomto případě je rozumné použít diagnostické metody založené na odlišných principech (např. konveční barvení, metody založené na PCR) (Smith 2008).

4.2.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Hlavní důvody, proč ELISA převládá v diagnostice infekčních chorob, jsou: 1. pasivní absorpce na 96-ti jamkové titrační panely umožňuje snadnou manipulaci a výdej reagensie, použití malých objemů reagensií a možnost rychle manipulovat s velkým množstvím vzorků; 2. barevnou reakci lze přečíst pouhým okem nebo pomocí speciálně konstruovaných vícekanálových spektrofotometrů, umožňujících elektronické předávání dat.

Sendvičový test ELISA je založen na principu, kdy protilátky navázané v jamkách mikrotitračního panelu zachycují a váží antigen. Druhá protilátka se váže na vystavené epitopy na zachyceném antigenu. Antigen je zachycen mezi dvě protilátky, z toho plyne pojmenování „sendvičová“. Tato reakce může být zobrazena dvěma způsoby: buď druhá protilátka může být označena enzymem, či je enzymem označena třetí protilátka, která se váže na protilátku druhou. Použitím protilátky

značené třetím enzymem může dojít ke zvýšení citlivosti testu. Reakce je zobrazena po přidání substrátu, který je katalyzován enzymem k produkci rozpustné barvy, jejíž intenzita může být posouzena vizuálně nebo spektrofotometrem. Pozitivní reakce jsou kvalitativní a jsou vnímány jako změna barvy na určitém místě panelu. Rychlost interakce antigen-protilátka u sendvičového testu ELISA je určena molekulární difúzí antigenu a zachycené protilátky, obvykle reakce trvá asi jednu hodinu. Některé komerční ELISA kity jsou lepší k detekci infekce než jsou některé IF kity (Garcia et Shimizu 1997; Graczyk et al. 1996).

Klinické vzorky mohou být nefixované nebo fixované v 10% formalinu, SAF, PVA nebo v jiném fixačním prostředku.

4.2.3 Copro-Antigen Detection Immunoassays

Copro-antigen detection immunoassays jsou méně časově náročné, snazší mikroskopické metody a nenabízí žádné zvýšení citlivosti nad mikroskopii. Jednou z neocenitelných výhod je, že mohou být použity v případech infekce za nepřítomnosti detekovatelných oocyst. Uváděná specifita je vysoká (98 – 100 %) (Smith 2008).

4.2.4 Immunochromatographic Assays

Immunochromatographic Assays (ICA) nabízí diagnostickým laboratořím vhodnou alternativní metodu pro provedení testů pro zjištění antigenu kryptosporidií ve vzorcích stolice. Hlášená specifita je vysoká (98 – 100 %). IC testy mohou být rovněž neocenitelné v případech infekce za nepřítomnosti zjiřitelných oocyst (Smith 2008).

5 CÍLE PRÁCE

- Zpracovat kriticky literární rešerši o tématu
- Pomocí hybridomové techniky připravit monoklonální protilátky proti *Cryptosporidium muris*
- Vybrané protilátky charakterizovat na úrovni specifity a senzitivity
- Otestovat připravené protilátky proti dalším druhům rodu *Cryptosporidium*

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Experimentální zvířata

- krysy malé (*Mastomys coucha*)
- imunokompetentní myši BALB/c

6.2 Paraziti

- *Cryptosporidium muris* izolát TS03 původně získán z hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) byl dlouhodobě v laboratorních podmínkách udržován pasážováním přes krysy malé (*Mastomys coucha*)
- *Cryptosporidium parvum* izolát izolován z trusu telete (*Bos taurus*) byl pasážován přes SCID myši
- *Cryptosporidium andersoni* izolován z trusu dospělého kusu skotu (*Bos taurus*)
- *Cryptosporidium mouse* genotype I byl získán z přirozeně infikované myši (*Mus musculus musculus*) a dlouhodobě pasážován přes SCID myši

6.3 Skladování a uchování vzorku

- trus infikovaných experimentálně infikovaných zvířat byl shromažďován do plastových nádob a uchováván v 2,5% dichromanu draselném ve tmě při 4 °C

6.4 Parazitologické vyšetření

K detekci oocyst kryptosporidií v trusu experimentálně infikovaných zvířat za účelem získání dostatečného množství korpuskulárního antigenu bylo použito barvení podle Miláčka a Vítovce (1985).

použité chemikálie a roztoky:

- metanol
- roztok metylvioleti (0,6 g metylvioleti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml alkoholu, 70 ml deonizované vody)
- 2% H₂SO₄
- tartrazin (1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové)

postup:

- podložní sklíčko s tenkým nátěrem trusu bylo fixováno metanolem v plameni
- preparát byl barven roztokem metylvioleti po dobu 30 min
- po uplynulé době byl preparát opláchnut vodovodní vodou a diferencován 2 – 3 min v 2% H₂SO₄
- preparát byl opláchnut vodovodní vodou a dobarven tartrazinem po dobu 2 – 3 min
- preparát opět opláchnut vodovodní vodou a sušen
- preparát byl prohlížen světelným mikroskopem (Olympus BX 51), při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje
- při nízké intenzitě byly počítány všechny oocysty v preparátu, při vysoké intenzitě počítány oocysty ve 30 náhodných zorných polích, tím byla odhadnuta intenzita infekce (Kváč et al. 2007).

6.5 Purifikace oocyst

6.5.1 Sacharózový gradient

použité chemikálie a roztoky:

- Sheaterův roztok (259 ml deionizované vody, 405 g cukru, 7,29 g fenolu)
- PBS+Tween (0,05% roztok Tween 20 v PBS) (Phosphate buffered saline)
- Sheaterovy pracovní roztoky:
 - roztok A: 1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly PBS tween
 - roztok B: 1 díl Sheaterova roztoku + 4 díly PBS tween

postup:

- trus experimentálních zvířat s oocystami kryptosporidií byl homogenizován v třecí misce v deionizované vodě a přecezen přes sítko
- do skleněných centrifugačních kyvet o objemu 100 ml byl navrstven sacharózový gradient:
 1. vrstva: 30 ml Sheater roztok A
 2. vrstva: 30 ml Sheater roztok B
 3. vrstva: 15 ml vodného roztoku vzorku
- následovala centrifugace po dobu 20 min při 1370 g a 4 °C
- vodní vývěvou byla odsána horní zbarvená vrstva (cca $\frac{1}{3}$ objemu zkumavky), zbytek supernatantu byl přenesen to čisté kyvety a objem doplněn deionizovanou vodou
- následovala centrifugace po dobu 20 min při 1370 g a 4 °C
- $\frac{1}{2}$ objemu byla odsána a objem doplněn deionizovanou vodou, centrifugace 20 min při 1370 g a 4 °C, tento krok byl opakován ještě jednou, celkem byl tedy proveden 3×
- nakonec byl odsán téměř všechn supernatant, pelet s oocystami byl skladován ve tmě při 4 °C v deionizované vodě

6.5.2 Cesium chloridový gradient

použité chemikálie a roztoky:

- roztok Cesium chloridu (21,07 g CsCl + 100 ml dH₂O)
- PBS (pH 7,2)

postup:

- oocysty po přečištění na sacharózovém gradientu byly centrifugovány po dobu 20 min při 1500 g a 4 °C
- supernatant byl odebrán a k peletu s oocystami byl přidán PBS
- do čisté 2 ml mikrokumavky byl napipetován 1 ml CsCl a převrstven 0,5 ml roztoku oocyst v PBS
- centrifugace po dobu 3 min při 16 000 g a 4 °C
- po centrifugaci byl odebrán 1 ml supernatantu s oocystami (vytvoří prstenec na rozhraní PBS a CsCl)
- suspenze oocyst byla naředěna nadbytkem PBS
- centrifugace po dobu 3 min při 16 000 g a 4 °C
- supernatant byl opět odsán a vzorek centrifugován 3 min při 16 000 g a 4 °C
- přečištěné oocysty byly skladovány ve tmě při 4 °C v deionizované vodě

6.5.3 Odstranění bakterií antibiotiky

použité chemikálie a roztoky:

- směs antibiotik a antimykotik (SIGMA)
- PBS (pH 7,2)

postup:

- oocysty přečištěné na CsCl byly centrifugovány po dobu 10 min při 16 000 g a 4 °C
- supernatant byl odsán a k peletu bylo přidán roztok PBS s přídatkem 10 % antibiotik a antimykotik
- suspenze byla promíchána a skladována ve tmě při 4 °C

6.5.4 FACS sorter

- po shromáždění dostatečného množství oocyst kryptosporidií *C. muris*, byla pomocí FACS sorteru (Becton Dickinson) (Mikrobiologický ústav AVČR, Praha 4 – Krč) nastaveného tak, aby odseparoval pouze oocysty na základě velikosti a hustoty objektu, získána suspenze obsahující čisté oocysty kryptosporidií .
- množství potřebných oocyst bylo stanoveno tak, aby byly získány čtyři dávky 10^6 oocyst/myš

6.6 Příprava monoklonálních protilátek

6.6.1 Imunizace

- myši kmene BALB/c byly intraperitoneálně imunizovány dávkou 10^6 oocyst *Cryptosporidium muris* ve 200 μ l PBS celkem třikrát ve 14-ti denních intervalech
- čtvrtá dávka byla aplikována tři dny před provedením buněčné fúze
- množství oocyst bylo stanoveno mikroskopicky počítáním v Bürkerově komůrce
- po poslední imunizační dávce byla imunizovaným myším odebrána krev z retroorbitálního sinu a metodou IFAT ověřena přítomnost specifických protilátek proti antigenním determinantám *C. muris*

6.6.2 Buněčná fúze

- myš byla humánně usmrcena zlomením vazů a její slezina byla sterilně vyjmuta do média RPMI-1640 bez séra
- protlačením sleziny přes sítko byly získány splenocyty, které byly následně dvakrát promyty médiem RPMI-1640 bez séra a centrifugovány při 120 g po dobu 5 min

- myelinové buňky Sp 2/0–Ag–14 byly promyty médiem RPMI–1640 bez séra a smíchány se splenocyty
- vzniklá suspenze byla centrifugována při 120 g 5 min a ve vodní lázni o teplotě 37 °C byla provedena fúze
- po dobu jedné minuty byl ke směsi buněk přikapáván za stálého míchání 1 ml vytemperovaného roztoku PEG (polyetylglykol (Boehringer Mannheim))
- poté byla směs promíchávána po dobu jedné minuty, dále bylo ke směsi po dobu 10 minut za stálého míchání přikapáváno 10 ml vytemperovaného média RPMI–1640 bez séra
- následně byla směs centrifugována při 120 g 5 min a rosuspendována ve 200 ml RPMI–1640 s 10 % BOFES + ATB + 6L + ME + HAT
- buňky byly rozkapány po 200 µl do deseti 96-ti jamkových panelů
- inkubace probíhala v 3,5% atmosféře CO₂ při 37 °C, po pěti dnech se začaly objevovat první kolonie
- z jamek s dostatečně narostlými koloniemi byly odebrány vzorky média na testování produkce specifických protilátek metodou nepřímé imunofluorescence
- pozitivní hybridomové kultury byly pomnoženy ve 24 jamkových panelech v kultivačním médiu RPMI–1640 s 10 % BOFES + ATB + 6L + ME
- hybridomové buňky byly rozděleny do zamrazovacích lahvíček (NUNC) s 900 µl média RPMI–1640 s 10 % BOFES + ATB + 6L + ME a 100 µl DMSO (dimetylsulfoxid) (SIGMA)
- takto připravené buňky byly zmrazeny v parách tekutého dusíku a uloženy do Dewarovy nádoby s tekutým dusíkem (-196 °C)

6.6.3 Klonování

Hybridomové buňky produkující specifické protilátky byly klonovány metodou limitního ředění.

- suspenze buněk byla ředěna médiem RPMI-1640 s 5 % BOFES + ATB + 6L + ME + HAT tak, aby na jednu jamku kultivačního panelu připadlo maximálně 5 buněk
- narostlé kolonie byly testovány na produkci monoklonálních protilátek metodou nepřímé imunofluorescence
- pro stabilizaci kultur hybridomových buněk produkujících monoklonální protilátky bylo provedeno opakované pasážování, které je doporučováno provést několikrát v průběhu dlouhodobé kultivace

6.6.4 Produkce monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky (MAbs) byly získány *in vitro* ve formě kultivačního média z hybridomových kultur a ve formě ascitických tekutin při *in vivo* kultivaci hybridomových buněk.

- myši BALB/c byly intraperitoneálně inokulovány 0,5 ml 2, 6, 10, 16 – tetra-methyl-pentadecane (SIGMA)
- po týdnu byly myši intraperitoneálně inokulovány suspenzí hybridomových buněk o koncentraci 10^6 buněk/ml
- po 10 dnech se jim vytvořila ascitická tekutina, která byla po usmrcení myši odebrána a rozpipetována po 50 μ l do mikrozkušavek typu eppendorf a poté zamražena při -20 °C v mrazicím boxu
- protilátková specifita v supernatantech hybridomových kultur byla průběžně testována metodou nepřímé imunofluorescence

6.6.5 Nepřímá imunofluorescence

Metoda IFAT byla prováděna podle Chalupského a kol. (1973) s mírnou modifikací, ke které se dospělo po praktických zkušenostech v laboratoři veterinární a medicínské protistologie PaÚ AV ČR v Českých Budějovicích.

- přečištěné oocysty kryptosporidií byly nakoutovány na 10-ti jamková sklíčka odmaštěná 96 % alkoholem v počtu 10^5 na jamku, což při 10 μ l na jamku odpovídá výchozí koncentraci 10^7 oocyst/ml
- sklíčka se nechala schnout 24 hod při 4 °C v chladničce
- média z hybridomových kultur byla nakapána na sklíčka s navázaným antigenem (10 μ l na jamku), přičemž dvě jamky byly určeny pro pozitivní a negativní kontrolu
- jako pozitivní kontrola byl použit Krypto Cel Reagent (Cellabs Pty Ltd) ředěný v poměru 1 : 9 deionizovanou vodou
- jako negativní kontrola bylo použito sérum z *Cryptosporidium* negativních myší
- sklíčka byla inkubována ve vlhké komůrce 45 min v termostatu při teplotě 37 °C
- následně byla promyta v PBS+TWEEN po dobu 2×2 min
- po oschnutí v bezprašném prostředí bylo do všech jamek nakapáno 10 μ l prasečího konjugátu proti myším imunoglobulinům IgG značeného fluoresceinem – SwAM/FITC ředěného v poměru 1 : 20 0,5% roztokem Evansovy modře v PBS (Evansova modř zhasí přirozenou nespecifickou fluorescenci a je proto velmi důležitou součástí naředěného konjugátu)
- takto připravená sklíčka byla inkubována ve vlhké komůrce 30 min v termostatu při 37 °C
- následovalo promytí v PBS+TWEEN po dobu 2×2 min
- po oschnutí v temném a bezprašném prostředí byly jamky převrstveny pufovaným glycerolem a překryty krycím sklíčkem
- poté byla sklíčka prohlížena fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX 70) při zvětšení 40 \times a vlnové délce 520 nm

Výsledek pozorování ve fluorescenčním mikroskopu byl hodnocen negativně (-), pokud nebyla pozorována žádná fluorescence oocyst, nebo pozitivně, kdy byla pozorována žlutozelená fluorescence oocyst (škála positivity podle svítivosti od + do ++++).

7 VÝSLEDKY

7.1 Příprava monoklonálních protilátek

Po fúzi myelinových buněk se splenocyty myši BALB/c imunizované čtyřmi dávkami oocyst *C. muris* bylo získáno 549 hybridomů, z nichž 209 produkovalo protilátky reagujících s antigeny kryptosporidií. Metodou IFAT bylo vybráno 10 hybridomů, které vykazovaly nejvyšší protilátkovou aktivitu. Tyto hybridomy byly klonovány metodou limitního ředění a bylo získáno 46 subklonů produkujících monoklonální protilátky. Metodou IFAT byla opět stanovena specifičnost. Konečný počet dlouhodobě stabilních subklonů produkujících protilátky byl stanoven jako 7. Tyto subklony byly označeny: 1/A5, 2/E3, 3/C5, 4/G4, 5/A3, 7/C2, 9/C3. Kolonie těchto subklonů byly použity k přípravě ascitických tekutin.

7.2 Charakterizace monoklonálních protilátek

Afinita monoklonálních protilátek byla vyhodnocena pomocí IFAT. Počet křížků udává intenzitu pozitivní reakce (od ++++ do +), zatímco negativní reakce je značena znaménkem –.

Titrací monoklonálních protilátek pomocí metody IFAT (Tab. II) byla pozorována pozitivní reakce do titru 6400 pro 1/A5, 2/E3, 3/C5, 5/A3, 9/C3 a do titru 3200 u monoklonální protilátky 4/G4, 7/C2 (Obr. 2A).

Tab. II: Výsledky testování protilátek proti *C. muris*.

MAb/ředění	1:10	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
1/A5	++++	++++	+++	+++	+++	++	++	+	–
2/E3	+++	++++	++++	+++	+++	++	++	+	–
3/C5	++	+++	+++	++++	+++	++	++	+	–
4/G4	+++	++++	+++	+++	++	+	+	–	–
5/A3	++	+++	++++	+++	+++	++	+	+	–
7/C2	++++	++++	+++	+++	++	++	+	–	–
9/C3	+++	++++	++++	+++	+++	++	++	+	–

7.3 Zkřížená reaktivita

Dále bylo těchto 7 protilátek testováno na zkříženou reaktivitu s antigeny jiných zástupců rodu *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. andersoni* a *Cryptosporidium* mouse genotype I). Titrace byla provedena metodou IFAT. Všechny testované protilátky vykazovaly pozitivní zkříženou reakci s *C. parvum*, *C. andersoni* a *Cryptosporidium* mouse genotype I.

Nejvyšší titr proti antigenům *C. parvum* (Tab. III) vykazovala protilátka 2/E3, 3/C5 a to k titru 800 (Obr. 2B). Nejvyšší titr proti antigenům *C. andersoni* (Tab. IV) byl 800 a vykazovaly ho protilátky 1/A5, 2/E3, 3/C5 a 5/A3 (Obr. 2C). U *Cryptosporidium* mouse genotype I (Tab. V) byla hodnota nejvyššího titru 800 u protilátky 2/E3, 3/C5 a 5/A3 (Obr. 2D).

Tab. III: Výsledky testování anti-*C. muris* protilátek proti *C. parvum*.

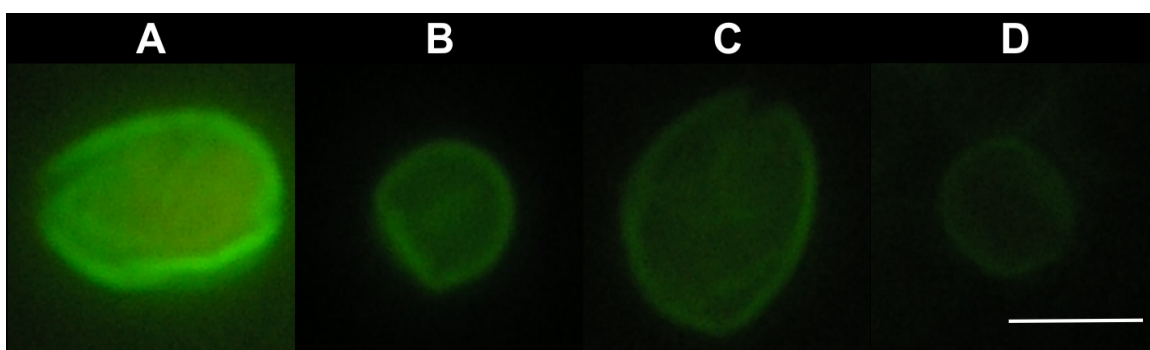
MAb/ředění	1:10	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
1/A5	+++	++	++	+	–	–	–
2/E3	+++	+++	++	+	+	–	–
3/C5	–	+++	+++	++	+	–	–
4/G4	+++	+++	++	+	–	–	–
5/A3	–	+++	++	+	–	–	–
7/C2	+++	+++	++	+	–	–	–
9/C3	+++	+++	++	+	–	–	–

Tab. IV: Výsledky testování anti-*C. muris* protilátek proti *C. andersoni*.

MAb/ředění	1:10	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
1/A5	+++	+++	++	++	+	–	–
2/E3	++++	+++	++	++	+	–	–
3/C5	++++	+++	+++	++	+	–	–
4/G4	+++	+++	++	+	–	–	–
5/A3	++++	+++	++	++	+	–	–
7/C2	+++	+++	++	+	–	–	–
9/C3	++++	+++	++	+	–	–	–

Tab. V: Výsledky testování protilátek anti-*C. muris* proti *Cryptosporidium* mouse genotype I.

MAb/ředění	1:10	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
1/A5	+++	+++	++	+	-	-	-
2/E3	++++	+++	+++	++	+	-	-
3/C5	++++	+++	++	+	+	-	-
4/G4	++++	+++	++	+	-	-	-
5/A3	++++	+++	++	+	+	-	-
7/C2	++++	+++	++	+	-	-	-
9/C3	+++	+++	++	+	-	-	-



Obr. 2: Testování specifity monoklonální protilátky 3/C5 ředěné 1:400 pomocí metody nepřímé imunofluorescence. A - *C. muris*, B - *C. parvum*, C - *C. andersoni*, D - *C. mouse* genotype I. Měřítka 5 μ m.

8 DISKUZE

Cryptosporidium muris izolované z žaludku laboratorních myší bylo poprvé popsáno Tyzzerem v roce 1907. Tyzzerovi se podařilo infikovat myši tím, že je krmil žaludeční sliznicí a žaludečním obsahem infikovaných myší. Rod *Cryptosporidium* je infekční nejen pro krysy, ale i myši, morčata, králíky, psy, kočky a další. Ovšem hlavním hostitelem *C. muris* jsou hlodavci. Další experimenty prokázaly, že *C. muris* mohou být infekční i pro člověka (Iseki et al. 1989). O 11 let později byl zaznamenán první případ infekce *C. muris* u člověka (Katsumata et al. 2000).

Jedním ze základních předpokladů úspěchu při výrobě monoklonálních protilátek je výběr detekční metody. Při výběru metody je důležité: 1. budoucí využití protilátky (např: ve vazebném testu, v cytotoxickém testu), 2. citlivost (především v době přípravy hybridomů, jsou koncentrace protilátek nízké), 3. jednoduchost (při konstrukci je nutné testovat až stovky vzorků a výsledky musí být mnohdy rychle vyhodnoceny), 4. spolehlivost (používat pozitivní a negativní kontroly). Nejrozšířenější jsou testy v "pevné fázi", kdy je jedna ze složek vázna adsorpcí nebo kovalentně na pevný povrch nosičů (destičky, sklíčka). K detekci produkce monoklonálních protilátek je možné použít i radioimunologické testy, které dosahují vyšší citlivosti než enzymoimunologické testy. Doporučovány jsou testy enzymoimunologické vzhledem k jejich dostupnosti (Dráber et al. 1987)

Na průkaz přítomnosti oocyst ve vzorcích může být použita přímá nebo nepřímá fluorescence za pomoci MAbs proti antigenům na stěně oocyst kryptosporidií (C-MAbs). Tyto metody jsou citlivé a specifické a slouží také k detekci oocyst v nátěru stolice (Arrowood et Sterling 1989; Garcia et al. 1987; McLauchlin et al. 1987; Sterling et Arrowood 1986; Stibbs et Ongerth 1986). Bylo vyvinuto mnoho MAbs rozpoznávajících epitopy na povrchu oocyst. Přímé a nepřímé fluorescenční detekce protilátek mohou být citlivější než konvenční metody barvení (Arrowood et Sterling 1989; Stibbs et Ongerth 1986). Komerčně dostupné FITC-C-MAbs se běžně používají pro detekci a kvantifikaci oocyst v environmentálních vzorcích (Smith et Grimason 2003; Smith et Rose 1990).

Neexistuje žádná komerčně dostupná látka specificky zaměřená proti epitopům oocyst lidských nebo zvířecích patogenních kryptosporidií. Různé MAbs se komerčně využívají k rozpoznání různých souborů povrchových epitopů (Smith et Roland 2001), tak může být intenzita fluorescenční emise závislá na izolované oocystě a FITC-C-MAB

přítomné v kitu. Většina, pokud ne všechny komerčně dostupné MAbs byly vytvořené proti epitopům omezeného množství isolátů *C. parvum*. Na základě vystavovaných epitopů oocyst v rámci rodu *Cryptosporidium* se očekává odlišnost. Je pravděpodobné, že u oocyst odlišných druhů a genotypů, stejně jako u některých isolátů v rámci druhu nebo genotypu, bude fluorescence méně intenzivní. To je třeba mít na paměti při vyšetřování jak vzorků klinických, tak vzorků z životního prostředí (Fayer 2008).

Ve své práci jsem pro průkaz protilátek použila metodu nepřímé fluorescence, kde bylo zřetelně vidět, že svítí pouze povrch oocysty, připravené MAbs byly zaměřeny proti antigenům na stěně oocysty *C. muris*. Vnitřek oocysty byl zbarven červeně působením Evansovy modře, z čehož vyplývá, že se zde protilátky nevázaly. Výsledek bylo možné hodnotit na základě barevné reakce vizuálně. Tato specifická reakce dává IFAT testu výhodu oproti různým typům barvení a dalším imunologickým testům např: ELISA. Na základě antigenní specifity mohou být protilátky dvojího typu: 1. reagující s povrchovými antigeny; 2. reagující s antigeny uvnitř oocysty. Ovšem častěji vznikají protilátky, které se váží na povrchové antigeny oocyst díky jejich přímé expozici imunitnímu systému. Metodou IFAT byla prokázána dlouhodobá stabilní produkce specifických monoklonálních protilátek pouze u 7 z 549 hybridomů.

Po ředění MAbs byl metodou IFAT získán nejvyšší titr pozitivity 6400 pro protilátky 1/A5, 2/E3, 3/C5, 9/C3, 5/A3 a 3200 u monoklonální protilátky 4/G4, 7/C2. Výše titru udává vlastnosti protilátky: čím vyšší titr, tím vyšší bude specifita a afinita protilátky k antigenu. Metoda IFAT je ovlivněna chybami pozorovatele, není tedy stoprocentní. Specifita a afinitu protilátek lze také ověřit ELISA testem. Nicméně vyhodnocení ELISA testem v případě použití korpuskulárního antigenu získaného z trusu může vést k získání falešně pozitivních výsledků způsobeného vazbou protilátek, ať již primárních či značených sekundárních na pozadí obsahující bakterie a jiný detrit. Z tohoto hlediska byla k vyhodnocování specifity protilátek používána metoda IFAT.

Aby bylo možné určit jak moc jsou připravené protilátky specifické, byly testovány na zkříženou reaktivitu, což je reakce monoklonálních protilátek s antigeny u nichž se předpokládá strukturní příbuznost. Někdy může být příčina triviální: protilátka není zaměřena proti vlastní polypeptidické části antigenu, ale proti jeho součásti vzniklé postsynetickou modifikací přírodní (glykosylace) nebo umělé (fixační prostředek). Existují případy, kdy je toto vysvětlení vyloučeno a vznikají

ne zcela kvalifikované závěry o nízké specifitě monoklonálních protilátek a tedy o jejich omezené použitelnosti (Franěk et al. 1986).

K testování protilátek proti povrchovým antigenům *C. muris* na zkříženou reaktivitu byla opět použita metoda IFAT. Výsledkem bylo zjištění zkřížené reakce s *C. parvum*, *C. andersoni* a *Cryptosporidium* mouse genotype I, nicméně titer byl nižší než u *C. muris*, 800 u protilátky 2/E3, 3/C5 proti antigenům *C. parvum*, 1/A5,2/E3, 3/C5, 5/A3 pro antigenům *C. andersoni* a u protilátek 3/C5, 5/A3 proti antigenům *Cryptosporidium* mouse genotype I. Pokud bychom chtěli získat protilátky o vyšší specifitě, museli by projít dalšími testováními a řadou úprav.

Mnou připravené monoklonální protilátky reagující s povrchovými antigeny oocyst jsou použitelné jak pro žaludeční, tak pro střevní kryptosporidie, což umožňuje univerzální použití v laboratorní praxi. Navíc pomocí titrování protilátek lze úspěšně odlišit jednotlivé, i morfologicky neodlišitelné druhy kryptosporidií.

9 Závěr

Připravila jsem 7 stabilních subklonů, které produkují specifické monoklonální protilátky proti antigenům *C. muris*. Metodou nepřímé imunoflouescence byl stanoven titr protilátek, který byl vysoký (3200 a 6400).

Testované protilátky reagovaly zkříženě s antigeny dalších druhů rodu *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. andersoni* a *Cryptosporidium* mouse genotype I), ale titr byl menší (800).

Připravené monoklonální protilátky reagují s povrchovými antigeny oocyst a jsou použitelné pro rutinní laboratorní detekci žaludečních a střevních kryptosporidií v klinických vzorcích a mohou posloužit k druhové identifikaci kryptosporidií.

10 LITERATURA

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

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

Anderson B.C. 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. Vet. Pathol. 24: 235 – 238.

Arrowood M.J., Sterling C.R. 1989. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. J. Clin. Microbiol. 27: 1490 – 1495.

Aydin Y. 1997. The ultrastructure of the parasite and the mucus cell relationship and endogenous stages of *Cryptosporidium muris* in the stomach of laboratory mice. Tr. J. Vet. A. Sci. 23: 117 – 125.

Blanshard C., Jackson A.M., Shanson D.C., Francis N., Gazzard B.G. 1992. Cryptosporidiosis in HIV–seropositive patients. Q. J. Med. 85: 813 – 823.

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.

Current W.L. 1985. Cryptosporidiosis, a protozoologist's view of an emerging zoonosis. Microecol. Ther. 15: 165 – 200.

Current W.L. 1988. The biology of *Cryptosporidium*. Am. Soc. Microbiol. News 54: 605 – 611.

Current W.L., Garcia L.S. 1991. Cryptosporidiosis. Clin. Microbiol. Rev. 4: 325 – 358.

Current W.L., Reese N.C., Ernst J.V., Bailey W.S., Heyman M.B., Weinstein W.M. 1983. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. N. Engl. J. Med. 308: 1252 – 1257.

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.

Ditrich O., Palkovic L., Sterba J., Prokopic J., Loudova J., Giboda, M. 1991. The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. Parasitol. Res. 77: 44 – 47.

Dolejš P. 2004. *Cryptosporidium* a *Giardia*: přehled vodárenské problematiky za první desetiletí po událostech Milwaukee (USA). Vodní hospodářství 54: 271 – 273.

Domenéch-Sánchez A., Olea F., Berrocal C.I. 2008. Infection related to recreational waters. Enferm. Infec. Microbiol. Clin. 26: 32 – 37.

Dráber P., Dušková B., Hořejší V., Němec M., Sládeček M., Slavíčková A., Viklický V. 1987. Monoklonální protilátky pro diagnostické účely. Ústav molekulární genetiky ČSAV, Praha 75pp.

DuPont H., Chappell C., Sterling C.R., Okhuysen P.C., Rose J.B., Jakobowski W. 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. N. Engl. J. Med. 332: 855 – 859.

Elliot D.A., Coleman D.J., Lane M.A., May R.C., Machesky L.M., Clark D.P. 2001. *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerisation. Infect. Immun. 69: 5940 – 5942.

Fayer R. 2003. *Cryptosporidium*: From molecules to disease. In: Thompson R.C.A., Armson A., Ryan U.M. (Eds.), *Cryptosporidium*: From molecules to disease. Elsevier. pp. 11 – 18.

Fayer R. 2008. The general biology of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Fayer R. and Xiao L. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1 – 42.

Fayer R., Morgan U., Upton S.J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30: 1305 – 1322.

Fayer R., Santín M. 2009. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 164: 192 – 200.

Fayer R., Santin M., Macarisin D. 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172: 23 – 32.

Fayer R., Santín M., Trout J.M. 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156: 191 – 198.

Fayer R., Santin M., Xiao L. 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91: 624 – 629.

Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P. 1990. General biology of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidiosis of Man and Animals*, Dubey J.P., Speer C.A. and Fayer R. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1 – 29.

Fayer R., Trout J.M., Xiao L., Morgan U., Lal A.A., Dubey J.P. 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87: 1415 – 1422.

Franěk F., Kovář J., Hořejší V., Dráber P. 1986. Monoklonální protilátky: příprava a použití. ČÚV společnosti průmyslové chemie, Praha. 64pp.

Garcia L.S., Brewer T.C., Bruckner D.A. 1987. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 25: 119 – 121.

Garcia L.S., Shimizu R.Y. 1997. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direkt fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 35: 1526 – 1529.

Gatei W., Greensill J., Ashford R.W., Cuevas L.E., Parry C.M., Cunliffe N.A., Beeching N.J., Hart C.A. 2003. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. J. Clin. Microbiol. 41: 1458 – 1462.

Graczyk T.G., Cranfield M.R., Fayer R. 1996. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (IFA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 54: 274 – 279.

Guyot K., Follet-Dumoulin A., Recort C., Lelievre C., Cailliez J.C., Dei-Cas E. 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. J. Clin. Microbiol. 39: 3472 – 3480.

Huang B.Q., Chen X.-M., LaRusso N.F. 2004. *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia *in vitro*, a morphological study. J. Parasitol. 90: 212 – 221.

Iseki M. 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. Jpn. J. Parasitol. 28: 285 – 307.

Iseki M., Maekawa T., Moriya K., Uni S., Takada S. 1989. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. Parasitol. Res. 75: 218 – 222.

- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Krížek J., Modrý D., Slapeta J. 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol.* 55: 81 – 98.
- Katsumata T., Hosea D., Ranuh I.G., Uga S., Yanagi T., Konho S. 2000. Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 505 – 508.
- Köhler G., Milstein C. 1975. Continuous cultures of focused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (London)* 256: 495 – 497.
- 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.
- Langer R.C., Riggs M.W. 1999. *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 67: 5282 – 5291.
- Lindsay D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R., Blagburn B.L. 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apikomlexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukar. Microbiol.* 47: 91 – 95.
- Levine N.D. 1970. Taxonomy of the sporozoa. *J. Protozool.* 56: 208-209.
- Levine N. D. 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa, Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66: 830 – 834.
- Lumb R., Smith K., O'Donoghue P.J., Lanser J.A. 1988. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitol. Res.* 74: 531 – 536.

MacKenzie 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 water supply. N. Eng. J. Med. 331: 161 – 167.

Matsui T., Fujino T., Tsuji M. 1999. Infectivity to hosts of the endogenous stages of chicken and murine *Cryptosporidium*. J. Vet. Med. Sci. 61: 471 – 474.

McLauchlin J., Casemore D.P., Harrison T.G., Gerson P.J., Samuel D., Taylor A.G. 1987. Identification of *Cryptosporidium* oocysts by monoclonal antibody. Lancet 329: 51.

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.

Meutin D.J., Van Kruiningen H.J., Kein D.H. 1974. Cryptosporidiosis in a calf. J. Am. Vet. Med. Assoc. 165: 914 – 917.

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

Nakanuta R.M. 1983. Monoclonal antibodies: methods and clinical laboratory applications. Clin. Physiol. Biochem. 1: 160 – 172.

Navin T.R., Hardy A.M. 1987. Cryptosporidiosis in patients with AIDS. J. Infect. Dis. 155: 150.

- Newman R.D, Zu S.X., Wuhib T., Lima A.A.M., Guerrant R.L., Sears C.L. 1994. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. *Ann. Intern. Med.* 120: 500 – 505.
- Nichols R.A.B., Campbell B.M., Smith H.V. 2006. Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* species oocysts isolated during water monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5428 – 5435.
- 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'Hara S.P., Huang B.Q., Chen X.-M., Nelson J., LaRusso N.F. 2005. Distribution of *Cryptosporidium parvum* sporozoite apical organelles during attachment to and internalization by cultured biliary epithelial cells. *J. Parasitol.* 91: 995 – 999.
- Pancieria R.J., Thomassen R.W., Garner F.M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 479 – 484.
- Pavlásek I. 1999. Cryptosporidia, biology diagnosis, host spectrum, specificity and the environment. *Remedia. Clin. Microbiol.* 3: 290 – 302.
- Pavlásek I., Lavickova M., Horak P., Kral J., Kral B. 1995. *Cryptosporidium varanii* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus*) Schegel 1893 in captivity at Prague zoo. *Gazella* 22: 99 – 108.
- Pedraza-Diaz S., Amar C., McLauchlin J. 2000. The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 189 – 194.
- Pospischil A., Stiglmaier-Herb M.T., Hegel G., Wiener H. 1987. Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazells. *Vet. Rec.* 112: 379 – 380.

- Power M.L., Ryan U.M. 2008. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). J. Parasitol. 94: 1114 – 1117.
- Riggs M.W., Stone A.L., Yount P.A., Langer R.C., Arrowood M.J., Bentley D.L. 1997. Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. J. Immunol. 158: 1787 – 1795.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S.J., Katzer F., Bartley P.M., Hunter P.R. Nath M., Innes E.A. Chalmers R.M. 2010. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa, Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. Int. J. Parasitol. 40: 1539 – 1548.
- Ryan U.M., Monis P., Enemark H.L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R.C., Xiao L. 2004. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). J. parasitol. 90: 769 – 773.
- Ryan U.M., Power M., Xiao L., 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). J. Eukaryot. Microbiol. 55: 22 – 26.
- Slavin D. 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). J. Comp. Pathol. 65: 262 – 270.
- Smith H. 2008. The diagnostics of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Fayer R. and Xiao L. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 188 – 190.
- Smith H.V., Grimason A.M. 2003. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. In: The Handbook of Water and Wastewater Microbiology, Mara D. and Horan N. (Eds.), Elsevier Science Limited, Oxford, U.K., pp. 619 – 781.

Smith H.V., Ronald A. 2001. *Cryptosporidium*: the analytical challenge. In: *Cryptosporidium: The Analytical Challenge*, Smith M. and Thompson K. (Eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K. pp. 1 – 43.

Smith H.V., Rose J.B. 1990. Waterborne cryptosporidiosis. *Parasitol. Today* 6: 8 – 12.

Sterling C.R., Arrowood M.J. 1986. Detection of *Cryptosporidium* sp. infections using a direct immunofluorescent assay. *Pediatr. Infect. Dis.* 5: 139 – 142.

Sterling C.R., Seegar K., Sinclair N.A. 1986. *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea. *J. Infect. Dis.* 153: 380 – 381.

Stibbs H.H., Ongerth J.E. 1986. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *J. Clin. Microbiol.* 24: 517 – 521.

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

Tyzzar E.E. 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 5: 12 – 13.

Tyzzar E.E. 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric flanda of the common mouse. *J. Med. Res.* 23: 487 – 511.

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. 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol. Rev.* 47: 84 – 96.

Umemiya R., Fukuda M., Fujisaki K., Matsui T. 2005. Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice, *J. Parasitol.* 91: 1034 – 1039.

- Valigurová A., Hofmannová L., Koudela B., Vávra J. 2007. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. J. Eukar. Microbiol. 54: 495 – 510.
- Valigurová A., Jirků M., Koudela B., Gelnar M., Modrý D., Šlapeta J. 2008. Cryptosporidia: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. Int. J. Parasitol. 38: 913 – 922.
- Vetterling J.M., Jervis H.R., Merrill T.G., Sprinz H. 1971. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus* with an emendation of the genus. J. Protozool. 18: 243 – 247.
- Wetzel D.M., Schmidt J., Kuhlenschmidt M.S., Dubey J.P., Sibley L.D. 2005. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. Infect. Immun. 73: 5379 – 5387.
- Wetzel R. 1938. Ein neues Coccid (*Cryptosporidium vulpis* ap. Nov.) aus dem Rotfuchs. Arch. wissenschaftl. prakt. Tierheilk. 74: 39 – 40.
- Xiao L., Bern C., Limor J., Sulaiman I., Roberts J., Checkley W., Cabrera L., Gilman R.H., Lal A.A. 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. J. Infect. Dis. 183: 492 – 497.
- Yoshikawa H., Iseki M. 1991. Freeze-fracture studies of *Cryptosporidium muris*. J. Protozool. 38: 171 – 172.