

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4103 Zootechnika

Studijní obor: 4103T007 Zootechnika

Katedra: Zootechnických věd

Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Laparotomické infekce hostitelů střevními a žaludečnými
kryptosporidiiemi

Autor: Bc. Nikola Havrdová

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

Školitel specialista diplomové práce: MVDr. Jitka Prediger

České Budějovice, 2016

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

V Českých Budějovicích dne

.....
Bc. Nikola Havrdová

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala především mému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost. Dále pak všem pracovníkům laboratoře Veterinární a humánní protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za ochotu, přátelské jednání a cenné rady.

Velký dík také patří Veterinární klinice U Výstaviště, jmenovitě MVDr. Pavlu Predigerovi a MVDr. Jitce Prediger za spolupráci při operacích a RTG vyšetření. Dále za jejich cenné rady, čas a vstřícnou ochotu, bez které by experimenty v této práci nemohly být uskutečněny.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů GAČR (15-01090S) a GAJU (002/2016/Z).

ABSTRAKT

Zástupci rodu *Cryptosporidium* obývají epiteliální buňky gastrointestinálního traktu různých obratlovčích hostitelů. Tito paraziti se evolučně rozdělili do dvou skupin, na druhy infikující žláznatý žaludek svých hostitelů a druhy vyvíjející se na epiteliálních buňkách tenkého a tlustého střeva. Všechny druhy kryptosporidií jsou přenášeny fekálně orální cestou. Obecně se předpokládá, že excystace oocyst střevních druhů je aktivována v žaludku, přestože to nikdy nebylo experimentálně potvrzeno. Tato studie byla zaměřena na chirurgickou inokulaci laboratorních hostitelů (SCID myši) střevními (*C. parvum*) a žaludečnými (*C. proliferans*) druhy kryptosporidií do *intestinum tenue*. Bylo prokázáno, že není rozdíl mezi per orálními infekcemi vyvolanými oocystami, které byly před inokulací předčištěny a těmi, které byly vyvolány oocystami v surovém trusu. Střevní druh, *C. parvum*, byl infekční pro všechny hostitele, kteří byli chirurgicky inokulováni do různých částí tenkého střeva, a to jak čistými, tak oocystami v trusu. Bylo demonstrováno, že oocysty *C. parvum* nepotřebují být pasážovány přes žaludek hostitele, aby došlo k jejich aktivaci a následné excystaci. Inokulace do *jejunum* se ukázala být jako nevhodnější. Obdobně u žaludečního druhu, *C. proliferans*, byla vyvolána infekce u všech hostitelů, kteří byli inokulováni oocystami získanými přímo z žaludku pozitivního zvířete. Bylo prokázáno, že oocysty *C. proliferans* nepotřebují být aktivovány průchodem střevy hostitelů. Chirurgická inokulace oocyst *C. proliferans* do *intestinum tenue* nevyvolala u žádného hostitele infekci.

Klíčová slova: *Cryptosporidium parvum*; *Cryptosporidium proliferans*; chirurgická aplikace; patogenita; infekce

ABSTRACT

Cryptosporidium are protozoan parasites that infect the gastrointestinal epithelium of various vertebrate hosts. The genus has two major phylogenetic groups: a gastric group that infect the epithelium of the stomach and an intestinal group that infect the epithelium of the small and large intestine. *Cryptosporidium* are transmitted by the faecal-oral route and infect epithelial cells following excystation of the environmental oocyst stage. It has been proposed that excystation of intestinal species is triggered by exposure to the acidic stomach contents, although this has not been verified experimentally. This study aimed to determine whether exposure to stomach contents is necessary for *in vivo* infection by the intestinal species *C. parvum* and whether passage through the intestine is necessary for the gastric species *C. proliferans* to cause infection. It was shown that purified and non-purified oocysts of *C. parvum* were infectious for SCID mice following surgical inoculation directly into different parts of the small intestine, demonstrating that passage through the stomach is not necessary for infection by this intestinal species. Inoculation of the jejunum resulted in a course of infection similar to oral inoculation. *Cryptosporidium proliferans* was infectious for naïve SCID mice following surgical extraction from the stomach of infected SCID mice, demonstrating that passage through the small intestine is not necessary for infection by this gastric species. However, surgical inoculation of *C. proliferans* oocysts directly into the *intestinum tenue* did not cause infection.

Key words: *Cryptosporidium parvum*; *Cryptosporidium proliferans*; surgical applications; pathogenicity; infection

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1. HISTORIE RODU <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	10
2.2. TAXONOMIE.....	10
2.3. MORFOLOGIE A MORFOMETRIE OOCYST.....	12
2.4. HOSTITELSKÁ SPECIFITA.....	13
2.5. VÝVOJOVÝ CYKLUS.....	13
2.5.1. EXCYSTACE.....	15
2.5.2. MEROGONIE.....	16
2.5.3. GAMETOGONIE.....	16
2.5.4. SPOROGENIE.....	16
2.6. PATOGENITA A KLINICKÉ PŘÍZNAKY.....	17
2.6.1. ŽALUDEČNÍ KRYPTOSPORIDIÓZA.....	18
2.6.2. STŘEVNÍ KRYPTOSPORIDIÓZA.....	18
2.7. PŘENOS A PRŮBĚH INFEKCE.....	19
2.8. TERAPIE A PREVENCE.....	20
2.9. KRYPTOSPORIDIE HLODAVCŮ.....	21
2.9.1. <i>CRYPTOSPORIDIUM PROLIFERANS</i> Kváč et al., 2016.....	22
2.9.2. <i>CRYPTOSPORIDIUM PARVUM</i> Tyzzer, 1912.....	23
3. CÍLE PRÁCE	24
4. MATERIÁL A METODY	25
4.1. MATERIÁL.....	25
4.1.1. INOKULUM.....	25
4.1.2. EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA.....	25
4.2. METODY.....	25

4.2.1.	MIKROSKOPICKÁ DETEKCE OOCYST KRYPTOSPORIDIÍ (BARVENÍ ANILIN-KARBOL-METHYL VIOLETÍ Miláček et Vítovec, 1985).....	25
4.2.2.	MĚŘENÍ pH V ŽALUDKU MYŠI A TRUSU TELAT.....	26
4.2.3.	PURIFIKACE OOCYST.....	26
4.2.3.1.	SACHARÓZOVÝ GRADIENT Arrowood et Sterling, 1987.....	27
4.2.3.2.	CESIUM CHLORIDOVÝ GRADIENT.....	27
4.2.3.3.	PŘEČIŠTĚNÍ OOCYST ZÍSKANÝCH PŘÍMO ZE ŽALUDKU INFIKOVANÝCH HOSTITELŮ.....	28
4.2.4.	PŘÍPRAVA INOKULAČNÍ DÁVKY.....	28
4.2.5.	HODNOCENÍ INTENZITY INFEKCE.....	28
4.2.6.	GENOTYPIZACE KRYPTOSPORIDIÍ.....	29
4.2.6.1.	IZOLACE DNA.....	29
4.2.6.2.	GENOTYPIZACE.....	30
4.2.7.	CHIRURGICKÁ APLIKACE INFEKČNÍ DÁVKY.....	31
4.3.	DESIGN EXPERIMENTŮ.....	32
4.3.1.	TEST INFEKTIVITY OOCYST <i>C. PARVUM</i> A <i>C. PROLIFERANS</i> APLIKOVANÉ PER ORÁLNĚ.....	32
4.3.2.	CHIRURGICKÁ APLIKACE INOKULAČNÍ DÁVKY <i>C. PARVUM</i> A <i>C. PROLIFERANS</i> DO <i>INTESTINUM TENUE</i>	33
4.3.3.	CHIRURGICKÁ APLIKACE INOKULAČNÍ DÁVKY <i>C. PROLIFERANS</i> DO <i>DUODENUM</i> MYŠI A NÁSLEDNÁ DETEKCE POHYBU DÁVKY S POMOCÍ ROZTOKU BARIA (BaSO ₄) POD RTG.....	34
4.3.4.	HODNOCENÍ PRŮBĚHU INFEKCE.....	34
4.4.	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	35
5.	VÝSLEDKY.....	36
5.1.	HODNOTA pH ŽALUDKU SCID MYŠÍ.....	36
5.2.	HODNOTA pH TRUSU TELAT.....	36
5.3.	INFEKTIVITA OOCYST <i>C. PROLIFERANS</i>	36

5.4.	RTG VYŠETŘENÍ DETEKCE POHYBU DÁVKY POMOCÍ Ba.....	37
5.5.	INFEKTIVITA OOCYST <i>C. PARVUM</i>	39
5.6.	KLINICKÉ PŘÍZNAKY KRYPTOSPORIDIÓZY V PRŮBĚHU INFEKcí.....	40
6.	DISKUZE.....	41
7.	ZÁVĚRY	45
8.	LITERATURA	46

1. ÚVOD

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou běžní protozoální jednobuněční paraziti, se specifickou lokalizací, a to v zóně mikrokloků epitelu trávicího traktu a epitelu dýchacích cest a atypicky se mohou vyskytovat i v jiných orgánech, některé druhy parazitují v epitelu vystylajícím žaludeční stěnu, některé ve vzdušných vacích a ledvinách. Tito prvoci infikují široké spektrum obratlovců a savců včetně člověka, hospodářských zvířat, ryb, plazů a ptáků (O'Donoghue 1995; Ziegler et al. 2007; Holubová et al. 2016). Vzhledem k faktu, že mnohé druhy jsou si natolik podobné velikostí i strukturou, je k jejich rozlišení nutné použít molekulární metody. Využití molekulárně biologických metod při studiu této problematiky umožnilo a umožňuje blíže charakterizovat nejen jednotlivé izoláty kryptosporidií, ale současně přispívá také k objektivnějšímu vyhodnocení epizootologického a epidemiologického významu jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií. Charakteru některých druhů je v posledních letech věnována značná pozornost, zejména jejich hostitelské specifitě (Šlapeta 2013).

Infikovaní jedinci často vylučují oocysty v trusu nepřetržitě, po celou dobu patentní periody (Jeníková et al. 2011). Oocysty jsou velmi odolné vůči nepřetržitým vlivům vnějšího prostředí a přežívají velmi dlouhou dobu ve vhodných podmínkách vnějšího prostředí, to znamená, že ve vlhké půdě si mohou zachovat svoji infekčnost až šest měsíců (Fayer et al. 1998).

Kryptosporidie jsou jedním z nejvýznamnějších parazitárních původců způsobujících průjmová onemocnění. Na světě patří mezi čtyři nejčastější příčiny středních až těžkých průjmových onemocnění a představují významné nebezpečí pro HIV pozitivní pacienty (Parsons et al. 2015). Kromě lidské kryptosporidiózy, která je z pochopitelných důvodů nejčastěji v zájmu vědeckých a lékařských týmů, představují infekce vyvolané těmito parazity u hospodářsky významných zvířat taktéž závažný problém (Katsumata et al. 2000; Gatei et al. 2003; McGuigan 2005).

V současnosti je kryptosporidiím a jimi vyvolané kryptosporidióze čím dále častěji věnována větší pozornost v průmyslově vyspělých zemích, zatímco v mnoha rozvojových zemích, kde způsobují nejzávažnější problémy, jsou opomíjeny (Eibach et al. 2015).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. HISTORIE RODU *CRYPTOSPORIDIUM*

V roce 1907 popsal Ernest Edward Tyzzer jako první životní cyklus prvoka, kterého našel v žaludečním epitelu myši (*Mus musculus*) a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907, 1910). O pět let později stejný autor popsal nový druh *C. parvum*, parazitující v tenkém střevě laboratorní myši (Tyzzer 1912).

Později byly popsány další druhy kryptosporidií u krůt (Slavin 1955), hadů, ještěrek, želv (Graczyk 2008), obojživelníků (Arcay et Bruzal 1993; Crawshaw et Mehren 1987; Wright et Whitaker 2001; Green et al. 2003; Jirků et al. 2008), ptáků (Ryan et Xiao 2008) a ryb (Alvarez-Pellitero et al. 2004).

V první polovině 20. století nebyly kryptosporidie považovány za lékařsky či veterinárně významné (Wetzel 1938; Panciera et al. 1971; Meutin et al. 1974; Nime et al. 1976; Weisburger et al. 1979; Lasser et al. 1979). Zájem o tyto parazity dramaticky vzrostl v roce 1976, kdy došlo k nálezům parazita rodu *Cryptosporidium* u imunodeficitních lidí (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976). Do širokého povědomí veřejnosti a zájmu vědců se kryptosporidie dostaly v souvislosti s největší epidemií kryptosporidiózy způsobenou *C. hominis* v roce 1993 v Milwaukee (Wisconsin, USA), kdy bylo prostřednictvím kontaminované pitné vody nakaženo více než 400 000 osob (MacKenzie et al. 1994; Peng et al. 1997).

2.2. TAXONOMIE

Rod *Cryptosporidium* je jednou z bazálních linií kmene Apicomplexa, v němž byl původně řazen do třídy Coccidea (Corliss 1994; Fayer et al. 1997), ale na základě později doložené zpracované fylogenetické analýzy genu kódujícího RNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA) správně patří do třídy Gregarina (Carreno et al. 1999; Kuo et al. 2008). Mezi společné znaky gregarin a kryptosporidií je řazena morfologická stavba organel sloužících k přichycení k hostitelské buňce (Valigurová et al. 2007), ale oproti gregarinám, které jsou veliké v řádech stovek mikrometrů, jsou kryptosporidie organismy velmi drobné, v řádech několika mikrometrů. S třídou Gregarina je spojí společná nepřítomnost plastidového genomu (Zhu et al. 2000) a antigenní příbuznost zjištěná monoklonálními protilátkami (Bull et al. 1998).

Tabulka 1. Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*

DRUH	REFERENCE	HOSTITELÉ	LOKALIZACE
<i>C. andersoni</i>	Lindsay et al. 2000	skot	slez
<i>C. avium</i>	Holubová et al. 2016	ptáci	střevo, vzdušné vaky, ledviny
<i>C. baileyi</i>	Current et al. 1986	drůbež	<i>bursa Fabricii</i>
<i>C. bovis</i>	Fayer et al. 2005	skot	tenké střevo
<i>C. canis</i>	Fayer et al. 2001	psi	tenké střevo
<i>C. cuniculus</i>	Robinson et al. 2010	králíci	střevo
<i>C. erinacei</i>	Kváč et al. 2014	ježci	střevo
<i>C. fayeri</i>	Ryan et al. 2008	klokani	střevo
<i>C. felis</i>	Iseki 1979	kočky	tenké střevo
<i>C. fragile</i>	Jirků et al. 2008	obojživelníci	žaludek
<i>C. galli</i>	Ryan et al. 2003a	ptáci	žláznatý žaludek
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan et al. 2002	lidé	střevo
<i>C. huwi</i>	Ryan et al. 2015	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. macropodum</i>	Power et Ryan 2008	klokani	střevo
<i>C. meleagridis</i>	Slavin 1955	ptáci	tenké střevo
<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero et Sitjá-Bobadilla 2002	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. muris</i>	Tyzzler 1910	hlodavci	žaludek
<i>C. parvum</i>	Tyzzler 1912	savci	tenké střevo
<i>C. proliferans</i>	Kváč et al. 2016	hlodavci	žaludek
<i>C. ryanae</i>	Fayer et al. 2008	skot	střevo
<i>C. rubeyi</i>	Li et al. 2015	veverky	střevo
<i>C. scrofarum</i>	Kváč et al. 2013a	prasata	střevo
<i>C. serpentis</i>	Levine 1980	plazi	žaludek
<i>C. suis</i>	Ryan et al. 2004	prasata	žaludek, tenké střevo
<i>C. tyzzeri</i>	Ren et al. 2012	myši	tenké střevo
<i>C. ubiquitum</i>	Li et al. 2014	ovce, kozy	střevo
<i>C. varanii</i>	Pavlásek et Ryan 2008	plazi	střevo
<i>C. viatorum</i>	Elwin et al. 2012	lidé	střevo
<i>C. wrairi</i>	Vetterling et al. 1971	morčata	tenké střevo
<i>C. xiaoi</i>	Fayer et Santín 2009	ovce	střevo

V rámci rodu rozlišujeme dvě monofyletické větve jejichž zástupci se od sebe liší afinitou k jednotlivým částem zažívací trubice a morfometrií exogenních vývojových stádií (oocyst): střevní a žaludeční kryptosporidie (Xiao et al. 2004a). Střevní kryptosporidie infikují tenké a/nebo tlusté střevo svého hostitele a v rámci kryptosporidií představují nejpočetnější skupinu. Druhá skupina je tvořena méně početnými zástupci žaludečních kryptosporidií infikujících epiteliální buňky žláznatého žaludku svých hostitelů (Xiao et al. 2002).

Biologie a taxonomie kryptosporidií je předmětem intenzivního výzkumu (Xiao et al. 2004a). Na základě morfologie oocyst, lokalizace vývojového cyklu, hostitelské specifity a molekulárních rozdílů je v současné době uznáváno celkem 30

platných druhů (Tabulka 1) patřících do rodu *Cryptosporidium* (Ryan et al. 2015; Holubová et al. 2016; Kváč et al. 2016).

2.3. MORFOLOGIE A MORFOMETRIE OOCYST

Podle tvaru a velikosti oocysty lze ve většině případů rozpoznat příslušnost k jedné ze dvou fylogenetických skupin kryptosporidií. Výjimku z tohoto pravidla představují oocysty *C. baileyi* (střevní druh) infikující nejen ptáky, ale i myši a kozy, jež se velikostí a tvarem podobají oocystám žaludečních kryptosporidií (Current et al. 1986).

Střevní kryptosporidie mají oocysty kulaté a menší. Velikost oocyst se mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií patřící do příslušné skupiny liší jen výjimečně a na základě morfometrie nelze většinou jednotlivé druhy a genotypy od sebe odlišit. Z hlediska širokého spektra, které převyšuje 200 střevních druhů kryptosporidií jsou zde pro příklad uvedeni jen někteří zástupci nejčastějších druhů. U nejznámějšího střevního druhu *C. parvum*, Tyzzer v roce 1912 naměřil velikost oocyst v rozmezí $5,0 \times 4,5 \mu\text{m}$. Pro člověka typické *C. hominis*, které je strukturálně nerozeznatelné od *C. parvum*, měří v průměru $4,7 \times 5,2 \mu\text{m}$ (Morgan-Ryan et al. 2002). U *C. ryanae* bylo prokázáno, že se jedná o nejmenší oocysty kryptosporidií infikující savce o velikosti v průměru $3,5 \times 3,3 \mu\text{m}$ (Fayer et al. 2008). Další střevní kryptosporidii je *C. suis* ($6,2 \times 5,5 \mu\text{m}$), která je morfometricky neodlišitelná od druhu *C. scrofarum* (Ryan et al. 2004; Vítovec et al. 2006; Kváč et al. 2013a). Také *C. fayeri* s průměrnou velikostí $4,9 \times 4,3 \mu\text{m}$ je velikostně nerozlišitelná od *C. parvum* (Ryan et al. 2008). Naproti tomu *C. canis* ($5,0 \times 5,9 \mu\text{m}$) je morfometricky odlišná od *C. parvum* (Fayer et al. 2001).

Žaludeční kryptosporidie jsou oválné a větší než většina střevních kryptosporidií (Kváč et al. 2013b). Velikost oocyst *C. muris* je $7,6 \times 5,7 \mu\text{m}$ (Katsumata et al. 2000), oocysty *C. andersoni* jsou velké $7,4 \times 5,5 \mu\text{m}$ (Lindsay et al. 2000), velikost oocyst *C. galli* je udávána $8,2 \times 6,3 \mu\text{m}$ (Ryan et al. 2003a) a velikost oocyst *C. proliferans* je $7,7 \times 5,3 \mu\text{m}$ (Kváč et al. 2016). Oocysty *C. galli* jsou větší než jiné druhy ptačích kryptosporidií a měří v průměru $8,2 \times 6,3 \mu\text{m}$ (Pavlásek 2001).

2.4. HOSTITELSKÁ SPECIFITA

Hostitelská specifita je rozmezí druhů, které je parazit schopen využívat jako své hostitele. V rámci rodu *Cryptosporidium* rozlišujeme druhy s širokou hostitelskou specifitou (např. *C. parvum*, *C. ubiquitum*), druhy schopné infikovat pouze úzkou, často fylogeneticky příbuznou skupinu hostitelů (*C. muris* nebo *C. andersoni*) a druhy s úzkou hostitelskou specifitou. Do poslední skupiny lze z dosud popsaných druhů zařadit *C. wrairi* parazitující u morčat (Feng et al. 2010) nebo *C. hominis*, druh, jehož primárním hostitelem je člověk (Morgan-Ryan et al. 2002).

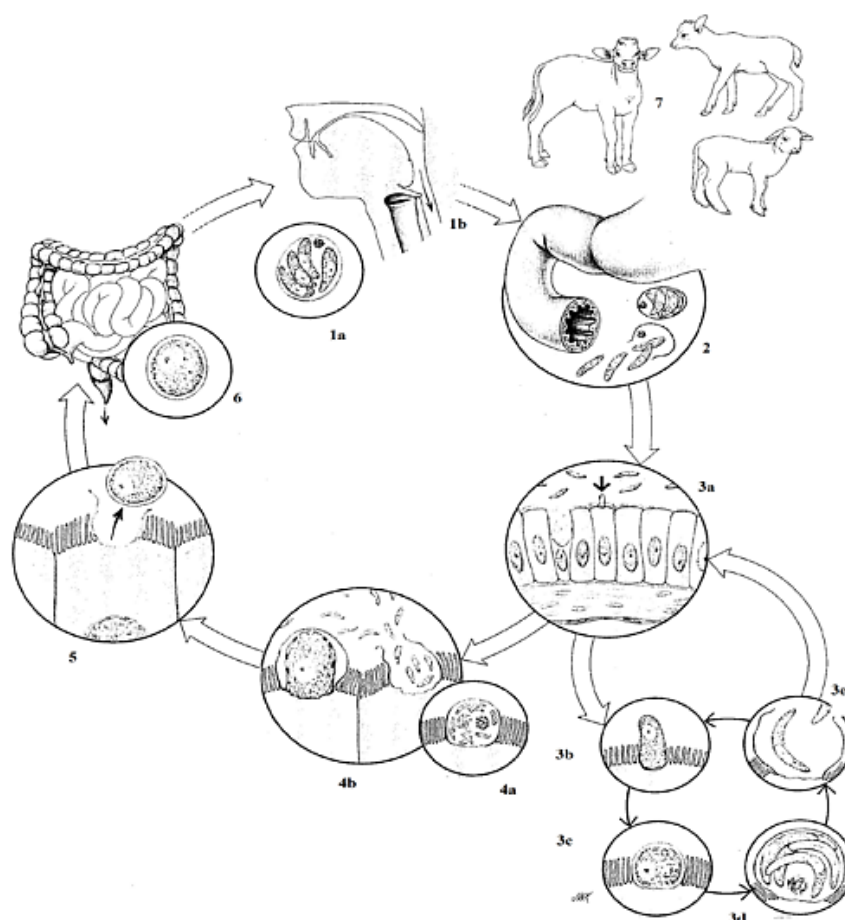
V rámci laboratorních podmínek bylo zjištěno, že řadu druhů s úzkou hostitelskou specifitou lze experimentálně přenést na různé, fylogeneticky nepříbuzné druhy zvířat. Například izolát *C. hominis* nalezený u dugonga, vodního savce (Morgan et al. 2000), má též schopnost nakazit jehňata, gnotobiotická prasata a telata, ale ne imunosuprimované myši (Widmer et al. 2000; Giles et al. 2001; Akiyoshi et al. 2002; Pereira et al. 2002).

Taktéž v případě *C. parvum*, druhu s pravděpodobně nejširší hostitelskou specifitou, lze nalézt několik výjimek. Subtypy *C. parvum* patřící do alelické rodiny IIc jsou až na několik ojedinělých případů u ježků evropských považovány za výhradně antropogenní (Sturdee et al. 1999; Enemark et al. 2002; Alves et al. 2003; Xiao et al. 2008; Dyachenko et al. 2009; Kváč et al. 2013a,c; Ryan et al. 2014).

2.5. VÝVOJOVÝ CYKLUS

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou jedno-hostitelští paraziti mající složitý životní cyklus zahrnující čtyři fáze – excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie. Samotný vývojový cyklus se dělí na sexuální a asexuální reprodukční fázi (Obrázek 1). Oocysty se dostávají do GIT traktu, kde dochází k excystaci a uvolnění čtyř infekčních sporozoitů aktivně napadajících buňky epitelu. Každý ze 4 sporozoitů v oocystě má haploidní jádro s 8 chromozomy. Ty obsahují 10,1-10,4 milionů párových bází DNA s nepočetnými introny (Hijawi et al. 2002).

Obrázek 1. Vývojový cyklus kryptosporidií (Despommier et Karapelou 1987)



1a) Sporulované oocysty – infekční stádium kryptosporidií – obsahující 4 infekční sporozoity. **2b)** Infekce začíná pozřením sporulovaných oocyst. Nejčastějším zdrojem infekce je kontaminovaná voda nebo potrava. **2)** Z oocysty se uvolňují sporozoiti v tenkém střevě na základě kontaktu s trávicími enzymy hostitele. **3a)** Každý sporozoit je schopen infikovat cylindrickou epiteliální buňku; tím začíná fáze nepohlavního rozmnožování. **3b)** Sporozoiti se přichycují k povrchu epiteliálních buněk a usazují se na bázi mikrokloků. **3c)** Parazit způsobí změny v mikrovilech enterocytů, ty obklopí sporozoit, který se následkem toho mění v trofozoit. **3d)** Trofozoit se mění v schizont, výsledkem je vznik šesti až osmi merozoitů I. typu. **3e)** Merozoiti I. typu se dostávají do střeva a jsou schopné infikovat další epiteliální buňky; tato část cyklu se buď několikanásobně opakuje, nebo vznikají meronti II. typu a nově vzniklé merozoity se diferencují v mikrogamonty a makrogamonty. **4a)** Mikrogamonti vytvářejí 16 mikrogamet. **4b)** Mikrogamety opouštějí mikrogamont a každá mikrogameta je schopna splynout s makrogametou vzniklou z makrogamontu. **5)** Vzniká zygota (oocysta). **6)** Než oocysta opustí střevo, sporuluje, tím se stává plně infekční. **7)** *Cryptosporidium* způsobuje infekci u různých živočišných druhů.

V případě střevních druhů (*C. parvum*) je primárním místem infekce tenké střevo. U žaludečních druhů (*C. muris*) je primárním místem žaludeční sliznice (Pavlásek 1991; Guselle et al. 2003; Plutzer et al. 2009). Kromě žaludku, tenkého a tlustého střeva, byla také u zástupců rodu *Cryptosporidium* detekována afinita k nosohltanu, dýchacím orgánům (průdušnice, průdušky vzdušné vaky), játrům, pankreatu, žlučníku a žlučovodu (Kahn et al. 1987; Hinnant et al. 1989; Chalmers et Davies 2010) a ledvinám (Goodstein et al. 1989; Holubová et al. 2016). U imunodeficitních jedinců mohou infikovat i další sliznice (Wang et al. 2014). Extraintestinální lokalizace jsou nejčastěji spojovány s ptačími kryptosporidii, zejména s *C. baileyi* (Current et al. 1986; Lindsay et Blagburn 1990).

U sladkovodních či mořských druhů ryb jsou stadia kryptosporidií lokalizována v žaludku, střevech nebo obou místech (Ryan et Xiao 2014; Ryan et al. 2015).

Cyklus vždy začíná požitím životaschopných a infekce schopných oocyst vnímavým hostitelem. Infekční dávka se v závislosti na odolnosti liší u jednotlivých hostitelů, ale i velmi malé množství oocyst, je schopné vyvolat onemocnění snadno prokazatelné mikroskopickým vyšetřením. Rozhodující pro vyvolání infekce je vnímavost hostitele a ne množství pozřených (inhalovaných) oocyst (Zambriski et al. 2013).

2.5.1. EXCYSTACE

Diference vývojového cyklu oocyst vychází z lokalizace žaludečních a střevních druhů kryptosporidií. Dnes je obecně akceptován fakt, že žaludeční druhy excystují přímo v žaludku, neboť jejich sporozoiti jsou adaptováni na kyselé prostředí žaludku, zatímco střevní druhy uvolňují sporozoity, kteří mohou být devitalizováni účinkem nízkého pH v žaludku, do *lumen* zažívacího traktu až v tenkém střevě, a to účinkem trypsinu a žluče (Widmer et al. 2007). V obou případech se uvolnění sporozoiti pohybují apikálním koncem vpřed a vyhledávají potenciální hostitelskou buňku, kterou aktivně napadají (Wetzel et al. 2005). Při blízkém kontaktu sporozoita s hostitelskou buňkou dochází k evaginaci plazmatické membrány hostitelské buňky, která se prodlužuje, obrůstá přichycený sporozoit a jejím spojením vzniká parazitoformní vakuola (Yoshikawa et Iseki 1991; Valigurová et al. 2007; Melicherová et al. 2014). Sporozoit je uvnitř parazitoformní vakuoly spojen s hostitelskou buňkou tzv. feeder organelou (Goebel et Braendler 1982).

2.5.2. MEROGONIE

Během merogonie se jádro trofozoita asexuálně rozmnožuje. Výsledkem dělení je meront I. typu obsahující 6-8 merozoitů, který aktivně napadá další buňky a vyvíjí se buď opakovaně v meront I. typu nebo meront II. typu obsahující 4 merozoity II. typu (Aydin 1997). Předpokladem pro sexuální rozmnožování je poslední generace merontů, protože první generace je schopna pouze opakované nepohlavní reprodukce. Výjimkou je druh *C. baileyi*, kde je nepohlavní část vývojového cyklu o jednu generaci delší. Meront III. typu obsahuje 8 merozoitů (Current et al. 1986).

2.5.3. GAMETOGONIE

Sexuální rozmnožování je zahájeno meronty II. typu, respektive merozoity III. typu, kteří infikují novou epitelální buňku. Pouze uvolnění merozoiti II. (III.) typu mohou inicializovat sexuální rozmnožování, infikují novou hostitelskou buňku a diferencují se na mikrogamonty (samčí stádia) a makrogamonty (samičí stádia).

Vytváří se dvě sexuální stádia. První stádium tvoří vícejaderné mikrogamonty, jejichž jádro se mnohonásobně dělí a vzniká tak 16 pohyblivých mikrogamet a druhé stádium tvoří jednojaderné makrogamonty, kteří se vyvíjí v makrogamety. Uvolněné mikrogamety se aktivně pohybují a vyhledávají makrogamety. Při setkání se mikrogameta přichycuje na makrogametu, penetruje skrz buněčnou membránu hostitelské buňky a makrogamety a dochází k oplodnění. Způsob, kterým mikrogamonti detekují makrogamety, není znám. Oplozená makrogameta (zygota) se vyvíjí v oocystu (Current et al. 1986; Fayer et Ungar 1986; Current et Reese 1987; Valigurová et al. 2008).

2.5.4. SPOROGENIE

Oocysty kryptosporidií sporulují *in situ*, každá zralá oocysta obsahuje čtyři volně uložené sporozoity a velké reziduální tělísko (Uni et al. 1987). U druhu *C. parvum* vzniká přibližně 20 % tenkostěnných oocyst, které se podílejí na autoinfekci (nastává v případě, že se asexuální a sexuální fáze životního cyklu opakuje ve stejném hostiteli), zbylých 80 % tvoří silnostěnné oocysty, které jsou vylučovány ven z těla hostitele společně s trusem a jsou ihned schopné infekce (Current et Reese 1987). Stěna formující silnostěnné oocysty je tvořena povrchovým glykocalyxem, lipidovou, proteinovou a polysacharidovou vrstvou

(Jenkins et al. 2010a). Pro tenkostěnné oocysty je charakteristická stěna tvořená jednovrstevnou membránou (Jenkins et al. 2010a). Výhodou silnostěnných oocyst je čtyřvrstvá stěna, která je celistvá vyjímaje jediné místo, kudy se dostávají sporozoiti ven během procesu excystace tzv. suturu. Silnostěnné oocysty jsou dobře vybaveny pro přežití v nepříznivých podmínkách (Uni et al. 1987; Jenkins et al. 2010a). Přibližně pětina oocyst je tenkostěnných, obklopených pouze sérií jednotkových membrán. Tenkostěnné oocysty nejsou schopny dlouhodobě přežít ve vnějším prostředí a slouží k infekci dalších úseků trávicího traktu (Blunt et al. 1997; Widmer 1998).

2.6. PATOGENITA A KLINICKÉ PŘÍZNAKY

Onemocnění vyvolané zástupci rodu *Cryptosporidium* je označováno jako kryptosporidióza. Tato gastroenteritida je řazena mezi oportunní parazitózy a zoonózy. Z důvodu porozumění patogenity kryptosporidií je kryptosporidióza experimentálně studována u širokého spektra hostitelů.

Jak už bylo zmíněno, rozlišujeme dvě linie – žaludeční a střevní kryptosporidie, tedy dle lokalizace v hostiteli a podle druhu kryptosporidie se liší i klinické projevy onemocnění a celkový průběh infekce také závisí na stavu hostitele (Tzipori et Ward 2002). V obou případech jsou ale klinické příznaky u zvířat vzácné, a pokud se vyskytují, jsou podobné klinickým příznakům u lidí (Fayer 2004). Příznaky jsou různě intenzivní, existují druhy vysoce patogenní, u kterých lze snadno rozeznat klinické příznaky (*C. parvum*), ale ve většině případů se jedná spíše o nepatogenní druhy (žaludeční druhy kryptosporidií). Dále rozhoduje fakt, zda se jedná výlučně o monoinfekci či smíšenou infekci parazitární, bakteriální nebo virovou (Gomez Morales et al. 1995).

Experimentální infekce kryptosporidiózy u hospodářských zvířat odhalily jisté podobnosti v patogenitě a klinických příznacích přirozených infekcí. Například myši model je úspěšný pro navození infekce, ale infikované myši často nevykazují klinické příznaky, jako jsou u přirozené infekce (Reese et al. 1982; Mtambo et al. 1996). Dalším případem je infekce u prasat střevním druhem *C. scrofarum*, kde u prasat nebyly pozorovány žádné klinické příznaky, ale u člověka byl vyvolán průjem (Kváč et al. 2013a).

Na rozdíl od řady kryptosporidiových infekcí zvířat, postihuje kryptosporidióza lidí všechny věkové skupiny, nicméně nejčastěji se vyskytuje u dětí

a imunosuprimované populace (Segura 2015). U imunodeficitních jedinců bývá průběh onemocnění odlišný. Rozdíl se projevují již na buněčné úrovni v mnohem větší míře, kde je kolem infikovaných buněk pozorována zánětlivá infiltrace (López-Vélez et al. 1995). Špatný imunitní stav jedince (HIV infekce, drogy, transplantace, chemoterapie, rizikové sexuální praktiky) přispívá k chronické kryptosporidiióze (Turkcepar et al. 2002; Tappeh et al. 2006).

2.6.1. ŽALUDEČNÍ KRYPTOSPORIDIÓZA

Žaludeční kryptosporidiióza probíhá převážně bez klinických příznaků, zejména bez průjemového onemocnění, které je typické pro infekci způsobenou střevními druhy kryptosporidií (Segura 2015). Další odlišností žaludečních druhů od střevních druhů kryptosporidií, je rezistence hostitele vůči reinfekci jak stejným druhem, tak i jiným druhem/genotypem po překonání infekce (McDonald et al. 1992; Kváč et al. 2008a). Ve většině případů žaludeční kryptosporidiiózy nebyly detekovány ani makroskopické, ani mikroskopické změny, zejména nejsou přítomny zánětlivé infiltráty v *lamina propria* žaludeční sliznice (Anderson 1987; Iseki et al. 1989; Özkul et al. 1994; Kváč et al. 2003; Masuno et al. 2006).

Nezánětlivé histopatologické změny sliznice při žaludeční kryptosporidiióze zahrnují hyperplazii, hypertrofii, atrofii a metaplazii žlázového epitelu, aktivaci hlenových buněk v oblasti široce dilatovaných, infikovaných žláz, s hojným hlenem, nekrotickým materiálem a odloupanými epiteliiemi v lumen žláz (Anderson 1987; Pospischil et al. 1987; Özkul et al. 1994; Taylor et al. 1999; Dubey et al. 2002; Kváč et al. 2003).

2.6.2. STŘEVNÍ KRYPTOSPORIDIÓZA

Nejčastějším klinickým příznakem infekcí vyvolaných střevními druhy kryptosporidií je průjem (Petteolo-Mantovani et al. 1995; Turkcepar et al. 2002; Houpte et al. 2005). Dalšími příznaky mohou být bolesti břicha, nechutenství, únava, horečka či nadměrné pocení (Fayer 2003; Rašková et al. 2013). Příležitostně mohou být pozorovány i respirační poruchy (Wang et al. 2014). Příznaky akutní střevní kryptosporidiiózy zahrnují ztrátu chuti k jídlu, apatii a váhový úbytek. Rychlá ztráta živin a tekutin během průjmů způsobuje dehydrataci. Střevní buňky jsou narušeny, tedy absorpce živin je omezená a hostitel tak přes trávicí trakt ztrácí více živin, než přijímá (Mason et al. 1981). To rovněž narušuje

imunitní systém a zvyšuje riziko sekundárních infekcí. Jakmile tělo vyčerpá zásoby živin, jako jsou minerální látky a bílkoviny, rychle nastává smrt (Thamsborg et al. 1990a,b).

Většina dosud známých poznatků o střevní gastroenteritidě pochází ze studií provedených na *C. parvum*, protože *C. parvum* bylo identifikováno u více než 180 druhů savců. Druh *C. parvum* se rozčlenil na několik genotypů, které byly prohlášeny za samostatný druh, se širokým spektrem hostitelů včetně lidí, primátů, hlodavců a kopytníků (Morgan-Ryan et al. 2002; Akiyoshi et al. 2002; Power et al. 2008; Widmer et al. 2012). V posledních deseti letech bylo publikováno velké množství studií, které přinesly poznatky, že infekce řady druhů a většiny známých genotypů střevních kryptosporidií nejsou spojeny s klinickým onemocněním, zejména průjmy (Pettoelo-Mantovani et al. 1995; Turkcapar et al. 2002; Houpte et al. 2005; Vítovec et al. 2006; Kváč et al. 2013c, 2014; Ryan et Xiao 2014; Segura 2015).

2.7. PŘENOS A PRŮBĚH INFEKCE

Kryptosporidiové infekce byly popsány na všech kontinentech světa s výjimkou Antarktidy. Jedná se o všudypřítomné parazity se schopností infekce mnoha hostitelů, včetně člověka. Je známo několik způsobů přenosu, nejčastěji se ale jedná o pozření kontaminované vody či potravy, nebo přímým kontaktem s nakaženým jedincem (Ziegler et al. 2007; Feng 2008).

Prepatentní období, doba od pozření infekčních oocyst po vyloučení oocyst do vnějšího prostředí, je závislá na hostiteli a druhu a genotypu kryptosporidie (Hijjawi et al. 2002). Mezní hodnota je 3-24 dnů. Inkubační doba trvá přibližně 5-7 dní (Fayer et al. 2005). Žádoucím výsledkem imunitního systému je samovyléčení tzv. „self-cure“, které nastává u imunokompetentních jedinců. Závažné komplikace může infekce vyvolat v každé věkové kategorii nejen u lidí, ale i u zvířat (O'Donoghue 1995).

Prepatentní perioda střevních druhů kryptosporidií infikujících savce se pohybuje okolo jednoho týdne, naproti tomu doba žaludečních kryptosporidií je více variabilní, přičemž délka je závislá na hostiteli a druhu kryptosporidie (Tabulka 2).

Tabulka 2. Přehled prepatentní doby u některých druhů kryptosporidií

DRUH	REFERENCE	HOSTITEL	PREPATENTNÍ DOBA (dny)
<i>C. andersoni</i>	Lindsay et al. 2000	skot	18
<i>C. baileyi</i>	Current et al. 1986	kuře	4-24
<i>C. bovis</i>	Fayer et al. 2005	skot	10-12
<i>C. felis</i>	Iseki 1979	kočka	5-6
<i>C. galli</i>	Pavlásek 1999	drůbež	5
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan et al. 2002	člověk	4-5
<i>C. muris</i>	Tyzzler 1907	myš	6-21
<i>C. parvum</i>	Tyzzler 1912	obratlovci	4-22
<i>C. proliferans</i>	Kváč et al. 2016	krysa malá	18-21
<i>C. scrofarum</i>	Kváč et al. 2013a	prase	6-7
<i>C. suis</i>	Ryan et al. 2004	prase	2-9
<i>C. tyzzeri</i>	Ren et al. 2012	myš	6-7

2.8. TERAPIE A PREVENCE

Za prevenci je nutné na prvním místě považovat základní hygienické návyky (Feng 2008), a to i vzhledem k faktu, že oocysty kryptosporidií jsou vysoce odolné proti vlivům okolního prostředí a mnohým dezinfekčním prostředkům, hygienická opatření sama o sobě nestačí spolehlivě eliminovat oocysty tak, aby se zabránilo infekci (Xiao et al. 2006). Navzdory dlouhodobému intenzivnímu výzkumu v oblasti léčby a kontroly kryptosporidiózy, během něhož bylo vyzkoušeno velké množství terapeutických a profylaktických preparátů k léčbě přirozených i experimentálních infekcí laboratorních hlodavců (potkani, myši a křečci), přežvýkavců (skot) nebo buněčných kultur, včetně Nitazoxanidu používaného při léčbě lidských kryptosporidióz, nejsou v současné době k dispozici žádné univerzální léčebné preparáty s vysokou účinností (Rehg 1991a-c; Naciri 1993; Hommer et al. 2003; Mele et al. 2003; Stockdale et al. 2007; Shahiduzzaman et Dauschies 2012). Stejně tak není známá žádná účinná chemoterapeutická látka vhodná k léčbě imunokompromitovaných jedinců, i když existují léčiva zkracující dobu trvání průjmů a snižující množství vylučovaných oocyst (Ryan et al. 2003b). I když výzkumné studie prokazují příznivý účinek Nitazoxanidu s významným snížením úmrtnosti u dospělých osob a u dětí bez HIV (Rossignol et al. 2001, 2006; Amadi et al. 2002), k zastavení průjmu došlo pouze u 56 % pacientů, užívajících Nitazoxanidin, přičemž u HIV pozitivních naopak nebylo prokázáno žádné zlepšení (Amadi et al. 2009).

Vzhledem k epidemiologické významnosti jsou prakticky všechny studie zaměřeny na léčbu infekcí způsobených střevními druhy kryptosporidií,

zejména druhem *C. parvum*. Základem léčby je adekvátní rehydratace. Kryptosporidíóza je obvykle akutní a spontánně odeznívající onemocnění (Fayer et Ungar 1986; Juránek 1995). Účinky většiny testovaných preparátů proti žaludečním kryptosporidiím nejsou známy. Nové metody je třeba dále rozvíjet, s cílem zlepšit interpretaci výsledků (Checkley et al. 2015). V případě žaludeční kryptosporidíózy, kdy mohou být zvířata infekční po celý svůj život, je způsob prevence velmi problematický (Lindsay et al. 2000; Kváč et al. 2008a).

2.9. KRYPTOSPORIDIE HLODAVCŮ

Hlodavci díky své reprodukční schopnosti, všudypřítomnosti a sdílením stanovišť nejen s hospodářskými zvířaty, vedou k epidemiologickému šíření kryptosporidií u těchto zvířat (Feng 2008). Kromě toho, hlodavci představují velmi vhodný model pro studie, a to díky dynamice a vysoké rozmanitosti populací (Bajer 2008).

Divoká zvířata jsou považována za důležitý zdroj infekčních chorob přenosných na člověka a představují významný problém v oblasti veřejného zdraví a to po celém světě, kde jsou součástí epidemiologie většiny zoonóz a slouží jako hlavní rezervoáry původců onemocnění přenášených na domácí zvířata a lidi (Kruse et al. 2004).

Znečištění životního prostředí lidskými výkaly a trusem domácích zvířat představuje potenciální riziko nákazy kryptosporidii nejen pro všechna divoce žijící zvířata, ale i pro člověka (Appelbee et al. 2005).

Různé druhy hlodavců jsou různě vnímavé k jednotlivým druhům a genotypům kryptosporidií. Například potkani (*Rattus norvegicus*) jsou téměř výhradně infikováni některým z *Cryptosporidium* rat genotype I-IV, v Japonsku a Anglii byl výskyt oocyst kryptosporidií v potkanech popsán hned v několika studiích (Iseki 1986; Miyaji et al. 1989; Yamura et al. 1990; Webster et Macdonald 1995; Quy et al. 1999). U hrabošů byla detekována infekce způsobená *Cryptosporidium* vole genotype a muscrat genotype II (Feng et al. 2007; Ziegler et al. 2007). Dále u veverek byly popsány infekce způsobené *C. parvum*, *C. muris*, *Cryptosporidium* squirrel genotype, cervine genotype, ferret genotype, skunk genotype, chipmunk genotype I, a deer mouse genotype III (Sundberg et al. 1982; Feng et al. 2007; Ziegler et al. 2007; Kváč et al. 2008b).

U hlodavců byly detekovány i druhy, které primárně infikují jiné hostitele. *Cryptosporidium ubiquitum* se obvykle vyskytuje u jelenovitých, jako jsou jelen sika (*Cervus nippon*), jelenec běloocasý (*Odocoileus virginianus*), nyala jižní

(*Tragelaphus angasi*) a další, ale bylo zjištěno, že přirozeně infikuje i celou řadu hlodavců (Perez et Le Blancq 2001; Ryan et al. 2003b; Feng et al. 2007; Wang et al. 2008).

Myš domácí je vzhledem k své vnímavosti jak ke střevním, tak i žaludečním druhům kryptosporidií vhodný laboratorní model. V následujícím textu se budeme podrobněji zabývat pouze dvěma druhy kryptosporidií, které byly použity v této práci.

2.9.1. *CRYPTOSPORIDIUM PROLIFERANS* Kváč et al., 2016

Cryptosporidium proliferans byla popsána teprve nedávno (Kváč et al. 2016), nicméně je tato kryptosporidie známa jako izolát *C. muris* TS03 již od roku 2003, kde byla použita pro první experimentální infekci (Tabulka 1; Kváč et al. 2008a).

Tabulka 3. Seznam přirozeně (*) a experimentálně (#) infikovaných hostitelů *Cryptosporidium proliferans*

HOSTITEL	REFERENCE
HLODAVCI	
<i>Acomys cahirinus</i> (Myš bodlinatá) [#]	Modrý et al. 2012
<i>Gerbillus gerbillus</i> (Pískomil malý) [#]	Kváč et al. 2013b
<i>Meriones tristrami</i> (Pískomil Tristramův) [#]	Kváč et al. 2013b
<i>Meriones unguiculatus</i> (Pískomil mongolský) [#]	Koudela et al. 1998; Kváč et al. 2009
<i>Sekeetamys calurus</i> (Pískomil veverkoocasý) [#]	Kváč et al. 2013b
<i>Mastomys natalensis</i> (Krysa mnohobradavková) [#]	Neumayerová et al. 2008
<i>Mastomys coucha</i> (Krysa malá) [#]	Kváč et al. 2016
<i>Microtus brandti</i> (Hraboš stepní) [#]	Modrý et al. 2012
<i>Mus</i> spp. (Myš domácí) ^{*,#}	Morgan et al. 1998; Satoh et al. 2003; Hikosaka et al. 2005a,b
<i>Sciurus carolinensis</i> (Veverka popelavá) [*]	Feng et al. 2007
<i>Tachyoryctes splendens</i> (Hlodoun východoafrický) [*]	Kváč et al. 2008a
SUDOKOPYTNÍCI	
<i>Syncerus caffer</i> (Buvol africký) [*]	Sak et al. 2013
LICHOKOPYTNÍCI	
<i>Equus africanus</i> (Osel africký) [*]	Laatamna et al. 2015
<i>Equus ferus</i> (Divoký kůň) [*]	Kváč et al. 2016; Wagnerová et al. 2015

Primárním hostitelem je hlodoun východoafrický (*Tachyoryctes splendens*). Dalšími známými přirozenými hostiteli jsou buvol africký (*Syncerus caffer*) a osel africký (*Equus africanus*). *Cryptosporidium proliferans* bylo experimentálně

přeneseno na řadu dalších hostitelů (Tabulka 3), přičemž během infekce *C. proliferans* v GIT traktu hostitele nejsou zaznamenány žádné klinické příznaky typické pro projev kryptosporidiózy (Kváč et al. 2016). Vysporulované oocysty mají velikost v průměru $7,7 \times 5,3 \mu\text{m}$ (Kváč et al. 2016).

2.9.2. *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* Tyzzer, 1912

Druh *C. parvum* byl druhou popsanou kryptosporidií, kterou popsal E. E. Tyzzer v roce 1912. Odlišil *C. parvum* od *C. muris* na základě menších oocyst a lokalizace v hostiteli. *Cryptosporidium parvum* je považováno za nejméně hostitelsky specifický druh a bylo detekováno a experimentálně přeneseno na celou řadu hostitelů včetně člověka a je předpokládána vnímavost všech savců (Fayer et al. 2000, 2004).

Infekce *C. parvum* u různých hostitelů často postihuje tenké a tlusté střevo (Tzipori et al. 1981) a způsobuje postupné vymizení mikrokloků, submukózní edém a zánětlivé infiltrace v *lamina propria*. Infekce v tlustém střevě probíhá nezávisle s infekcí tenkého střeva, kde způsobuje enteritidy, atrofii kloků a jejich postupné zkracování (Lumadue et al. 1998). Nejčastěji je infekční pro neonatální zvířata a projevuje se především u telat ve věku 8 týdnů (Santín et al. 2004; Fayer et al. 2006, 2007; Langkjaer et al. 2007). V přirozených podmínkách se však příznaky projevují již krátce po narození, kdy se nejvíce nákaza projevuje u telat od 1 do 3 týdnů spojená s vodnatým průjmem a akutním průběhem s doplňujícími příznaky jako je deprese, slabost a anorexie (Howerth 1981; Tzipori et al. 1983; Fayer et al. 1998; Huetink et al. 2001; Nydam et al. 2001; Castro-Hermida et al. 2002; Santín et al. 2004).

Upton et Current (1985) uvádějí tvar oocyst *C. parvum* elipsovité o velikosti $4,5 \times 5,0 \mu\text{m}$.

Vzhledem k vnímavosti velmi širokého spektra hostitelů k *C. parvum*, zde nebude uveden přehled hostitelů *C. parvum*.

3. CÍLE PRÁCE

1. Ověřit, zda oocysty střevních kryptosporidií (*C. parvum*) potřebují být pro úspěšnou infekci hostitele vystaveny nízkému pH v žaludku a je-li možné infikovat hostitele aplikací oocyst do různých částí tenkého střeva. Popsat nejvhodnější část tenkého střeva pro chirurgické aplikace střevních kryptosporidií.
2. Ověřit, zda oocysty žaludečních kryptosporidií (*C. proliferans*) potřebují být pro úspěšnou infekci hostitele vystaveny vysokému pH ve střevě.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. MATERIÁL

4.1.1. INOKULUM

Cryptosporidium proliferans (dříve známo jako *C. muris* TS03) získaný z přirozeně infikovaného hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) a od roku 2003 udržovaný v laboratorních podmínkách v SCID (Severe Combined Immunodeficiency) myších a krysách malých (*Mastomys coucha*) v Parazitologickém ústavu Biologického centra AVČR v.v.i. v Českých Budějovicích.

Cryptosporidium parvum získané z přirozeně infikovaného 18-ti denního telete Holštýnského skotu.

Molekulární charakterizace inokula byla provedena před započítáním všech experimentů (4.2.6.2.).

4.1.2. EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA

SCID myši získané z chovu Parazitologického ústavu, Biologického centra AVČR, v.v.i. v Českých Budějovicích.

4.2. METODY

4.2.1. MIKROSKOPICKÁ DETEKCE OOCYST KRYPTOSPORIDIÍ (BARVENÍ ANILIN-KARBOL-METHYL VIOLETÍ Miláček et Vítovec, 1985)

ROZTOKY

1. Roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti; 1 ml anilinu; 1 g fenolu; 30 ml 96% alkoholu; 70 ml dH₂O).
2. 2% kyselina sírová.
3. Tartrazin (1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové).

POSTUP

1. Tenký nátěr trusu na podložním sklíčku fixovat methanolem v plameni.
2. Zchladlý vzorek barvit roztokem methylvioleti po dobu 30 minut.

3. Důkladně propláchnout pod vodovodní vodou a 10 minut diferencovat v 2% roztoku kyseliny sírové.
4. Vzorek propláchnout pod tekoucí vodou a dobarvit roztokem tartrazinu po dobu 5 minut.
5. Vzorek opláchnout pod tekoucí vodou, usušit a mikroskopicky vyhodnotit.

HODNOCENÍ VZORKU

Tato metoda je založena na principu specifického barvení oocyst v nátěru trusu a jejich odlišení od ostatních objektů. Oocysty kryptosporidií se barví do tmavě fialova na žluto-hnědém až fialově-hnědém pozadí. Vzhledem k velikosti oocyst lze od sebe rozlišit žaludeční a střevní druhy kryptosporidií. Oválné cysty žaludečních druhů kryptosporidií měří v průměru $7,5 \times 5,5 \mu\text{m}$. Tvar oocyst střevních druhů kryptosporidií je okrouhlý až lehce oválný o velikosti $4,5 \times 5,0 \mu\text{m}$.

Charakteristickým znakem oocysty je přítomnost reziduálního tělíska, které se barví tmavě fialově.

Nátěr trusu byl prohlížen světelným mikroskopem (Olympus IX51) za použití imerzního objektivu (zvětšení 1000 \times) a imerzního oleje.

4.2.2. MĚŘENÍ pH V ŽALUDKU MYŠI A TRUSU TELAT

Skupina 10-ti osmi týdních SCID myši byla humánně usmrcena. Bezprostředně po prokázání smrti byl vyjmut žaludek zvířete a bylo změřeno pH žaludečního obsahu. U deseti 14-23 denních telat bylo změřeno pH trusu ihned po vykálení. Hodnoty pH byly měřeny pomocí vpichové kombinované pH elektrody HC123, THETA '90. Z naměřených hodnot byla vypočtena průměrná hodnota pH.

4.2.3. PURIFIKACE OOCYST

Trus experimentálně a přirozeně infikovaných hostitelů obsahující oocysty druhů *C. proliferans* nebo *C. parvum* byl zhomogenizován ve třecí misce, přečištěn pomocí sacharózového gradientu (4.2.3.1.) a následně dočištěn na cesium chloridovém gradientu (4.2.3.2.). Dále byl získaný izolát přefiltrován přes sítko o velikosti ok 10 μm . Získané oocysty byly uskladněny ve fosfátovém pufru (PBS, Phosphate-Buffered Saline) při 4-8 $^{\circ}\text{C}$ bez přidaných fixačních roztoků, antibiotik a antimykotik.

4.2.3.1. SACHARÓZOVÝ GRADIENT Arrowood et Sterling, 1987

ROZTOKY

1. Sheaterův cukerný roztok (259 ml deionizované vody (dH₂O); 405 g cukru; 7,29 g fenolu).
2. 1% PBS Tween (1% Tween 20 v PBS (1 l dH₂O; 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄ × 12 H₂O; 2,4 g KH₂PO₄).
3. Pracovní Sheaterovy roztoky
roztok 1: 1 + 2 (1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly 1% PBS Tween)
roztok 2: 1 + 4 (1 díl Sheaterova roztoku + 4 díly 1% PBS Tween)

POSTUP

1. Trus zhomogenizovat ve třecí misce a vzniklou suspenzi přecedit přes čajové sítko.
2. Do silnostěnných centrifugačních skleněných zkumavek (objem 100 ml) navrstvit gradient (1. vrstva 30 ml Sheaterův roztok 1; 2. vrstva 30 ml Sheaterův roztok 2).
3. 15 ml suspenze oocyst v PBS navrstvit na sacharózový gradient.
4. Centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C.
5. Odsát horní vrstvu na rozhraní vody a Sheaterova roztoku 1+4 a zbylý supernatant přenést do čisté zkumavky a doplnit PBS.
6. Centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C a opakovat krok 5 a opět centrifugovat.
7. 1/2 objemu odsát, opět doplnit PBS a centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C.
8. Pelet s oocystami uchovávat při 4-8 °C v PBS.

4.2.3.2. CESIUM CHLORIDOVÝ GRADIENT

ROZTOKY

1. Roztok cesium chloridu (21,07 g CsCl (>99% čistota) + 100 ml dH₂O).
2. PBS (pH 7,2).

POSTUP

1. Trus po přečištění na sacharózovém gradientu centrifugovat 10 minut při 1450 g a 4 °C.

2. Odebrat supernatant a sediment obsahující oocysty resuspendovat v 0,5 ml PBS.
3. Do čisté mikrozkuhavky přidat 1 ml CsCl a převrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
4. Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C.
5. Odebrat 1 ml supernatantu s oocystami a naředit v nadbytku dH₂O.
6. Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C.
7. Odebrat supernatant a vzorek opět centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C.
8. Přečištěné oocysty skladovat v dH₂O při 4-8 °C.

4.2.3.3. PŘEČIŠTĚNÍ OOCYST ZÍSKANÝCH PŘÍMO ZE ŽALUDKU INFIKOVANÝCH HOSTITELŮ

1. Humánně usmrtit experimentálně infikovanou SCID myš (pozitivní na *C. proliferans* s minimální intenzitou infekce 1×10^6 oocyst/gram trusu).
2. Vyjmout žaludek a opláchnout v PBS.
3. Obsah žaludku přenést do PBS příslušného pH z měření výsledků pH žaludků (4.2.2.).
4. Suspenzi přecedit přes sítko o velikosti ok 45 μ m.
5. Přečištěné oocysty skladovat při 4-8 °C.

4.2.4. PŘÍPRAVA INOKULAČNÍ DÁVKY

Všechna zvířata byla inokulována dávkou 1×10^6 oocyst/zvíře. Toto množství oocyst v dávce bylo u čistých a získaných oocyst ze žaludků spočítáno v Bürkerově komůrce a u nepřečištěných vzorků byla velikost inokulační dávky vypočtena dle hodnocení intenzity infekce (4.2.5.). Pro experimentální inokulace byly použity oocysty a trus pozitivní na oocysty o různém stáří (podrobněji popsáno v kapitole 4.3.).

4.2.5. HODNOCENÍ INTENZITY INFEKCE

Intenzita infekce byla vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu (OPG, oocyst per gram). Každé podložní sklo bylo zváženo před provedením nátěru a bezprostředně po něm s přesností na 0,001 g. Při nízké intenzitě byly počítány

všechny oocysty nalezené na preparátu, při vysoké intenzitě byl počítán počet oocyst ve 30 náhodných zorných polích. Ze zjištěných údajů (hmotnost trusu, počet zorných polí a počet oocyst na sklíčku) byla odhadnuta intenzita infekce jako OPG dle publikovaného postupu (Kvác et al. 2007).

4.2.6. GENOTYPIZACE KRYPTOSPORIDIÍ

4.2.6.1. IZOLACE DNA

DNA byla izolována z 200 mg trusu nebo ze 100 000 purifikovaných oocyst pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex).

SLOŽENÍ KITU

1. Elution Buffer D 200 µl/l vzorek.
2. Lysis Buffer P.
3. Proteinase K lyofylizát.
4. Promývací pufry Wash I a Wash II.
5. Binding Buffer P.
6. Kolony se sběrnými zkumavkami.
7. InviAdsorb zkumavky.

POSTUP

1. Ke 200 mg trusu nebo oocystám v 200 µl PBS přidat skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm (cca 100-200 µl); 0,8-1,2 ml Lysis Buffer P a rozbít 1 minutu při rychlosti 5,5 m.s⁻¹ užitím bead beateru (Fast Prep 24 Instrument, MP Bio).
2. Inkubovat v termobloku 10 minut při 95 °C.
3. Centrifugovat 1 minutu při 13 400 g.
4. Veškerý supernatant přenést do InviAdsorb zkumavek, zvortexovat a 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě a následně centrifugovat 3 minuty při 13 400 g.
5. Supernatant přepipetovat do čistých 1,5 ml mikrozkušavek, centrifugace 3 minuty 13 400 g.
6. Do čistých 1,5 ml mikrozkušavek napipetovat 25 µl Proteinase K a přidat 400 µl supernatantu, zvortexovat.
7. Inkubovat v termobloku 10 minut při 70 °C.
8. Připipetovat 200 µl Binding Buffer P, zvortexovat.

9. Přenést veškerý objem na kolony se sběrnými mikrozkušavkami a inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a následně centrifugovat 1 minutu při 13 400 g.
10. Vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, napipetovat 500 µl Wash I a centrifugovat 1 minutu při 13 400 g.
11. Vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, napipetovat 800 µl Wash II a centrifugovat 1 minutu 13 400 g.
12. Vylít odpad a opět centrifugovat 3 minuty při 13 400 g.
13. Kolonu dát na čistou 1,5 ml mikrozkušavku, na kolonu napipetovat 200 µl přehřáté dH₂O.
14. Inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.

4.2.6.2. GENOTYPIZACE

Druh a subtyp kryptosporidií používaných v této práci byl ověřen pomocí nested PCR amplifikující částečnou sekvenci genů kódujících malou ribozomální podjednotku rRNA (SSU rDNA; Xiao et al. 1999), 60 kDA glykoprotein (GP60, pouze pro *C. parvum*; Alves et al. 2003) a 90 kDA Heat Shock Protein (HSP90, pouze pro *C. proliferans*; Feng et al. 2011). Složení PCR reakcí a amplifikační programy pro jednotlivé geny jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5.

Tabulka 4. Rozpis reagensů primární a sekundární reakce pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku, 60 kDA glykoprotein a 90 kDA Heat Shock Protein parazitů rodu *Cryptosporidium*

REAGENCIE	PRIMÁRNÍ REAKCE			SEKUNDÁRNÍ REAKCE		
	(µl)			(µl)		
	SSU	GP60	HSP90	SSU	GP60	HSP90
H ₂ O	10,00	9,10	16,45	10,00	9,90	16,45
MgCl ₂ (25 mM)	2,40	2,40	3,60	2,40	2,40	3,60
5× Puffer	4,00	4,00	6,00	4,00	4,00	6,00
dNTPs (10 mM)	0,50	0,40	0,60	0,50	0,40	0,60
Forward primer (10 µM)	0,50	1,00	0,60	0,50	1,00	0,60
Reverse primer (10 µM)	0,50	1,00	0,60	0,50	1,00	0,60
Tag (5 U/1 µl)	0,10	0,10	0,15	0,10	0,10	0,15
DNA	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
CELKEM	20,00	20,00	30,00	20,00	20,00	30,00

Tabulka 5. Přehled amplifikačních cyklů pro nested PCR části genu kódujícího malou ribosomální podjednotku, 60 kDA glykoprotein a 90 kDA Heat Shock Protein parazitů rodu *Cryptosporidium*

REAGENCIE	PRIMÁRNÍ REAKCE			SEKUNDÁRNÍ REAKCE		
	SSU	GP60	HSP90	SSU	GP60	HSP90
Počáteční denaturace	3 min./94°C			3 min./94°C		
Počet cyklů	35			35		
Nasedací teplota primerů	45 s/55 °C	45 s/50 °C	45 s/55 °C	45 s/55 °C	45 s/50 °C	45 s/52 °C
Extenze	60 s/72 °C			60 s/72 °C		
Finální extenze	7 min./72 °C			7 min./72 °C		
Zchlazení	10 min./4 °C			10 min./4 °C		

Získané nukleotidové sekvence byly editovány v programu Chromas Pro 1.7.5 (Technelysium, Pty, Ltd.) a srovnány s referenčními sekvencemi uloženými v GenBank pomocí programu MAFFT verze 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>).

4.2.7. CHIRURGICKÁ APLIKACE INFEKČNÍ DÁVKY

NÁSTROJE A MEDIKAMENTY

1. Holicí strojek, sterilní podložka, chirurgická nit s jehlou (Vicryl 75 cm 1,5), chirurgický jednorázový skalpel, oční nůžky, oční pinzety, inzulinové injekční stříkačky (pro aplikaci medikamentů a infekční dávky), gázové tampony, operační rouška, chirurgické rukavice.
2. Dexdomitor (dexmedetomidin, sedativum) a Narketan (ketamin, anestetikum), Antisedan (atipamezolum, antidotum dexdomitoru), fyziologický roztok, Baytril (enrofloxacinum, antibiotikum), Betadine (povidonum iodinum, dezinfekce).
3. Infekční dávka kryptosporidií.

APLIKACE ANESTETIK

1. V inzulinové injekční stříkačce smíchat 0,02 ml Dexdomitoru, 0,01 ml Narketanu a 0,17 ml fyziologického roztoku. Anestetikum aplikovat intramuskulárně (i.m.) v dávce 0,1 ml/myš.

POSTUP OPERACE

1. Vyholit operační pole (abdomen), místo plánovaného zákroku dezinfikovat (3×), myš zafixovat pomocí roušky k podložce.

2. Pokud je hlodavec ve spolehlivé anestezii (nereaguje na tlak v meziprstí) vést kožní incizi v mediální rovině, dutinu břišní otevřít incizí v *linea alba* (zamezení krváčení a pooperačním komplikacím).
3. Vymout indikovanou část střeva nebo žaludku na sterilní roušku a injekčně aplikovat do lumen infekční dávku *C. proliferans* nebo *C. parvum*.
4. Pomocí gázy vrátit střeva zpět do břišní dutiny, případně vlhčit fyziologickým roztokem.
5. Peritoneum s muskulární vrstvou břišní stěny šít dohromady jednoduchým pokračovacím stehem, epidermis, dermis a hypodermis šít dohromady jednoduchým uzlíčkovým stehem.
6. Injekčně aplikovat subkutánně (s.c.) Baytril v dávce 0,02 ml/myš.
7. Injekčně aplikovat i.m. Antisedan v dávce 0,01 ml/myš.

POOPERAČNÍ PÉČE

Antibiotika aplikovat 1× denně (s.c. Baytril) v dávce 0,01 ml/myš po dobu 4-5 dnů. Po celou dobu aplikace antibiotik chovat hlodavce v suchém, ubrouskem či buničinou podestlaném čistém boxu pod infračerveným světelným zdrojem. Pokud rána nehnisá, je možno hlodavce 5. den podestlat pilinami. Všechna operovaná zvířata držet individuálně.

4.3. DESIGN EXPERIMENTŮ

4.3.1. TEST INFEKTIVITY OOCYST *C. PARVUM* A *C. PROLIFERANS* APLIKOVANÉ PER ORÁLNĚ

Dvě skupiny po třech SCID myších byly inokulovány čistými (4.2.3.1. a 4.2.3.2.) oocystami (ve stáří 7 dnů od získání trusu a po přečištění) *C. parvum* a *C. proliferans* pomocí jícnové sondy v dávce v počtu 1×10^6 oocyst/zvíře v 200 μ l dH₂O (Tabulka 6).

Čtyři skupiny po třech SCID myších byly pomocí jícnové sondy inokulovány surovým nepřečištěným tekutým trusem obsahujícím oocysty *C. parvum* (1×10^6 ve 200 μ l). Pro každou skupinu byly použity oocysty o různém stáří, a to 7, 28, 56 a 84 dnů (Tabulka 6).

Skupina o třech SCID myších byla pomocí jícnové sondy v dávce 1×10^6 oocyst/zvíře ve 200 μ l inokulována surovým, nepřečištěným trusem obsahujícím

oocysty *C. proliferans*. Vzhledem ke konzistenci trusu hlodavců, byla infekční dávka rozředěna v dH₂O. Byly použity oocysty o stáří 7 dní (Tabulka 6).

Skupina o 3 SCID myších byla inokulována oocystami *C. proliferans* získaných přímo z žaludků experimentálně infikovaných SCID myší. Myši byly inokulovány pomocí jícnové sondy v dávce 1×10^6 oocyst/zvíře v 200 μ l dH₂O o pH upraveném dle výsledků měření (5.1.) a postupu uvedeném v kapitole 4.2.2. Byly použity oocysty o stáří 1 dne od získání a přečištění (Tabulka 6).

Skupina o 3 SCID myší byla inokulována jícnovou sondou čistými 7 dnů starými oocystami *C. proliferans* v dávce v počtu 1×10^6 oocyst/zvíře zhomogenizované v 200 μ l dH₂O s přídavkem 200 μ l 30% roztoku síranu barnatého (BaSO₄; Tabulka 6).

4.3.2. CHIRURGICKÁ APLIKACE INOKULAČNÍ DÁVKY *C. PARVUM* A *C. PROLIFERANS* DO INTESTINUM TENUE

Celkem 9 SCID myší bylo rozděleno na tři skupiny po 3 myších. Všechna zvířata byla chirurgicky inokulována čistými oocystami *C. parvum* v infekční dávce 1×10^6 oocyst/zvíře ve 100 μ l PBS o pH 6,15. I. pokusná skupina byla inokulována infekční dávkou do *duodenum*, II. pokusná skupina do *jejunum* a III. pokusná skupina do *ileum*. Byly použity oocysty o stáří 7 dnů od získání trusu a po přečištění (4.2.3.1. a 4.2.3.2.). Každé zvíře bylo chováno v samostatné chovné nádobě (Tabulka 6).

Celkem 9 SCID myší bylo rozděleno na tři skupiny po 3 myších. Všechna zvířata byla chirurgicky inokulována čistými oocystami *C. proliferans* v infekční dávce 1×10^6 oocyst/zvíře v 100 μ l PBS o pH 6,15. I. pokusná skupina byla inokulována infekční dávkou do *duodenum*, II. pokusná skupina do *jejunum* a III. pokusná skupina do *ileum*. Byly použity oocysty o stáří 7 dnů od získání trusu a po přečištění (4.2.3.1. a 4.2.3.2.). Každé zvíře bylo chováno v samostatné chovné nádobě (Tabulka 6).

Celkem 12 SCID myší bylo rozděleno na čtyři skupiny po 3 zvířatech. Všem zvířatům bylo chirurgicky aplikováno 100 μ l nečištěného tekutého trusu s obsahem oocyst kmene *C. parvum* v dávce 1×10^6 oocyst/zvíře ve 100 μ l PBS o pH 6,15 do *jejunum* oocystami ve stáří 7, 28, 56 a 84 dny. Každé zvíře bylo chováno v samostatné chovné nádobě (Tabulka 6).

4.3.3. CHIRURGICKÁ APLIKACE INOKULAČNÍ DÁVKY *C. PROLIFERANS* DO DUODENUM MYŠI A NÁSLEDNÁ DETEKCE POHYBU DÁVKY S POMOCÍ ROZTOKU BARIA (BaSO₄) POD RTG

Třem SCID myším byla chirurgicky aplikována čistá dávka 1×10^6 oocyst/zvíře *C. proliferans* v 200 μ l 30 % BaSO₄ ve stáří oocyst 7 dnů od získání a přečištění. Barium bylo použito k detekci pohybu infekční dávky v GIT zvířete pod RTG. Zvířata byla rentgenována v pravidelných intervalech každých 10, 20 a 30 min po operaci a poté v hodinovém intervalu 1-6 hodin po operaci. Každé zvíře bylo chováno v samostatné chovné nádobě (Tabulka 6).

Tabulka 6. Design experimentů

Způsob aplikace	Forma inokula	Stáří inokula [dny]	Místo inokulace	Počet inokulovaných zvířat	
				<i>C. parvum</i>	<i>C. proliferans</i>
CHIRURGICKY	Čisté oocysty	7	<i>Duodenum</i>	3	3
			<i>Jejunum</i>	3	3
			<i>Ileum</i>	3	3
	Surový trus	7 28 56 84	<i>Jejunum</i>	3	×
				3	×
				3	×
				3	×
Čisté oocysty v 30% BaSO ₄	7	<i>Duodenum</i>	×	3	
PER ORÁLNĚ	Čisté oocysty	7	<i>Oesophagus</i>	3	3
	Čisté oocysty v 30% BaSO ₄	7		×	3
	Surový trus	7		3	3
		28		3	×
		56		3	×
		84		3	×
Oocysty ze žaludku	1	×	3		

4.3.4. HODNOCENÍ PRŮBĚHU INFEKCE

Od prvního dne po inokulaci byly u všech pokusných zvířat odebírány vzorky trusu každý den. Odebrané vzorky byly obarveny metodou dle Miláčka a Vítovce (4.2.1.) a mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost oocyst *C. parvum* a *C. proliferans*. Byla zaznamenána prepatentní a patentní perioda a byla odhadnuta intenzita infekce (4.2.5.). Kryptosporidie získané z infikovaných zvířat byly genotypizovány (4.2.6.2.) a výsledky porovnány s původním inokulem.

Všechny experimenty byly ukončeny 30. den po inokulaci.

4.4. STATISTICKÁ ANALÝZA

Výsledky jednotlivých dílčích studií byly statisticky vyhodnoceny pomocí chí-kvadrát testu a studentova t-testu. K testování nulové hypotézy byl použit test T2 Hotelling. U experimentálně infikovaných zvířat byly kumulované hodnoty intenzity infekce vypočteny jako poměr plochy pod křivkou (AUC, area under the curve).

Rozdíly v průběhu infekce mezi všemi skupinami experimentálně infikovaných zvířat byly testovány pomocí studentova t-testu. Bonferroniho korekce byla provedena vzhledem k mnohačetným srovnáním jednotlivých skupin zvířat v experimentu. Všechny statistické výpočty byly provedeny v programovacím prostředí R 2.15.0 (R Development Core Team, 2007) a EpiInfo (TM), 7.1.1.14 (CDC, USA, Atlanta).

5. VÝSLEDKY

Částečné sekvence SSU rDNA, GP60 (pouze u *C. parvum*) a HSP90 (pouze u *C. proliferans*) získané z oocyst pocházejících z úspěšně infikovaných experimentálních zvířat byly 100 % identické se sekvencemi získanými z použitých inokulačních dávek.

5.1. HODNOTA pH ŽALUDKU SCID MYŠÍ

S ohledem na potřebu uchovávat oocysty *C. proliferans*, získané přímo ze žaludečního obsahu infikovaných SCID myší, v podmínkách (pH) odpovídajících žaludku myši, bylo naměřeno pH žaludečního obsahu použitých laboratorních hostitelů. V rámci opakovaného měření byla naměřena průměrná hodnota pH 4,0. Naměřená hodnota byla použita jako referenční pH v dalších experimentech.

5.2. HODNOTA pH TRUSU TELAT

S ohledem na potřebu uchovávat oocysty *C. parvum*, získané přímo ze střevního obsahu infikovaných telat, v podmínkách (pH) odpovídajících trusu telat, bylo naměřeno pH střevního obsahu. V rámci opakovaného měření byla naměřena průměrná hodnota pH 6,15. Naměřená hodnota byla použita jako referenční pH v dalších experimentech.

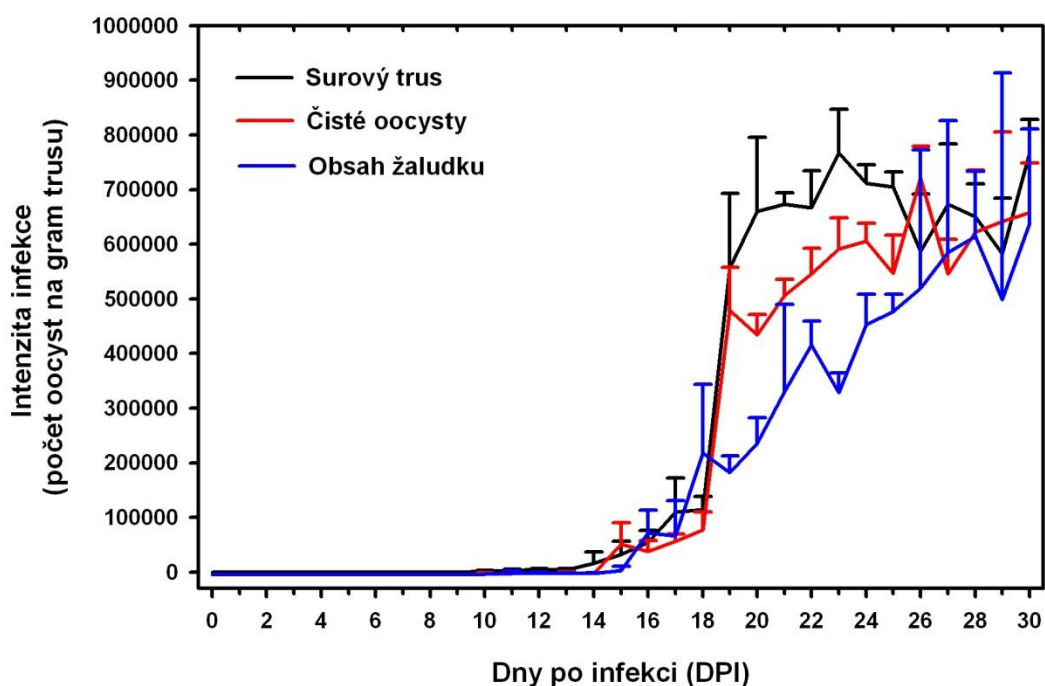
5.3. INFEKTIVITA OOCYST *C. PROLIFERANS*

Všechny SCID myši per orálně infikované 7 dní starou, čistou infekční dávkou s oocystami *C. proliferans* začaly vylučovat oocysty do 10 DPI. Maximální intenzita infekce byla dosažena 25 DPI. Všechna infikovaná zvířata vylučovala oocysty *C. proliferans* po celou dobu experimentu (do 30 DPI). U zvířat infikovaných rozředěným trusem byla pozorována prepatentní perioda v rozmezí 9-10 DPI. V porovnání se skupinou zvířat infikovaných čistými oocystami, nebyly zjištěny žádné rozdíly v patentní periodě ani v intenzitě infekce ($p < 0,05$). U zvířat infikovaných oocystami *C. proliferans* získaných ze žaludečního obsahu, také nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) v prepatentní a patentní periodě a intenzitě infekce (Graf 1).

U chirurgicky infikovaných SCID myší dávkou *C. proliferans* do *jejunum* a *ileum*, nebyla v trusu prokázána přítomnost infekce *C. proliferans*. U jednoho zvířete ze tří, která byla infikována do *duodenum*, byla zaznamenána přítomnost oocyst v trusu

18-19 DPI. Pro ověření, zda infekční dávka aplikovaná do *duodenum*, při chirurgické aplikaci neproniká do žaludku, byl v následujícím experimentu sledován pohyb infekční dávky v zažívacím traktu zvířat pomocí roztoku BaSO₄ a radiologické zobrazovací metody v časových intervalech.

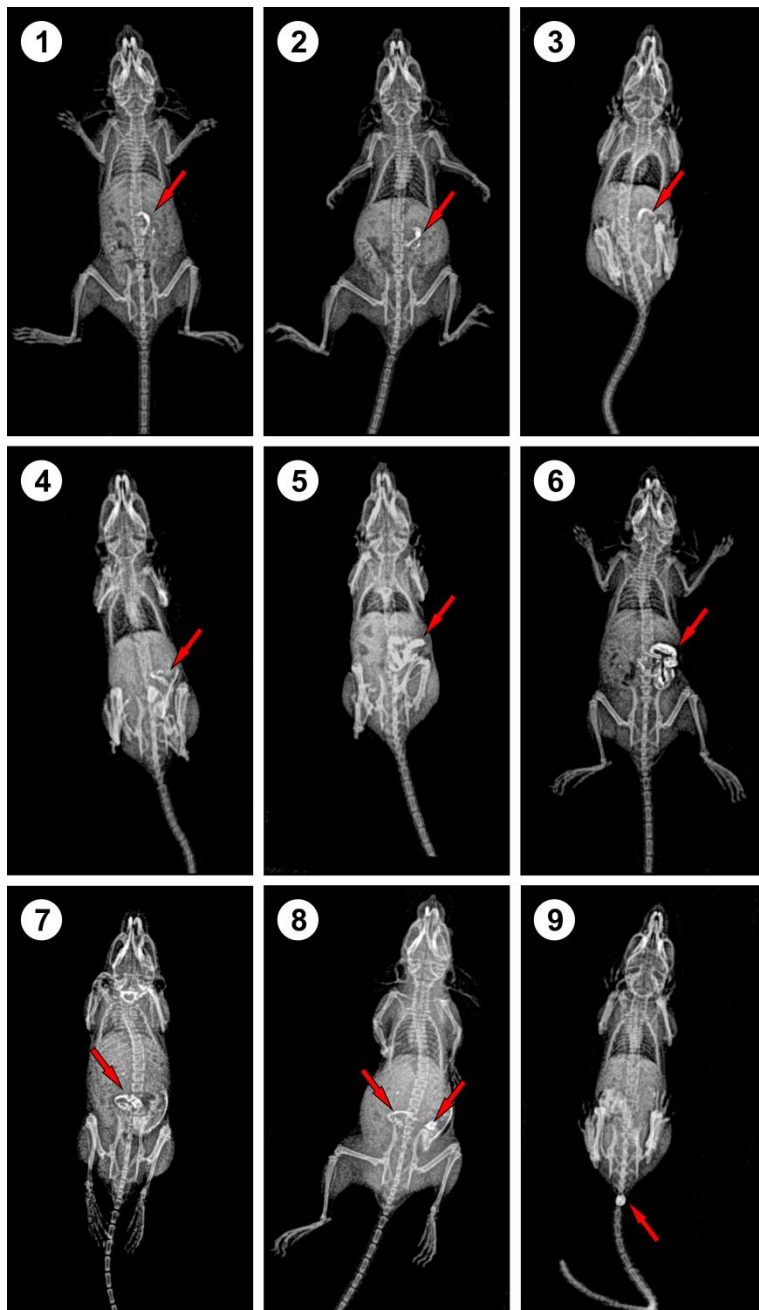
Graf 1. Průběh infekce u SCID myši per orálně inokulovaných dávkou 1×10^6 oocyst/zvíře kmenem *Cryptosporidium proliferans*: (1) přečištěných na cesium chloridovém gradientu (stáří vzorku 7 dní), (2) v surovém trusu resuspendovaném v deionizované vodě o pH 6,15 (ve stáří vzorku 7 dní), (3) získaných z žaludku infikované SCID myši a naředěné deionizovanou vodou o pH 4 (stáří vzorku 1 den)



5.4. RTG VYŠETŘENÍ DETEKCE POHYBU DÁVKY POMOCÍ Ba

U skupiny tří SCID myši per orálně inokulovaných dávkou 1×10^6 oocyst/zvíře kmenem *C. proliferans* suspendovaném v 30% roztoku BaSO₄ byl zaznamenán rozvoj infekce s detekcí oocyst v trusu od 11-12 DPI. Rentgenologické vyšetření neprokázalo u žádného chirurgicky inokulovaného zvířete vniknutí infekční dávky do žaludku myši (Obrázek 2) a všechna zvířata chirurgicky inokulovaná byla prostá infekce *C. proliferans*.

Obrázek 2. Rentgenový obraz pohybu infekční dávky *C. proliferans* v GIT myši chirurgicky aplikované do *duodenum*, v časových intervalech po chirurgickém zákroku: (1) 10 minut; (2) 20 minut; (3) 30 minut; (4) 1 hodina; (5) 2 hodiny; (6) 3 hodiny; (7) 4 hodiny; (8) 5 hodin; (9) 6 hodin



5.5. INFEKTIVITA OOCYST *C. PARVUM*

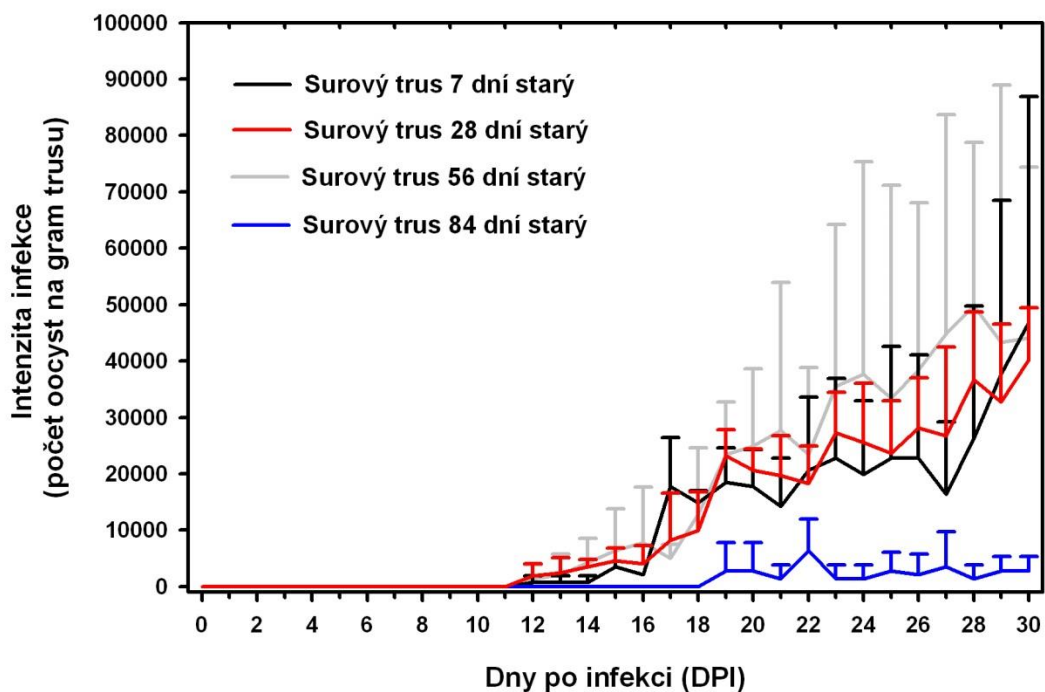
Všechny SCID myši per orálně infikované 7 dní starou, čistou infekční dávkou s oocystami *C. parvum* začaly vylučovat oocysty od 15 do 20 DPI. Maximální intenzita infekce byla dosažena 30 DPI, tedy na konci experimentu. Všechna infikovaná zvířata vylučovala oocysty *C. parvum* po celou dobu experimentu. U zvířat per orálně infikovaných tekutým trusem starým 7, 28, 56 a 84 dní byla pozorována prepatentní perioda v rozmezí 14-20 DPI. V porovnání se skupinou zvířat infikovaných čistými oocystami, nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v patentní periodě ani v intenzitě infekce ($p < 0,05$).

Všechna zvířata chirurgicky inokulovaná čistými oocystami *C. parvum* do *duodenum*, *jejunum* a *ileum*, byla vnímavá k infekci, nicméně byly zjištěny výrazné rozdíly v průběhu infekce. Zatímco zvířata inokulovaná do *ileum* a *jejunum* začala intenzivně vylučovat oocysty od 14 DPI, SCID myši inokulované do *duodenum* až od 25 DPI. U SCID myši inokulovaných do *jejunum*, se průběh infekce nelišil od zvířat infikovaných stejnou dávkou per orálně. Naopak myši inokulované přímo do *ileum* se samovyléčily během 2 dnů a u zvířat inokulovaných do *duodenum* byla pozorována chronická infekce s velmi nízkou intenzitou (méně než 3000 OPG).

Výsledky úspěšnosti chirurgické infekce do různých částí tenkého střeva byly použity pro následující experimenty a infekční dávka oocyst *C. parvum* byla dále chirurgicky aplikována pouze do *jejunum*.

U zvířat inokulovaných do *jejunum* pomocí oocyst *C. parvum* v tekutém trusu o stáří 7, 28, 56 a 84 dní, byla prokázána přítomnost oocyst u všech zvířat. Zjištěná prepatentní perioda se pohybovala v rozmezí 12-20 DPI bez statisticky významného rozdílu mezi skupinami ($p < 0,05$). Taktéž nebyl zjištěn rozdíl v průběhu infekcí mezi jednotlivými skupinami zvířat a všechna vylučovala oocysty *C. parvum* po celou dobu experimentu (Graf 2).

Graf 2. Průběh infekce u SCID myši chirurgicky infikovaných do *jejunum* dávkou *Cryptosporidium parvum* v počtu 1×10^6 oocyst/zvíře o stáří trusu 7, 28, 56 a 84 dní



5.6. KLINICKÉ PŘÍZNAKY KRYPTOSPORIDIÓZY V PRŮBĚHU INFEKČÍ

V průběhu všech experimentů nebyly u infikovaných zvířat pozorovány žádné klinické příznaky onemocnění. Zvířata chirurgicky infikována nevykazovala žádné zdravotní ani negativní projevy a rána se bez komplikací zcela zahojila.

6. DISKUZE

Kryptosporidie jsou obecně považovány za patogeny způsobující vodnaté a nekrvavé průjmy svých hostitelů, ale na základě dnešních znalostí je nezbytné poznamenat, že průběh kryptosporidiózy včetně klinických příznaků je závislý na řadě faktorů, zejména na druhu/genotypu kryptosporidií, na druhu hostitele a jeho imunitního stavu (Lindsay et Blagburn 1990; Pereira et al. 2002; Baishanbo et al. 2005; Kváč et al 2013a; Ryan et Xiao 2014).

In vitro studie prokázaly, že jak střevní (*C. parvum*), tak i žaludeční (*C. muris* a *C. andersoni*) druhy kryptosporidií jsou schopny dokončit svůj vývojový cyklus během 1-3 dnů (Current et Haynes 1984; Hijjawi et al. 2002, 2004; Smith et al. 2005), ale experimentální *in vivo* studie ukázaly značnou variabilitu v průběhu infekce v závislosti na druhu hostitele s nepoměrně delším časem pro ukončení cyklu. V přirozených hostitelích se obecně délka prepatentní periody pohybuje v rozmezí 2 až 25 dnů (Iseki 1979; Tzipori 1983; Enemark et al. 2003; Kváč et al. 2013a-c, 2014, 2016). Například prepatentní perioda *C. parvum* v telatech se pohybuje od 2 do 7 dnů (Tzipori 1983), *C. bovis* ve skotu od 10 do 12 dnů (Fayer et al. 2005) nebo *C. baileyi* v kuřatech od 4 do 24 dnů (Current et al. 1986).

V této práci byla u *C. parvum* aplikovaného per orálně v čištěném či nečištěném (surovém) trusu zaznamenána prepatentní perioda od 14-15 DPI a v případě chirurgické aplikace do *jejunum* vylučování oocyst *C. parvum* nastalo od 12-16 DPI. Tyto výsledky odpovídají průběhu infekce dříve publikovaných prací, ve kterých byla detekována prepatentní perioda různými kmeny *C. parvum* ve SCID myších v rozmezí 7-17 DPI (Hikosaka et al. 2005a; Benamrouz et al. 2012). Námí zjištěná prepatentní perioda ve SCID myších, infikovaných oocystami v čištěném či nečištěném (surovém trusu) stavu (9-10 DPI), byla kratší než dříve publikované výsledky u stejného hostitele (12-18 DPI; Kváč et al. 2011).

V souladu se studiiemi, které prokázaly závislost prepatentní periody na druhu hostitele a na druhu parazita (výše) a zároveň nezávislost průběhu infekce na velikosti infekční dávky (Rhee et al. 1995; Zambriski et al. 2013), bylo v této práci navíc prokázáno, že není rozdíl v průběhu infekce mezi zvířaty inokulovanými čistými oocystami a oocystami v surovém trusu.

Dříve publikovaná data v rámci studia infekivity žaludeční kryptosporidie *C. muris* ukázala, že není rozdíl v průběhu infekce imunokompetentních laboratorních myší inokulovaných čistými oocystami získanými z trusu a oocystami získanými z žaludečního obsahu a seškrabu sliznice (Aydin et Özkul 1996). V námi zopakovaném experimentu s druhem *C. proliferans* bylo dosaženo shodných výsledků. Obě studie prokázaly, že z obsahu žaludku mohou být ve velkém množství získány životaschopné oocysty bez znečišťujících látek, schopné infikovat hostitele bez významného rozdílu v prepatentní a patentní periodě. Z těchto výsledků plyne závěr, že excystace žaludečních kryptosporidií je výhradně stimulována v žaludku hostitele a vystavení oocyst jiným environmentálním tlakům, jako je například průchod střevem v hostiteli, není nutný.

Ve shodě s výsledky Aydina et Özkula (1996) lze konstatovat, že s ohledem na čistotu izolátu je mnohem efektivnější získávat oocysty žaludečních kryptosporidií přímo z obsahu žaludku hostitele, protože při získávání oocyst z trusu, je postup čištění časově náročnější a získaný izolát obsahuje fekální odpad a střevní mikroflóru či jinou mikrobiální kontaminaci.

Oocysty kryptosporidií se vyvinuly s cílem maximalizovat ochranu sporozoitů a chrání je do okamžiku, dokud nejsou pozřeny novým hostitelem. Pro přežití parazita je nezbytné, aby v oocystě přežili sporozoiti, kteří mají velmi omezenou mobilitu, až do predilekčního místa infekce (Yang et al. 1996; Widmer et al. 1999; Jenkins et al. 2003). V současné době se předpokládá, že zatímco si žaludeční druhy zřejmě vyvinuly adaptaci, aby zabránily excystaci ve stejném hostiteli, střevní druhy čelí problémům s předčasným uvolňováním sporozoitů ihned po pozření novým hostitelem. Vědci simulovaly napodobení cestování oocysty přes žaludek vystavením kyselině sialové a bylo prokázáno, že střevní druhy rychleji excystují a tato kyselina může představovat důležitý lokální signál pro excystaci *C. parvum* (Campbell et al. 1992; Robertson et al. 1993; Forney et al. 1996; Kato et al. 2001; Choudhry et al. 2008). V těchto experimentech byly vždy použity čisté oocysty získané z čerstvého trusu, nikoliv z trusu starého více než 1 týden. Podmínky, které vyvolávají excystaci u oocyst *C. parvum* byly podrobně zkoumány (Fayer et Leek 1984; Woodmansee 1987; Campbell et al. 1992; Robertson et al. 1993; Kato et al. 2001; Smith et al. 2005) a bylo však prokázáno, že pro excystaci a aktivaci sporozoitů je zapotřebí mnohem více stimulů než je pH trávicího traktu hostitele (Fayer et Leek 1984). Předčasné uvolnění infekčních

sporozoitů střevních kryptosporidií, zejména v žaludku hostitele, dle předchozích studií způsobuje jejich inaktivaci (Widmer et al. 2007). Z tohoto důvodu jsou hledány metody a postupy, jak infikovat hostitele pouze sporozoity kryptosporidií, protože nelze provést úspěšnou transfekci sporozoitů uvnitř oocysty (Vinayakem et al. 2015).

Vinayaková et al. (2015) prokázali, že lze úspěšně inokulovat hostitele (imunokompetentní myši) prostřednictvím excystovaných sporozoitů *C. parvum*, které byly chirurgicky aplikovány do *jejunum/ileum*. Přestože ve výše zmiňované studii byli pro inokulaci použiti sporozoiti udržovaní v kultivačním médiu a inokulovaná zvířata se z imunitního hlediska lišila, v souladu s výsledky této studie jsme potvrdili, že nejvhodnějším místem pro infekci do *intestinum tenue* je *jejunum*. Zvířata infikovaná do této části střeva vykazovala nejvyšší intenzitu a neoptimálnější rozvoj infekce. Naopak infekce do *duodenum* a *ileum* není příliš vhodná. Jiné studie, které by se zabývaly chirurgickou inokulací hostitele žaludečními či střevními kryptosporidii, nejsou známy.

Zvýše uvedeného se obecně předpokládá, že oocysty střevních druhů musí projít žaludkem, aby došlo k excystaci (Widmer et al. 2007). Tato práce však zásadním způsobem mění pohled na toto dlouhodobě zažité tvrzení. V této studii jsme prokázali, že čisté oocysty vyvolaly u všech chirurgicky inokulovaných hostitelů infekci. Silnostěnné oocysty vylučované v trusu infikovaných jedinců mají 4 vrstvou strukturu stěny oocysty, která slouží jako ochrana sporozoitů před různými environmentálními tlaky (Jenkins et al. 2010b), nicméně při procesu čistění oocyst jsou používány různé chemikálie, které mohou narušit povrchové vrstvy oocysty a tím usnadnit excystaci (Chatterjee et al. 2010). Z tohoto důvodu byly pro infekci *intestinum tenue* použity oocysty v přirozeném stavu. S ohledem na možnost přítomnosti tenkostěnných oocyst v použitém průjmovém trusu, které by mohly způsobit infekci (Blunt et al. 1997; Widmer 1998), byla infekce *intestinum tenue* opakována s oocystami ve stejném trusu, a to 1, 2 a 3 měsíce starým. Vzhledem k tomu, že u všech hostitelů infikovaných oocystami v trusu starým 3 měsíce došlo k rozvoji kryptosporidiové infekce a tenkostěnné oocysty nejsou schopny dlouhodobě přežít ve vnějším prostředí (Blunt et al. 1997; Widmer 1998; Widmer et al. 2007), lze předpokládat, že za infekci byly zodpovědné silnostěnné oocysty.

Oocysty střevních kryptosporidií nemusí být vystaveny účinkům žaludečních enzymů a nízkého pH, aby excystovaly ve střevech hostitele a došlo k infekci enterocytů.

7. ZÁVĚRY

- Oocysty střevní kryptosporidie *C. parvum* jsou infekční pro hostitele i bez nutnosti expozice nízkému pH v žláznatém žaludku.
- *Jejunum* je nejvhodnější část *intestinum tenue* pro chirurgickou aplikaci *C. parvum*.
- Oocysty střevní kryptosporidie *C. parvum* v surovém nečištěném trusu jsou schopné vyvolat infekci i ve stáří trusu 84 dní.
- Oocysty žaludeční kryptosporidie *C. proliferans* jsou infekční pro hostitele i bez nutnosti průchodu tenkým a tlustým střevem.
- Chirurgická aplikace žaludeční kryptosporidie *C. proliferans* do *intestinum tenue* nezpůsobuje vývoj infekce v intestinálním traktu.
- Způsob zpracování a typ infekční dávky (čisté oocysty, surový trus, obsah žaludku) neovlivňuje průběh infekce.

8. LITERATURA

- AKIYOSHI D. E., FENG X., BUCKHOLT M. A., WIDMER G., TZIPORI S. 2002. Genetic analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passage through different host species. *Infect. Immun.* 70: 5670-5675.
- ALVAREZ-PELLIETRO P., SITJA-BOBADILLA 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-BOBADILLA A., REDONDO M. J., PALENZUELA O., PADRÓS F., VÁZQUEZ S., 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. Org.* 62: 133-145.
- ALVES M., XIAO L., SULAIMAN I., LAL A. A., MATOS O., ANTUNES F. 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2744-2747.
- AMADI B., MWIYA M., MUSUKU J., WATUKA A., SIANONGO S., AYOUB A., KELLY P. 2002. Effect of Nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. *The Lancet.* 360: 1375-1380.
- AMADI B., MWIYA M., SIANONGO S. 2009. High dose prolonged treatment with Nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. *BMC. Infect. Dis.* 9: 195.
- ANDERSON B. C. 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.* 24: 235-238.
- APPELBEE A. J., THOMPSON R. C., OLSON M. E. 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian Wildlife-Current status and future needs. *Trends. Parasitol.* 21: 370-376.

- ARCAY L., BRUZAL E. 1993. *Cryptosporidium* en ríos de Venezuela: encuesta epidemiológica de una población humana y fauna en convivencia. *Parasitología al día*. 17: 11-18.
- 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. 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. Scien.* 23: 117-125.
- 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.
- BAISHANBO A., GARGALA G., DELAUNAY A., FRANCOIS A., BALLEST J. J., FAVENNEC L. 2005. Infectivity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* genotype 2 isolates in immunosuppressed Mongolian gerbils. *Infect. Immun.* 73: 5252-5255.
- BAJER A., BEDNARSKA M., PAZIEWSKA A., ROMANOWSKI J., SINSKI E. 2008. Semi-aquatic animals as a source of water contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Wiad. Parazytol.* 54: 315-318.
- BENAMROUZ S., GUYOT K., GAZZOLA S., MOURAY A., CHASSAT T., DELAIRE B., CHABÉ M., GOSSET P., VISCOGLIOSI E., DEI-CAS E., CREUSY C., CONSEIL V., CERTAD G. 2012. *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice infected with only one oocyst: qPCR assessment of parasite replication in tissues and development of digestive cancer. *Plos. One.* 7: e51232.
- BLUNT D. S., KHRAMTSOV N. V., UPTON S. J., MONTELEONE B. A. 1997. Molecular karyotype analysis of *Cryptosporidium parvum*: evidence for eight chromosomes and a low-molecular-size molecule. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 4: 11-13.
- BULL S., CHALMERS R., STURDEE A. P., CURRY A., KENNAUGH J. 1998. Crossreaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Vet. Parasitol.* 77: 195-197.

- CAMPBELL I., TZIPORI S., HUTCHISON G., ANGUS K. W. 1992. Effects of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. *Vet. Rec.* 111: 414-415.
- 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.
- CASTRO-HERMIDA J. A., GONZALEZ-LOSADA Y. A., MEZO-MENENDEZ M., ARES-MAZAS E. 2002. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Vet. Parasitol.* 106: 11-17.
- CHALMERS R. M., DAVIES A. P. 2010. Minireview: Clinical Cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.* 124: 138-146.
- CHATTERJEE A., BANERJEE S., STEFFEN M., O'CONNOR R. M., WARD H. D., ROBBINS P. W., SAMUELSON J. 2010. Evidence for mucin-like glycoproteins that tether sporozoites of *Cryptosporidium parvum* to the inner surface of the oocyst wall. *Euc. Cell.* 9: 84-96.
- CHECKLEY W., WHITE A. C., JAGANATH D., ARROWOOD M. J., CHALMERS R. M., CHEN X., FAYER R., GRIFFITHS J. K., GUERRANT R. L., HEDSTROM L., HUSTON CH. D., KOTLOFF K. L., KANG G., MEAD J. R., MILLER M., PETRI W. A., PRIEST J. W., ROOS D. S., STRIEPEN B., THOMPSON R. C. A., WARD H. D., VOORHIS W. A. V., XIAO L., ZHU G., HOUPPT E. R. 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lan. Infect. Dis.* 15: 85-94.
- CHOUDHRY N., BAJAJ-ELLIOTT M., MCDONALD V. 2008. The terminal sialic acid of glycoconjugates on the surface of intestinal epithelial cells activates excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 76: 3735-3741.
- CORLISS J. O. 1994. An interim utilitarian ("user friendly") hierarchical classification and characterization of the protist. *Acta Protozool.* 33: 1-51.
- CRAWSHAW G. J., MEHREN K. G. 1987. Cryptosporidiosis in ZOO and wild animals. Akademie Verlag. Berlin. pp. 353-362.

- CURRENT W. L., HAYNES T. B. 1984. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science*. 224: 603-605.
- CURRENT W. L., REESE N. C. 1987. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J. Eukar. Microbiol.* 33: 98-108.
- 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.
- DESPOMMIER D. D., KARAPELOU W. 1987. Parasite life cycles. New York: Springer Verlag. pp. 26-27.
- DUBEY J. P., MARKOVITS J. E., KILLARY K. A. 2002. *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet. Pathol.* 39: 363-371.
- DYACHENKO V., KUHNERT Y., SCHMAESCHKE R., ETZOLD M., PANTCHEV N., DAUGSCHIES A. 2009. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. genotypes in European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Germany. *Parasitol.* 137: 205-216.
- EIBACH D., KRUMKAMP R., AL-EMRAN H. M., SARPONG N., HAGEN R. M., ADU-SARKODIE Y., TANNICH E., MAY J. 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. among Children in Rural Ghana. *Plos. Negl. Trop. Dis.* 9: e0003551.
- ELWIN K., HADFIELD S. J., ROBINSON G., CROUCH N. D., CHALMERS R. M. 2012. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *Int. J. Parasitol.* 42: 675-682.
- ENEMARK H. L., AHRENS P., BILLE-HANSEN V., HEEGAARD P. M., VIGRE H., THAMSBORG S. M., LIND P. 2003. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the porcine genotype. *Parasitology.* 126: 407-416.

- ENEMARK H. L., AHRENS P., LOWERY C. J., THAMSBORG S. M., ENEMARK J. M., BILLE-HANSEN V., LIND P. 2002. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterisation. *Vet. Parasitol.* 107: 37-49.
- 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. 2004. *Cryptosporidium*: a waterborne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126: 37-56.
- FAYER R. 2007. General biology. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Second edition. CRC Press. FL. pp. 1-42.
- FAYER R. A., SANTÍN M. 2009. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 164: 192-200.
- FAYER R. TROUT J. M., XIAO L., MORGAN U. M., LAI A. A., DUBEY J. P. 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dog. *J. Parasitol.* 87: 1415-1422.
- FAYER R., LEEK R. G. 1984. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. *J. Protozool.* 31:567-569.
- 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., SANTÍN M., TROUT J. M., GREINER E. 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.* 135: 105-112.
- FAYER R., SANTÍN 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. 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R. (Ed.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC. Press. Boca. Raton. FL. pp. 2-33.

- FAYER R., TROUT J. M., GRACZYK T. K., LEWIS E. J. 2000. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in postweaned and adult cattle on 3 Maryland farms. *Vet. Parasitol.* 93: 103-112.
- FAYER R., TROUT J. M., JENKINS M. C. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 84: 1165-1169.
- FAYER R., TROUT J. M., XIAO L., MORGAN U. M., LAI A. A., DUBEY J. P. 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87: 1415-1422.
- FAYER R., UNGAR B. L. P. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50: 458-483.
- FENG Y. 2008. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp. Parasitol.* 124: 128-137.
- FENG Y., ALDERISIO K. A., YANG W., BLANCERO L. A., KUHNE W. G., NADARESKI C. A., REID M., XIAO L. 2007. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6475-6483.
- FENG Y., LAL A. A., LI N., XIAO L. 2010. Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.* 127: 238-242.
- FENG Y., YANG W., RYAN U., ZHANG L., KVÁČ M., KOUDELA B. 2011. Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J. Clin. Microbiol.* 49: 34-41.
- FORNEY J. R., YANG S., HEALEY M. C. 1996. Protease activity associated with excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Parasitol.* 82: 889-892.
- 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.
- GILES M., WEBSTER V. W., MARSHALL V. J. A., CATCHPOLE J., GODDARD T. M. 2001. Experimental infection of a lamb with *Cryptosporidium parvum* type 1. *Vet. Rec.* 149: 523-525.

- GOEBEL E., BRAENDLER U. 1982. Ultrastructure of microgametogenesis, microgametes and gametogamy of *Cryptosporidium* spp. in the small intestine of mice. *Protistology*. 18: 331-344.
- GOMEZ MORALES M. A, ATZORI C, LUDOVISI A, ROSSI P, SCAGLIA M, POZIO E. 1995. Opportunistic and non-opportunistic parasites in HIV positive and negative patients with diarrhoea in Tanzania. *Trop. Med. Parasitol.* 46: 109-114.
- GOODSTEIN R. F., COLOMBO C. S., ILLFELDER M. A., SKAGGS R. E. 1989. Bronchial and gastrointestinal cryptosporidiosis in AIDS. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 89: 195-197.
- GRACZYK T. K. 2008. Fish amphibians and reptiles. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Second edition. CRC Press. Boca Raton. pp. 389-394.
- GREEN S. L., BOULEY D. M., JOSLING C. A., FAYER R. 2003. Cryptosporidiosis associated with emaciation and proliferative gastritis in a laboratory-reared South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comp. Med.* 53: 81-84.
- GUSELLE N. J., APPELBEE A. J., OLSON M. E. 2003. Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet. Parasitol.* 113: 7-18.
- HIJAWI N. S., MELONI B. P., NG'ANZO M., RYAN U. M., OLSON M. E., COX P. T., MONIS P. T., THOMPSON R. C. A. 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int. J. Parasitol.* 34: 769-777.
- HIJAWI N. S., MELONI B. P., RYAN U. M., OLSON M. E., THOMPSON R. C. 2002. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* 32: 1719-1726.
- HIKOSAKA K., NAKAI Y. 2005. A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice *Apodemus speciosus*. *Parasitol. Res.* 97: 373-379.

- HINNANT K., SWARTZ A., ROTTERDAM H., RUDSK C. 1989. Cytomegaloviral and cryptosporidial cholecystitis in two patients with AIDS. *Am. J. Surg. Pathol.* 13: 57-60.
- HOLUBOVÁ N., SAK B., HORČIČKOVÁ M., HLÁSKOVÁ L., KVĚTOŇOVÁ D., MENCHACA S., MCEVOY J., KVÁČ M. 2016. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitol. Res.* e26905074. (v tisku).
- HOMMER V., EICHHOLZ J., PETRY F. 2003. Effect of antiretroviral protease inhibitor salone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 359-364.
- HOUPTÉ. R., BUSHEN O. Y., SAM N. E., KOHLI A., ASGHARPOUR A., NG C. T., CALFEE D. P. GUERRANT R. L., MARO V., OLE-NGUYAINE S., SHAO J. F. 2005. Short report: Asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73: 520-522.
- HOWERTH E. W. 1981. Bovine cryptosporidiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 52: 251-253.
- HUETINK R. E., VANDER GIESSEN J. W., NOORDHUIZEN J. P., PLOEGER H. W. 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on dairy farm. *Vet. Parasitol.* 102: 53-67.
- ISEKI M. 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn. J. Parasitol.* 28: 285-307.
- ISEKI M. 1986. Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Parasitol.* 35: 521-526.
- 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.
- JENÍKOVÁ M., NĚMEJC K., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., KVÁČ M. 2011. New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers

- for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. *Vet. Parasitol.* 176: 120-125.
- JENKINS M. B., EAGLESHAM B. S., ANTHONY L. C., KACHLANY S. C., BOWMAN D. D., GHIROSE W. C. 2010a. Significance of wall structure, macromolecular composition, and surface polymers to the survival and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 1926-1934.
- JENKINS M. B., LIOTTA J. L., LUCIO-FORSTER A., BOWMAN D. D. 2010b. Concentrations, viability and distribution of *Cryptosporidium* genotypes in lagoons of swine facilities in the Southern Piedmont and in coastal plain watersheds of Georgia. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 5757-5763.
- JENKINS M., TROUT J. M., HIGGINS J., DORSCH M., VEAL D., FAYER R. 2003. Comparison of testes for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Res. Parasitol.* 89: 1-5.
- JIRKŮ M., VALIGUROVÁ A., KOUDELA B., KRŘÍZEK J., MODRÝ D., ŠLAPETA J. 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Fol. Parasitol.* 55: 81-94.
- JURÁNEK D. D. 1995. Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention. *Clin. Infect. Dis.* 1: 57-61.
- KAHN D. G., GARFINKLE J. M., KIONOFF D. C., PEMBROOK L. J., MORROW D. J. 1987. Cryptosporidial and cytomegaloviral hepatitis and cholecystitis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 111: 879-881.
- KATO S., JENKINS M. B., GHIROSE W. C., BOWMAN D. D. 2001. Chemical and physical factors affecting the exystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Parasitol.* 87: 575-581.
- KATSUMATA T., HOSEA D., RANUH I. G., UGA S., YANAGI T., KOHNO S. 2000. Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Am. J. Med. Hyg.* 62: 70-72.
- KOUDELA B., MODRÝ D., VÍTOVEC J. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. *Vet. Parasitol.* 76: 181-188.

- KRUSE H., KIRKEMO A. M., HANDELAND K. 2004. Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 2067-2072.
- KUO C., WARES J. P., KISSINGER J. C. 2008. The Apicomplexan wholegenome phylogeny: An analysis of incongruence among gene trees. *Mol. Biol. Evol.* 25: 2689-2698.
- KVÁČ M., HAVRDOVÁ N., HLÁSKOVÁ L., DAŇKOVÁ T., KANDĚRA J., JEŽKOVÁ J., VÍTOVEC J., SAK B., ORTEGA Y., XIAO L., MODRÝ D. CHELLADURAI J. R., PRANTLOVÁ V., MCEVOY J. 2016. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *Plos. One.* 11: e0147090.
- KVÁČ M., HOFMANNOVÁ L., HLÁSKOVÁ L., KVĚTOŇOVÁ D., VÍTOVEC J., MCEVOY J., SAK B. 2014. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Vet. Parasitol.* 201: 9-17.
- KVÁČ M., KESTŘÁNOVÁ M., PINKOVÁ M., KVĚTOŇOVÁ D., KALINOVÁ J., WAGNEROVÁ P., KOTKOVÁ M., VÍTOVEC J., DITRICH O., MCEVOY J., STENGER B., SAK B. 2013a. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Suis scrofa*). *Vet. Parasitol.* 31: 218-227.
- KVÁČ M., KODÁDKOVÁ A., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., JALOVECKÁ M., ROST M., SALÁT J. 2011. Activated CD8⁺ T cells contribute to clearance of gastric *Cryptosporidium muris* infections. *Par. Immunol.* 33: 210-216.
- KVÁČ M., MCEVOY J., LOUDOVÁ M., STENGER B., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., DITRICH O., RAŠKOVÁ V., MORIARTY E., ROST M., MACHOLÁN M., PIÁLEK J. 2013c. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *Int. J. Parasitol.* 43: 805-817.
- KVÁČ M., ONDRÁČKOVÁ Z., KVĚTOŇOVÁ D., MCEVOY J., VÍTOVEC J., ROST M. 2013b. The Lesser Egyptian Gerbil (*Gerbillus gerbillus*) is a suitable host for the long-term propagation of *Cryptosporidium andersoni*. *Exp. Parasitol.* 134: 438-442.

- 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., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., DITRICH O., HOFMANNOVÁ L., MODRÝ D., VÍTOVEC J., XIAO L. 2008a. Infectivity pathogenicity and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Vet. Parasitol.* 153: 363-367.
- KVÁČ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., SECOR W. E. 2009. Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* spp. in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet. Parasitol.* 163: 33-38.
- KVÁČ M., SAK B., SALÁT J., KVĚTOŇOVÁ D. 2008b. The role CD8+ T-lymphocytes during gastric *Cryptosporidium muris* strain TS03 infection in mice. Abstract PO65. X International workshops on opportunistic protists (IWOP-10). Boston Massachusetts USA. pp. 90-91.
- KVÁČ M., VÍTOVEC J. 2003. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med. Biol.* 50: 451-457.
- LAATAMNA A. E., WAGNEROVÁ P., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., XIAO L., ROST M., ET A. L. 2015. *Microsporidia* and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Vet. Parasitol.* 208: 135-142.
- LANGKJAER R. B., VIGRE H., ENEMARK H. L., MADDOX-HYTTEL C. 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology.* 134: 339-350.
- LASSER K. H., LEWIN K. J., RYNING F. W. 1979. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Human Pathol.* 10: 234-240.
- LEVINE N. D. 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66: 830-834.

- LI N., XIAO L., ALDERISIO K., ELWIN K., CEBELINSKI E., CHALMERS R., SANTIN M., FAYER R., KVÁČ M., RYAN U., SAK B., STANKO M., GUO Y., WANG L., ZHANG L., CAI J., ROELLING D., FENG Y. 2014. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum* a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emer. Infect. Dis.* 20: 217-224.
- LI X., PEREIRA M. G. C., LARSEN R., XIAO C., PHILLIPS R., STRIBY K., MCCOWMAN B., ATWILL E. R. 2015. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple Spermophilus ground squirrel species. *Int J. Parasitol.* 24: 343-350.
- LINDSAY D. S., BLAGBURN B. L. 1990. Cryptosporidiosis in birds In: Dubey J. P., Speer C. A., Fayer R. (Eds.): *Cryptosporidiosis in man and animals*. CRC Press. Boca Raton. FL. pp. 133-148.
- LINDSAY D. S., UPTON S. J., OWENS D. S., MORGAN U. M., MEAD J. R., BLAGBURN B. L. 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle *Bos taurus*. *J. Eukar. Microbiol.* 47: 91-95.
- LÓPEZ-VÉLEZ R., TARAZONA R., GARCIA CAMACHO A., GOMEZ-MAMPASO E., GUERRERO A., MOREIRA V., VILLANUEVA R. 1995. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.* 14: 677-681.
- LUMADUE J. A., MANABE Y. C., MOORE R. D., BELITSOS P. C., CLARK D. P. 1998. A clinicopathologic analysis of AIDS-related cryptosporidiosis. *AIDS.* 12: 2459-2466.
- 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. Engl. J. Med.* 331: 161-167.
- MASON R. W., HARTLEY W. J., TILT L. 1981. Intestinal cryptosporidiosis in a kid goat. *Austr. Vet. J.* 57: 386-388.
- MASUNO K., YANAI T., HIRATA A., YONEMARU K., SAKAI H., SATOH M., MASEGI T., NAKAI Y. 2006. Morphological and immunohistochemical features of *Cryptosporidium andersoni* in cattle. *Vet. Pathol.* 43: 202-207.

- MCDONALD V., DEER R., UNI S., ISEKI M., BANCROFT G. J. 1992. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect. Immun.* 60: 3325-3331.
- MCGUIGAN C. 2005. *Cryptosporidium* outbreak after a visit to a wildlife centre in northeast Scotland: 62 confirmed cases. *Euro. Surveill.* 10: e050428.2.
- MEISEL J. L., PERERA D. R., MELIGRO C., RUBIN C. E. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterol.* 70: 1156-1160.
- MELE R., GÓEZ-MORALES M. A., TOSINI F., POZIO E. 2003. Indinavir reduces *Cryptosporidium parvum* infection in both *in vitro* models. *Int. J. Parasitol.* 33: 757-764.
- MELICHEROVÁ J., ILGOVÁ J., KVÁČ M., SAK B., KOUDELA B., VALIGUROVÁ A. 2014. Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitisation. *Parasitology.* 141: 287-303.
- MEUTIN D. J., VAN KRUININGEN H. J., KEIN D. H. 1974. Cryptosporidiosis in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165: 914-917.
- 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. *Fol. Parasitol.* 50.
- MIYAJI S., TANIKAWA T., SHIKATA J. 1989. Prevalence of *Cryptosporidium* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus* in Japan. *Jpn. J. Parasitol.* 38: 368-372.
- MODRÝ D., HOFMANNOVÁ L., ANTALOVÁ Z., SAK B., KVÁČ M. 2012. Variability in susceptibility of voles (Arvicolinae) to experimental infection with *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *Parasitol. Res.* 11: 471-473.
- MORGAN U. M., SARGENT K. D., DEPLAZES P., FORBES D. A., SPANO F., HERTZBERG H. 1998. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitol.* 117: 31-37.

- MORGAN U. M., XIAO L., MONIS P. T., SULAIMAN I., PAVLÁSEK I., BLAGBUM B., OLSON M., UPTON S. J., KRAMTSOV N. V., LAL A. A., ELLIOT A., THOMPSON R. C. A. 2000. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology*. 120: 457-464.
- MORGAN-RYAN U. M., FALL A., WARD L. A., HIJJAWI N., SULAIMAN I., FAYER R., THOMPSON R. C., OLSON M., LAL A., XIAO L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukar. Microbiol.* 49: 433-440.
- MTAMBO M. M. A., WRIGHT S. E., NASH A. S., BLEWETT D. A. 1996. Infectivity of a *Cryptosporidium species* isolated from a diarrhoeic cat. *Res. Vet. Sci.* 60: 61-63.
- NACIRI M., MANCASSOLA R., YVORÉ P., PEETERS J. E. 1993. The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves. *Vet. Parasitol.* 45: 199-207.
- NEUMAYEROVÁ H., KOUDELA B. 2008. Effects of low and high temperatures on infectivity of *Cryptosporidium muris* oocysts suspended in water. *Vet. Parasitol.* 153: 197-202.
- NIME F. A., BUREK J. D., PAGE D. L., HOLSCHER M. A., YARDLEY J. H. 1976. Acute enterokolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 70: 592-598.
- NYDAM D. V., WADE S. E., SCHAAF S. L., MOHAMMED H. O. 2001. Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp. cysts shed by dairy calves after natural infection. *J. Vet. Res.* 62: 1612-1615.
- O'DONOGHUE P. J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis on 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.
- PANCIERA R. J., THOMASSEN R. W., GARNER F. M. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 47-484.

- PARSONS M. B., TRAVIS D., LONSDORF E. V., LIPENDE I., ROELLIG D. M. A., KAMENYA S., ZHANG H., XIAO L., GILLESPIE T. R. 2015. Epidemiology and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in humans, wild primates and domesticated animals in the greater gombe ecosystem, Tanzania. PLoS Neg. Trop. Dis. 10: e0003529.
- PAVLÁSEK I. 1991. Use of glycerine in oocyst detection of *Cryptosporidium parvum* and *C. baileyi* in the feces of mammals and birds. Vet. Med. 36: 255-256.
- PAVLÁSEK I. 1999. Cryptosporidia, biology diagnosis host spectrum, specificity and the environment. Remed. Clin. Microbiol. 3: 290-302.
- PAVLÁSEK I. 2001. Findings of cryptosporidia in the stomach of hens and of exotic and wild birds. Veterinářství 51: 103-108.
- PAVLÁSEK I., RYAN U. 2008. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. Exp. Parasitol. 118: 434-437.
- PENG M. M., XIAO L., FREEMAN A. R., ARROWOOD M. J., ESCALANTE A. A., WELTMAN A. C., ONG C. S., MACKENZIE W. R. 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. Emerg. Infect. Dis. 3: 567-573.
- PEREIRA S. J., RAMIREZ N. E., XIAO L., WARD L. A. 2002. Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. J. Infect. Dis. 186: 715-718.
- PERZ J. F., LE BLANCQ S. M. 2001. *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1154-1162.
- PETTOELLO-MANTOVANI M., DI MARTINO L., DETTORI G., VAJRO P., SCOTTI S., DITULLIO M. T., GUANDALINI S. 1995. Asymptomatic carriage of intestinal *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunodeficient children: A prospective study. Pediatr. Infect. Dis. J. 14: 1042-1047.
- PLUTZER J., KARANIS P. 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. Vet. Parasitol. 165: 187-199
- POSPISCHIL A., STIGLMAIR-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.
- QUY R. J., COWAN D. P., HAYNES P. J., STURDEE A. P., CHALMERS R. M., BODLEY-TICKELL A. T., BULL S. A. 1999. The Norway rat as a reservoir host of *Cryptosporidium parvum*. *J. Wild. Dis.* 35: 660-670.
- RAŠKOVÁ V., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B., MCEVOY J., EDWINSON A., STENGER B., KVÁČ M. 2013. Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *J. Clin. Microbiol.* 51: 360-362.
- REESE N. C., CURRENT W. L., ERNST J. V., BAILEY W. S. 1982. Cryptosporidiosis of man and calf: A case report and results of experimental infections in mice and rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 226-229.
- REHG J. E. 1991a. Anti-cryptosporidial activity of macrolides in immunosuppressed rats. *J. Protozool.* 38: 228-230.
- REHG J. E. 1991b. Activity of azithromycin against cryptosporidia in immunosuppressed rats. *J. Infect. Dis.* 163: 1293-1296.
- REHG J. E. 1991c. Anticryptosporidial activity is associated with specific sulfonamides in immunosuppressed rats. *J. Parasitol.* 77: 238-240.
- REN X., ZHAO J., ZHANG L., NING C., JIAN F., WANG R., LV C., WANG Q., ARROWOOD M. J., XIAO L. 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.* 130: 274-281.
- RHEE J. K., YOON S. Y., PARK B. K. 1995. Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in mice. *Korean J. Parasitol.* 33: 377-382.
- ROBERTSON L. J., CAMPBELL A. T., SMITH H. V. 1993. In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology.* 106: 13-19.

- 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. *J. Parasitol.* 40: 1539-1548.
- ROSSIGNOL J. F, KABIL S. M, EL-GOHARY Y, YOUNIS A. M. 2006. Effect of Nitazoxanide in diarrhea and enteritis caused by *Cryptosporidium* sp. *Clin Gastroenterol. Hepatol.* 4: 320-324.
- ROSSIGNOL J. F., AYOUB A., AYERS M. S. 2001. Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. *J. Infect. Dis.* 184: 103-106.
- RYAN U. M., MONIS P., ENEMARK H. L., SULAIMAN L., 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., PAPANINI A., TONQ K., YANQ R., GIBSON-KUEH S., O'HARA A., LYMBERY A., XIAO L. 2015. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp. Parasitol.* 150: 31-35.
- RYAN U. M., POWER M., XIAO L. 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eucar. Microbiol.* 55: 22-26.
- RYAN U. M., XIAO L. 2008. Birds. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.): *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Second Edition. CRC. Press. Boca. Raton. pp. 395-418.
- RYAN U. M., XIAO L. 2014. Taxonomy and molecular taxonomy. In: Caccio S. M., Widmer G. (Eds.): *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer. New York. pp. 1-22.
- RYAN U. M., XIAO L., READ C., SULAIMAN I. M., MONIS P., LAL A. A., FAYER R., PAVLASEK I. 2003a. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J. Parasitol.* 89: 809-813.

- RYAN U. M., XIAO L., READ C., ZHOU L., LAL A. A., PAVLÁSEK I. 2003b. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 4302-4307.
- SAK B., PETRŽELKOVÁ K. J., KVĚTOŇOVÁ D., MYNAŘOVÁ A., SHUTT K. A., POMAJBÍKOVÁ K. 2013. Longterm monitoring of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at different stages of habituation in Dzanga Sangha Protected Areas Central African Republic. *PloS.* 8: e71840.
- SANTÍN M., TROUT J. M., XIAO L., ZHOU L., GREINER E., FAYER R. 2004. Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* spp. and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* 122: 103-117.
- SATOH M., HIKOSAKA K., SASAKI T., SUYAMA Y., YANAI T., OHTA M. 2003. Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 691-692.
- SEGURA R., PRIM N., MONTEMAYOR M., VALLS M. E., MUÑOZ C. 2015. Predominant virulent IbA10G2 subtype of *Cryptosporidium hominis* in human isolates in Barcelona: A Five-Year Study. *PLoS. One.* 10: e0121753.
- SHAHIDUZZAMAN M. D., DAUGSCHIES A. 2012. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Vet. Parasitol.* 188: 203-214.
- ŠLAPETA J. 2013. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* sp. in animals and humans: A thirty colour rainbow. *Int. J. Parasitol.* 43: 957-970.
- SLAVIN D. 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.) *J. Comp. Pathol.* 65: 2662-2270.
- SMITH H. V., NICHOLS R. A. B., GRIMASON A. M. 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trend. Parasitol.* 21: 133-142.
- STOCKDALE H. D., SPENCER J. A., BLAGBURN B. L. 2007. Prophylaxis and chemotherapy. In: FAYER R., XIAO L. (Eds.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Second edition. CRC. Press. Boca Raton. FL. pp. 255-288.

- STURDEE A. P., CHALMERS R. M., BULL S. A. 1999. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Vet. Parasitol.* 80: 273-280.
- SUNDBERG J. P., HILL D., RYAN M. J. 1982. Cryptosporidiosis in a gray squirrel. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 1420.
- TAPPEH K. H., GHARAVI M. J., MAKHDOUMI K., RAHBAR M., TAGHIZADEH A. 2006. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. infection in renal transplant and hemodialysis patients. *Iranian. J. Publ. Health.* 35: 54-57.
- TAYLOR M. A., MARSHALL R. N., GREEN J. A., CATDCHPOLE J. 1999. The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. *Vet. Parasitol.* 86: 41-48.
- THAMSBORG S. M., JÖRGENSEN R. J., HENRIKSEN S. A., 1990a. Cryptosporidiosis in kids of dairy goats. *Vet. Rec.* 127: 380-381.
- THAMSBORG S. M., JÖRGENSEN R. J., HENRIKSEN S. A., 1990b. Cryptosporidiosis in kids of dairy goats. *Vet. Rec.* 127: 627-628.
- TURKCPAR N., KUTLAY S., NERGIZOGLU G., ATLI T., DUMAN N. 2002. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. *Nephron* 90: 344-346.
- TYZZER E. E. 1907. Asporozoan found in the peptic flanda of the common mouse. *Proc. Doc. Exp. Biol. Med.* 5: 12-13.
- TYZZER E. E. 1910. An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Research.* 23: 394-414.
- TYZZER E. E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394-414.
- TZIPORI S. 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol. Rev.* 47: 84-96.
- TZIPORI S., ANGUS K. W., GRAY E. W., CAMPBELL I, ALLAN F. 1981. Diarrhea in lambs experimentally infected with *Cryptosporidium* isolated from calves. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1400-1404.
- TZIPORI S., WARD H. 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes. Infect.* 4: 1047-1058.

- UNI S., ISEKI M., MAEKAWA T., MORIYA K., TAKADA S. 1987. Ultrastructure of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) parasitizing the murine stomach. Parasitol. Res. 74: 123-132.
- UPTON S. J., CURRENT W. L. 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. J. Parasitol. 71: 625-629.
- VALIGUROVÁ A., HOFMANNOVÁ L., KOUDELA B., VÁVRA J. 2007. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. J. Eucar. 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., TAKEUCHI A., MADDEN P. A. 1971. Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. J. Protozool. 18: 248-60.
- VINAYAK S., PAWLOWIC M. C., SATERIALE A., BROOKS C. F., STUDSTILL C. J., BAR-PELED Y., CIPRIANO M. J., STRIEPEN B. 2015. Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. 523: 477-480. e4640681.
- VÍTOVEC J., HAMADEJOVÁ K., LANDOVÁ L., KVÁČ M., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B. 2006. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. J. Vet. Med. Biol. 53: 239-243.
- WAGNEROVÁ P., SAK B., MCEVOY J., ROST M., PEREC MATYSIAK A., JEŽKOVÁ J. 2015. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland. Parasitol. Res. 114: 1619-1624.
- WANG L., XUE X., LI J., ZHOU Q., YU Y., DU A. 2014. Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. Parasite 21: 36.
- WANG R., WANG J., SUN M., DANG H., FENG Y., NING C., JIAN F., ZHANG L., XIAO L. 2008. Molecular characterization of the *Cryptosporidium cervine* genotype from a sika deer (*Cervus nippon Temminck*) in Zhengzhou, China and literature review. Parasitol. Res. 103: 865-869.

- WEBSTER J. P., MACDONALD R. W. 1995. Parasites of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Parasitology*. 111: 247-255.
- WEISBURGER W. R., HUTCHEON D. F., YARDLEY J. H., ROCHE J. C., HILLIS W. D., CHARACHE P. 1979. Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. *J. Clin. Pathol.* 72: 473-478.
- 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.
- WIDMER G., 1998. Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* 40: 223-239.
- WIDMER G., AKIYOSHI D., BUCKHOLT M. A., FENG X., RICH S. M., DEARY K. M., BOWMAN C. A., XU P., WANG Y., WANG X., BUCK G. A., TZIPORI S. 2000. Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108: 187-197.
- WIDMER G., KLEIN P., BONILLA R. 2007. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitol.* 134: 1583-1588.
- WIDMER G., ORBACZ E. A., TZIPORI S. 1999. Beta-tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *App. Env. Microbiol.* 65: 1584-1588.
- WIDMER G., SULLIVAN S. 2012. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite. Immunol.* 34: 61-71.
- WOODMANSEE D. B. 1987. Studies of *in vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves. *J. Protozool.* 34: 398-402.
- WRIGHT M. K., WHITAKER B. R. 2001. Quarantine. In: Wright M. K., Whitaker B. R. (Eds.): *Amphibian Medicine and captive husbandry*. Krier Publishing Company. Malabar. pp. 303-307.
- XIAO L., ESCALANTE L., YANG C., SULAIMAN I., ESCALANTE A. A., MONTALI R. J., FAYER R., LAL A. A. 1999. Phylogenetic analysis of

- Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1578-1583.
- XIAO L., FAYER R., RYAN U., UPTON S. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev. 17: 72-97.
- XIAO L., SULAIMAN I. M., RYAN U. M., ZHOU L., ATWILL E. R., TISCHLER M. L., ZHANG X., FAYER R., LAL A. A. 2002. Host adaption and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. Vet. Parasitol. 147: 166-170.
- YAMURA H., SHIRASAKA R., ASAH I. H., KOYAMA T., MOTOKI M., ITO H. 1990. Prevalence of *Cryptosporidium* infection among house rats, *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, in Tokyo, Japan and experimental cryptosporidiosis in roof rats. Jpn. J. Parasitol. 39: 439-444.
- YANG S., HEALEY M. C., DU C. 1996. Infectivity of preserved *Cryptosporidium parvum* oocysts for immunosuppressed adult mice. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 13: 141-145.
- YOSHIKAWA H., ISEKI M. 1991. Freeze-fracture studies of *Cryptosporidium muris*. J. Protozool. 38: 171-172.
- ZAMBRISKI J. A., NYDAM D. V., WILCOX Z. J., BOWMAN D. D., MOHAMMED H. O., LIOTTA J. L. 2013. *Cryptosporidium parvum*: determination of ID₅₀ and the dose-response relationship in experimentally challenged dairy calves. Vet. Parasitol. 197: 104-112.
- ZHU G., MARCHEWKA M. J., KEITHLY J. S. 2000. *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. Mikrobiology 146: 315-321.
- ZIEGLER P. E., WADE S. E., SCHAF S. L., STERN D. A., NADARESCHI CH. A., MOHAMMED H. O. 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. Vet. Parasitol. 147: 176-184.