

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Katedra: Katedra zootechnických věd
Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Přítomnost specifické DNA a koproantigenu
kryptosporidií jako indikátor probíhající infekce

Autor diplomové práce: Bc. Vendula Tomanová

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

Konzultant diplomové práce: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

České Budějovice, 2017

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 15. dubna 2017

.....
Bc. Vendula Tomanová

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 medicínské protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za pomoc při práci v laboratoři, přátelské jednání a cenné rady.

Tato práce byla finančně podpořena z projektu GAČR 15-01090S a GAJU 002/2016/Z (řešitel doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

Abstrakt

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou celosvětově rozšíření jednobuněční epitelulární paraziti patřící do kmene Apicomplexa, způsobující vodnaté průjmy lidí a zvířat. Celý vývojový cyklus probíhá v jednom hostiteli, kde kryptosporidie napadají epiteliální buňky gastrointestinálního traktu, u ptáků mohou způsobit onemocnění i dýchacího nebo urogenitálního aparátu. Průběh onemocnění závisí na imunitním stavu hostitele a pro jedince s oslabenou imunitou jsou kryptosporidie velmi nebezpečné. Jedním z problémů, zejména v rozvojových zemích, je včasná a správná diagnostika, i s ohledem na fakt, že v současné době neexistuje žádná účinná léčba.

Cílem této práce bylo porovnat účinnost imunochromatografických testů u různě uchovaných vzorků trusu. Dále porovnat senzitivitu těchto testů s molekulárními a mikroskopickými metodami a určit jejich specifitu pro různé druhy a genotypy kryptosporidií. Dále se tato práce zabývá vhodností imunochromatografických testů pro rozpoznání aktivní infekce v průběhu prepatentní periody. Teoretická část zahrnuje obecné informace o kryptosporidiích jako je například taxonomie, vývojový cyklus nebo přenos a průběh onemocnění. Zabývá se také způsoby jejich detekce pomocí imunochromatografických testů.

V této práci nebyl zjištěn rozdíl v senzitivě použitých imunochromatografických testů a detekční limit pro většinu testů byl 200 oocyst ve vzorku. Přítomnost koproantigenů je vázána na přítomnost oocyst ve vzorku trusu/stolice. V této studii bylo zjištěno, že falešně negativní výsledky imunochromatografických testů jsou způsobeny i) nízkou koncentrací oocyst ve vzorku (senzitivita) nebo ii) protilátky použité v testu nereagují s antigenem příslušné kryptosporidie (specifita). Výsledky této práce ukazují, že imunochromatografické testy je vhodné kombinovat s dalšími metodami. V průběhu prepatentní periody nelze detekovat specifickou DNA, antigen nebo oocysty kryptosporidií. Použití imunochromatografických testů neodliší aktivní infekci od pasáže oocyst ani při použití v kombinaci s PCR.

Klíčová slova: *Cryptosporidium*; infekce; detekce DNA; pasáž oocyst; rychlý imunochromatografický test

Summary

Cryptosporidium is a genus of apicomplexan unicellular epicyclic parasite with worldwide distribution causing watery diarrhea in humans and animals. The life cycle is completed in one host, where *Cryptosporidium* parasitizing epithelial cells of gastrointestinal tract and in birds can cause disease of respiratory or urogenital tract. Course of disease depends on condition of immune system. For immunodeficient individuals could be life threatening. One of problems especially in developing countries is early and correct diagnostic, particularly no effective treatment currently exist.

The aim of this thesis was to compare efficiency of immunochromatographic tests in samples stored under different conditions. The comparison of sensitivity and specificity of these tests with molecular and microscopic techniques was also performed. Additionally, suitability of immunochromatographic tests for detection of active infection during prepatent period was evaluated. The theoretic part includes general information about *Cryptosporidium*. Its taxonomy, cycle of evolution or transmission and course of disease. Using of immunochromatographic test is also mentioned.

No differences in sensitivity of used immunochromatographic tests was observed in this thesis. The detection rate for most of tests was 200 oocyst per sample. The presence of coproantigen is depend upon presence of oocysts in a sample. False negative results of immunochromatographic tests was caused by i) low concentration of oocysts in a sample (sensitivity) or ii) antibodies in used test don't react with antigen of *Cryptosporidium* spp. (specificity). Results of this thesis show that combination of immunochromatographic tests and other techniques is convenient. During prepatent period is not possible to detect specific DNA, antigen or oocysts of *Cryptosporidium*. The active infection could not be distinguish from passage of oocysts using of immunochromatographic tests even if PCR is also used.

Key words: *Cryptosporidium*; infection; detection of DNA; passage of oocyst; a rapid immunochromatographic assay

Obsah

1	Cíle práce	8
2	Úvod.....	9
3	Literární přehled.....	10
3.1	Historie kryptosporidií.....	10
3.2	Taxonomie kryptosporidií.....	10
3.3	Hostitelská a věková specifita.....	11
3.4	Vývojový cyklus	13
3.5	Přenos a průběh infekce	14
3.6	Terapie a prevence	15
3.7	Způsoby detekce kryptosporidií.....	16
3.7.1	Imunochromatografické testy pro detekci antigenu rodu <i>Cryptosporidium</i>	17
4	Materiál a metodika.....	18
4.1	Materiál.....	18
4.1.1	Paraziti.....	18
4.1.2	Typy infekčních dávek	18
4.1.3	Laboratorní zvířata	19
4.1.4	Imunochromatografické testy.....	20
4.2	Metody.....	20
4.2.1	Barvení oocyst kryptosporidií anilin-karbol-methyl violetí (Miláček et Vítovec 1985).....	20
4.2.2	Hodnocení intenzity infekce.....	21
4.2.3	Purifikace oocyst	21
4.2.4	Zjištění koncentrace oocyst	22
4.2.5	Molekulární analýza	22
4.2.6	Design experimentů.....	26
5	Výsledky	30

5.1	Porovnání senzitivity imunochromatografických testů s molekulárními a mikroskopickými metodami.....	30
5.2	Porovnání senzitivity imunochromatografických testů na solubilní antigen kryptosporidií.....	30
5.3	Vliv způsobu skladování vzorků na senzitivitu imunochromatografických testů	31
5.4	Testování specifity imunochromatografických testů pro různé druhy a genotypy kryptosporidií	32
5.5	Detekce průchodu oocyst a antigenu <i>Cryptosporidium proliferans</i> , <i>C. parvum</i> a <i>C. baileyi</i> gastrointestinálním traktem zvířat v prvních 24 hodinách po inokulaci.....	33
5.6	Detekce antigenu kryptosporidií v trusu zvířat po přidání antigenu získaného z excystovaných oocyst do pitné vody.....	35
5.7	Detekce specifické DNA, oocyst a antigenu <i>Cryptosporidium proliferans</i> v průběhu prepatentní a patentní periody u BALB/c myši	35
5.8	Detekce <i>Cryptosporidium parvum</i> v průběhu prepatentní a patentní periody u BALB/c myši	36
6	Diskuse.....	38
7	Závěry	42
8	Citovaná literatura.....	43

1 Cíle práce

- Porovnat účinnost imunochromatografických testů u různě uchovávaných vzorků trusu.
- Porovnat senzitivitu imunochromatografických testů s molekulárními a mikroskopickými metodami.
- Popsat specifitu imunochromatografických testů pro různé druhy a genotypy kryptosporidií.
- Posoudit vhodnost imunochromatografických testů detekujících koproantigen kryptosporidií pro rozpoznání aktivní infekce v průběhu prepatentní periody.

2 Úvod

Kryptosporidie jsou jednobuněční obligátní epicelulární paraziti, kteří jsou častou příčinou průjmů u lidí a zvířat po celém světě. Kryptosporidie jsou jednohostitelské, tedy vývojový cyklus je uzavřen v jednom hostiteli (Deng et al. 2004). Zástupci rodu *Cryptosporidium* primárně infikují epitelální buňky gastrointestinálního traktu, což vede k akutnímu vodnatému průjmu. Některé druhy kryptosporidií mohou infikovat i dýchací nebo urogenitální cesty. Průběh onemocnění závisí zejména na imunitním stavu hostitele a v současné době neexistuje žádná účinná léčba (Elliott et al. 2001). Vyloučené oocysty jsou velmi odolné a ve vnějším prostředí přežívají dlouhou dobu při zachování plné infekčnosti (Fayer et al. 1998).

Jednotlivé druhy kryptosporidií se od sebe liší hostitelskou specifitou. Druhy jako *C. parvum* nebo *C. ubiquitum* mají širokou hostitelskou specifitu a jsou infekční pro většinu savců (předpokládá se, že pro všechny). Na druhou stranu jsou známy druhy, jako například *C. wrairi*, u kterého je znám pouze jeden hostitel (morče). Řada druhů a genotypů je infekční pro skupiny blízké příbuzných hostitelů. Například druh *C. andersoni* je infekční pro přežvýkavce nebo druh *C. muris* pro hlodavce (Current et al. 1986; Fayer et al. 2010; Lindsay et al. 2000; Tyzzer 1912; Tyzzer 1907; Vetterling et al. 1971).

Z hlediska molekulární epidemiologie představuje největší problém přítomnost specifické DNA hostitelsky nespécifických druhů a genotypů v trusu nebo stolici různých hostitelů včetně člověka. Vzhledem k citlivosti molekulárních metod a možnosti průchodu oocyst kryptosporidií zažívacím traktem hostitele nelze spolehlivě určit, zda se jedná o aktivní infekci nebo pouze o pasivní pasáž zažívacím traktem. V důsledku toho byla v minulosti u řady druhů a genotypů kryptosporidií mylně popsána hostitelská specifita (Grazcyk et al. 1996b).

Tato práce se snaží řadou experimentů objasnit, zda přítomnost specifické DNA v kombinaci s přítomností koproantigenu kryptosporidií v trusu může sloužit k odlišení probíhající infekce od pasáže oocyst trávicím traktem. Dále se tato práce zabývá porovnáním senzitivity a specifičnosti imunochromatografických testů s molekulárními metodami, zejména PCR a vlivem způsobu uchování vzorků trusu pro následné testování imunochromatografickými testy.

3 Literární přehled

3.1 Historie kryptosporidií

Kryptosporidie byly poprvé popsány Ernestem Edwardem Tyzzerem v roce 1907, kdy popsal prvoka parazitujícího v žaludečních žlázách laboratorních myší a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). O pár let později Tyzzer našel další druh kryptosporidie, tentokrát parazitujícího ve střevě myší a pojmenoval ho *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). Třetím popsaným druhem kryptosporidií bylo *Cryptosporidium meleagridis* nalezené u krůt v roce 1955 (Slavin 1955). Význam těchto parazitů však další léta nebyl nijak velký. Zvýšené pozornosti se kryptosporidiím dostalo v sedmdesátých letech 20. století, kdy byly dány do souvislosti kryptosporidiové infekce se závažnými průjmovými stavy telat (Tzipori et al. 2002) a s prvními klinickými onemocněními člověka (Nime et al. 1976). Do této doby byly kryptosporidie považovány za oportunní prvoky s nízkou nebo žádnou patogenitou (Tzipori et al. 2002). Velkého významu získaly kryptosporidie s nástupem pandemie HIV a zvýšeným množstvím úmrtí u AIDS pacientů. Počet studií zabývajících se kryptosporidiemi se v roce 1983 a 1984 výrazně zvýšil (Casemore et al. 1985). Do současné doby bylo publikováno téměř 9000 studií zaměřených na tyto parazity (zdroj: Web of Science). Přes veškerý vědecký pokrok existuje stále mnoho otázek, na které dosud neznáme odpovědi.

3.2 Taxonomie kryptosporidií

Kryptosporidie byly dlouhou dobu řazeny mezi kokcidie, ke kterým je přiřadil Tyzzer v roce 1910, přestože již v té době poznamenal, že se tyto parazity od kokcidií liší v řadě biologických vlastností (Fayer et al. 1997; Tyzzer 1910). Na konci 20. století byla molekulárními analýzami prokázána bližší příbuznost kryptosporidií s gregarinami než s kokcidiemi (Carreno et al. 1999). Podobnost s gregarinami lze pozorovat také ve stavbě organel sloužících k přichycení k hostitelské buňce (Valigurová et al. 2007). Kryptosporidie byly zařazeny na základě fylogenetické analýzy genu kódujícího RNA malé ribozomální podjednotky (SSU) do třídy Gregarinae (Carreno et al. 1999). V současné době jsou kryptosporidie taxonomicky řazeny do třídy Gregarinomorpha v rámci kmene Apicomplexa (Cavalier-Smith 2014). V současné době je uznáno celkem 36 druhů kryptosporidií vzájemně odlišených na základě morfologických rozdílů, hostitelské specifity, lokalizace

vývojového cyklu v organismu a molekulárních rozdílů. Dále je popsáno velké množství genotypů, u kterých lze předpokládat, že v budoucnu budou potvrzeny jako samostatné druhy (Kváč et al. 2014b). Aby mohly být takto taxonomicky zařazeny, musejí splňovat pravidla Mezinárodního kodexu pro zoologické názvosloví (International Commission on Zoological Nomenclature) (Fayer 2010).

3.3 Hostitelská a věková specifita

Kryptosporidie parazitují u všech tříd obratlovců včetně člověka. Jedním ze základních znaků jak od sebe odlišit jednotlivé druhy kryptosporidií je právě hostitelská specifita. Některé druhy mají úzkou hostitelskou specifitu, jiné naopak parazitují u širokého spektra hostitelů. Druh *C. parvum* je považován za nejméně hostitelsky specifickou kryptosporidii a je pravděpodobně infekční pro všechny savce. Typickým hostitelem jsou přežvýkavci, zejména telata. Tento druh je také infekční pro člověka (Fayer 2010). *Cryptosporidium baileyi* je druh s nejvyšší hostitelskou specifitou infikující ptáky (Current et al. 1986). Mezi kryptosporidie s vysokou hostitelskou specifitou patří například *C. andersoni*, který je typický pro skot a další polygastry (Peng et al. 2003) nebo *C. muris*, který je infekční pro hlodavce (Fayer et al. 1991). V současné době převládá názor, že většina druhů a genotypů kryptosporidií je úzce hostitelsky specifických (Kváč et al. 2014b).

Na základě věkové specifity rozlišujeme kryptosporidie do tří skupin. První skupinu tvoří většina druhů a genotypů kryptosporidií, které jsou infekční pro všechny věkové kategorie vnímavých hostitelů. Například druh *C. andersoni* je infekční jak pro telata, tak pro dospělý skot (Kváč et al. 2006; Santín et al. 2004). Do druhé skupiny jsou řazeny kryptosporidie, které jsou infekční pouze pro mladší věkové kategorie. Do této skupiny lze zařadit druh *C. parvum*, nicméně zařazení je vázáno na hostitele. *Cryptosporidium parvum* je infekční pouze pro mláďata laboratorních myší kmene BALB/c do věku 3 týdnů, zatímco dospělí jedinci nejsou k infekci vnímaví. Obdobně je tento druh infekční výhradně pro telata do věku 2–3 měsíců, zatímco u dospělého skotu se vyskytuje velmi sporadicky. Na druhou stranu je *C. parvum* plně infekční pro všechny věkové kategorie člověka nebo pískomilů (Kváč et al. 2009a; Nichols 2008). Do třetí skupiny byl dosud zařazen pouze jeden druh, *Cryptosporidium scrofarum*, který je infekční pouze pro prasata po odstavu ve věku 6 a více týdnů (Jeníková et al. 2011; Kváč et al. 2014c; Langkjær et al. 2007).

Tabulka 1. Seznam uznaných druhů rodu *Cryptosporidium*

Druh	Reference	Hostitel	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	bursa fabricii
<i>C. bovis</i>	Fayer et al. 2005	skot	tenké střevo
<i>C. canis</i>	Fayer et al. 2001	psi	tenké střevo
<i>C. cichlidis</i>	Paperna et Vilenkin 1996	ryby	střevo*
<i>C. cuniculus</i>	Robinson et al. 2010	králíci	tenké střevo
<i>C. ducismarci</i>	Traversa 2010	želvy	střevo*
<i>C. erinacei</i>	Kváč et al. 2014a	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	tenké střevo
<i>C. huwi</i>	Ryan et al. 2015	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. marcopodum</i>	Ryan et al. 2008	klokani	střevo*
<i>C. meleagridis</i>	Slavin 1955	ptáci	tenké střevo
<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero et al. 2002	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. muris</i>	Tyzzer 1907	hlodavci	žaludek
<i>C. natorum</i>	Hoover et al. 1981	ryby	střevo*
<i>C. parvum</i>	Tyzzer 1912	savci	tenké střevo
<i>C. proliferans</i>	Kváč et al. 2016	savci	žaludek
<i>C. reichenbacklinkei</i>	Paperna et Vilenkin 1996	čichavci	střevo*
<i>C. rubeyi</i>	Li et al. 2015	veverky	střevo
<i>C. ryanae</i>	Fayer et al. 2008	skot	střevo
<i>C. scophthalmi</i>	Alvarez-Pellitero et al. 2004	platýzi	střevo
<i>C. serpentis</i>	Levine et al. 1980	plazi	žaludek
<i>C. scrofarum</i>	Kváč et al. 2013	prasata	střevo
<i>C. suis</i>	Ryan et al. 2004	prasata	tlusté střevo
<i>C. testudinis</i>	Ježková et al. 2016	želvy	žaludek
<i>C. tyzzeri</i>	Ren et al. 2012	myši	tenké střevo
<i>C. ubiquitousum</i>	Fayer et al. 2010	skot	střevo
<i>C. varanii</i>	Pavlásek et al. 1995	plazi	žaludek, tenké 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

*lokalizace není experimentálně ověřena, určeno dle fylogenetické pozice

Tabulka 2. Druhy a genotypy zoonotických a lidských kryptosporidií (Ortega et Kváč 2013)

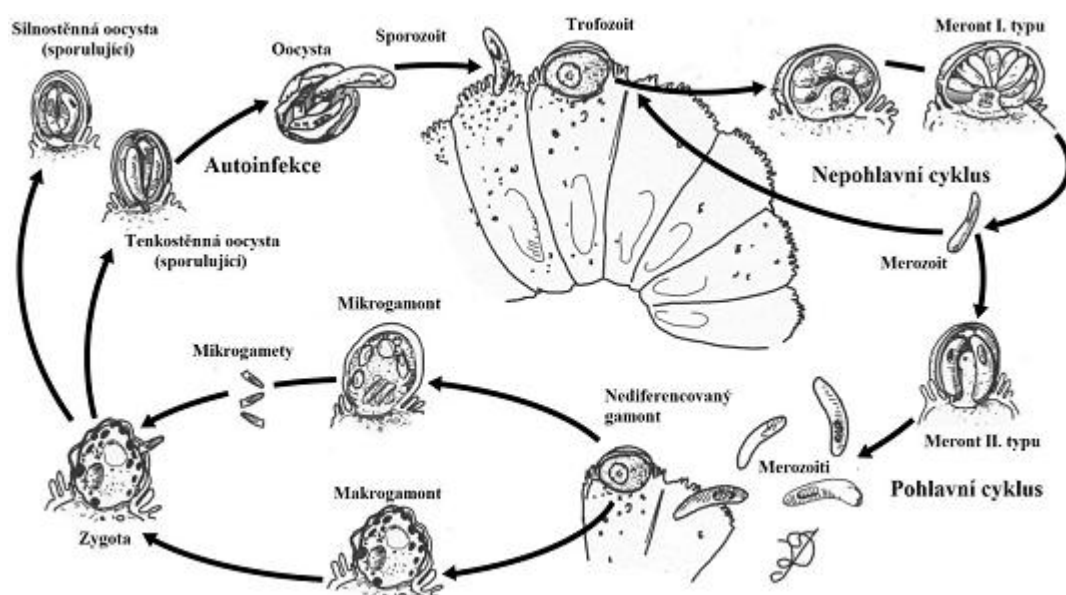
Druh / Genotyp	Riziko infekce pro člověka	Hlavní zdroj oocyst
<i>C. hominis</i>	vysoká	lidé
<i>C. parvum</i>	vysoká	lidé, skot
<i>C. canis</i>	střední/vysoká	psi
<i>C. felis</i>	střední/vysoká	kočky
<i>C. meleagridis</i>	střední/vysoká	krůty
<i>C. viatorum</i>	střední/vysoká	lidé
<i>C. andersoni</i>	nízká	skot
<i>C. erinacei</i>	nízká	ježci
<i>C. cuniculus</i>	nízká	lidé, králíci
<i>C. fayeri</i>	nízká	klokani
<i>C. muris</i>	nízká	hlodavci
<i>C. scrofarum</i>	nízká	prasata
<i>C. suis</i>	nízká	prasata
<i>C. tyzzeri</i>	nízká	hlodavci
<i>C. ubiquitum</i>	nízká	skot, ovce, kozy
<i>C. wrairi</i>	nízká	morčata, prasata
chipmunk genotype	nízká	veverky
horse genotype	nízká	koně
monkey genotype	nízká	opice
skunk genotype	nízká	skunci
<i>C. suis-like</i>	nízká	neznámo
apodemus genotype	nízká	myšice

3.4 Vývojový cyklus

Vývojový cyklus začíná po požití oocyst hostitelem. Obecně lze rozdělit jednotlivé druhy kryptosporidií dle lokalizace vývojového cyklu na dvě kategorie, a to druhy parazitující v žláznatém žaludku a druhy s vývojem v tenkém nebo tlustém střevě (Tzipori et al. 2002). Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní, to znamená, že probíhá v jednom hostiteli. Probíhá v epiteliálních buňkách gastrointestinálního, ojediněle dýchacího a urogenitálního traktu. Dělí se na čtyři hlavní fáze: excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie (Fayer et al. 1997). Při excystaci se ve střevech z každé oocysty uvolní čtyři infekční sporozoiti, kteří se přichytí k hostitelským buňkám a mění se na trofozoity uzavřené v parazitoformním vaku (Elliott et al. 2001). Dále probíhá nepohlavní dělení, tak zvaná merogonie, kdy se jádro trofozoita dělí a vznikají dva typy merontů. Meront I. typu má 6–8 jader, množí se nepohlavně a vytváří tedy 6–8 merozoitů. U meronta II. typu se tvoří pouze

4 merozoiti (Melicherová et al 2014). Tito merozoiti napadají další epiteliální buňky hostitele a vytváří dvě sexuální stádia, vícejaderné mikrogamonty a jednojaderné makrogamonty. Z mikrogamontů vznikají pohyblivé mikrogamety, které oplodňují makrogamety přeměněné z makrogamontů za vzniku zygoty. Zygota prochází sporogonií, kdy se mění na oocystu, ve které se tvoří čtyři sporozoiti. Takto vzniklé oocysty jsou dvojího typu: silnostěnné a tenkostěnné. Většina oocyst je silnostěnných a z hostitele jsou vyloučeny do vnějšího prostředí trusem; jsou velmi odolné a plně infekční pro další hostitele. V menším počtu se tvoří tenkostěnné oocysty, které slouží k autoinfekci. Tyto oocysty excystují v hostiteli a parazit je tedy schopen se dále udržet v těle (Bouzid et al. 2013).

Obrázek 1. Vývojový cyklus *Cryptosporidium* spp. (CDC, <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>, upraveno)



3.5 Přenos a průběh infekce

Přenos kryptosporidií je fekálně-orální cestou a to buď přímo kontaktem s infikovanými jedinci nebo nepřímo například kontaminovanou vodou či potravou. Jelikož kryptosporidie napadají celou řadu volně žijících zvířat, nejen savců ale také celou řadu vodních ptáků, existuje pravděpodobnost kontaminace životního prostředí, zejména povrchové vody. Potenciální nebezpečí nehrozí pouze od volně žijících zvířat, ale nesmíme zapomenout i na domestikované druhy, jako je například

skot, který je častým hostitelem *C. parvum*, které je infekční i pro lidskou populaci. Trus těchto zvířat se využívá jako hnojivo zemědělských půd, odkud se životaschopné oocysty mohou jednoduše dostat do povrchových vod (Graczyk 1996). Kontaminovaná voda představuje častý zdroj infekce u lidí, důkazem je masivní infekce v Milwaukee v roce 1993, kdy bylo kryptosporidiózou postiženo více než 400 000 lidí (Mac Kenzie et al. 1994). Hlavním příznakem je rozsáhlý vodnatý průjem, který způsobuje vážnou dehydrataci a úbytek tělesné hmotnosti. Výjimečně může obsahovat hlen, leukocyty nebo krev. Průjem trvá přibližně 7–10 dní dle stavu hostitele, může však přejít i do chronické formy, a to především u imunokompromitovaných jedinců, kdy může trvat i několik měsíců až let (Tzipori et al. 2002). Dále je toto onemocnění spojeno také s bolestmi břicha, horečkou, nechutenstvím a malátností. U jedinců s oslabenou imunitou se mohou také objevit atypické projevy: gastrointestinální onemocnění, onemocnění žlučových cest, onemocnění dýchacích cest nebo pankreatitida (Bouzid et al. 2013). Klinické příznaky kryptosporidiózy závisí na dvou faktorech: na hostiteli (věk, imunitní stav, kondice) a druhu/genotypu parazita (Kváč et al. 2006). Závažnost kryptosporidiózy může být tedy různá, od lehkého průběhu až po život ohrožující onemocnění. Zejména pro imunokompromitované jedince je toto onemocnění velmi nebezpečné. Mohou to být lidé s AIDS, lidé po transplantaci orgánů či kostní dřeně a podobně. Kryptosporidióza je také často spojována s podvýživou dětí v rozvojových zemích (Bouzid et al. 2013). Tento parazit může způsobit značné ekonomické ztráty pro chovatele hospodářských zvířat, ať už je to zpomalení růstu nebo v horším případě smrt jedince. Pouze jediná oocysta stačí k propuknutí infekce (Ghazy et al. 2016). Oocysty jsou velmi odolné v životním prostředí, odolávají desinfekčním prostředkům a zůstávají dlouhou dobu životaschopné a plně infekční (Kváč et al. 2006).

3.6 Terapie a prevence

I přes mnoho studií stále neexistuje žádná specifická účinná metoda na léčbu kryptosporidiózy (Striepen 2013; Tzipori et al. 2002). Dle studie Smitha et al., která se zabývala léčbou kryptosporidiózy lékem nitazoxanid, bylo prokázáno, že lze projevy zmírnit nebo zkrátit dobu trvání, ale nelze kryptosporidiózu zcela vyléčit (Smith et al. 2004). Byly zkoušeny i další různé chemické preparáty, u nichž se očekávalo, že budou účinné, avšak vzhledem k jejich vysoké toxicitě pro

organismus a přetrvání jejich reziduí v živočišných produktech bohužel neuspěly. Terapie je zaměřena především na rehydrataci a iontovou rovnováhu organismu, u imunokompetentních jedinců dochází většinou k samovyléčení (Striepen 2013). Jedinou ochranou před tímto parazitem zůstávají pouze preventivní opatření, mezi která patří dodržování hygienických návyků, mytí ovoce a zeleniny před konzumací, apod. (Feng 2008). U zvířat jsou důležitá pravidelná parazitologická vyšetření, zamezení kontaminace krmiv a steliv a především dobrá zoohygiena chovu. Neméně důležitým preventivním opatřením je dezinfekce veškerých pracovních pomůcek a ploch (Kváč et al. 2005).

3.7 Způsoby detekce kryptosporidií

Jednou z nejčastěji používaných diagnostických metod jsou mikroskopické metody, které jsou levné a snadno využívané, mají však nízkou citlivost a specifitu (Jex et al. 2008; Kváč et al. 2013). Vzhledem k tomu, že jednotlivé druhy a genotypy kryptosporidií nelze od sebe odlišit na základě velikosti oocyst, ztrácejí tyto metody význam z hlediska taxonomického zařazení parazita (Ryan et Xiao 2014). Dalšími používanými metodami je identifikace kryptosporidií pomocí povrchových antigenů a izoenzymatických analýz (McLauchlin et al. 1998; Nichols et al. 1991, Nina et al. 1992; Ogunkolade et al. 1993). Nicméně i tyto metody postrádají patřičnou rozlišovací schopnost. S rozvojem a snadnou dostupností molekulárních metod došlo k rychlému pokroku v diagnostice kryptosporidií a popisu velkého množství nových genotypů (Ryan et Xiao 2014; Xiao 2010). Molekulární metody svou citlivostí předčí všechny dosud používané metody. Paradoxně však rozšířené používání molekulárních metod částečně přispělo k chybným popisům. Jedním z důvodů je, že přítomnost specifické DNA kryptosporidií v testovaném vzorku nemusí znamenat probíhající infekci. Experimentálně bylo prokázáno, že hostitelsky nespecifické a tedy pro daného hostitele neinfekční oocysty kryptosporidií mohou projít bez porušení zažívacím traktem hostitele a být tak detekovány pomocí různých diagnostických postupů (Graczyk et al. 1996a). Navíc si oocysty i po průchodu zažívacím traktem nevnímavého hostitele zachovávají svou infektivitu (Graczyk et al. 1996b). V posledních letech jsou k detekci kryptosporidií, zejména ve stolici lidí, používány imunochromatografické testy založené na detekci koproantigenů (Helmy et al. 2013).

3.7.1 Imunochromatografické testy pro detekci antigenu rodu *Cryptosporidium*

Jak už bylo popsáno výše, kryptosporidie lze diagnostikovat buď pomocí mikroskopického vyšetření, nebo různých molekulárních metod. Tyto metody jsou však ve většině případů časově i laboratorně náročné a je k nim zapotřebí nákladné vybavení laboratoře a specializovaný personál. Imunochromatografické testy založené na detekci antigenu kryptosporidií jsou vhodným doplněním těchto metod. Slouží k rychlé a nenáročné diagnostice kryptosporidií použitelné i v terénu (Bouyou-Akotet et al. 2016). Tyto testy jsou připraveny k okamžitému použití, z nekonzentrovaných vzorků trusu/stolice je během pár minut znám výsledek. Podstatou těchto testů je, že na membráně jsou navázány protilátky proti antigenu kryptosporidií (El-Moamly et al. 2011). Po ponoření stripu do vzorku naředěného pufrovým roztokem migruje suspenze kapilárním vztlínáním vzhůru po membráně. Jsou-li ve vyšetřovaném materiálu přítomny příslušné antigeny, dochází při kontaktu s protilátkami pro kryptosporidie adsorbovaných na stripu ve výsledkové zóně k vytvoření linky. Suspenze pokračuje v migraci po membráně k imobilizovaným protilátkám v kontrolní zóně. V případě že chromatografická reakce proběhla správně, objeví se kontrolní linka. U negativních vzorků tato linka potvrzuje validitu testu. Strip, na kterém se vytvoří obě linky je hodnocen jako pozitivní (Fleece et al. 2016). Jedním z omezení je, že jsou tyto testy vyvíjeny primárně pro detekci *C. parvum*, případně *C. hominis*, tedy druhů, které jsou zodpovědné za 95 % lidských infekcí a není známa jejich senzitivita pro další druhy a genotypy kryptosporidií. Z dosud více než 30 publikovaných prací byly téměř všechny provedeny na těchto dvou druzích kryptosporidií (Bouyou-Akotet et al. 2016; Chartier et al. 2013; Díaz-Garcia et al. 2000; Johnston et al. 2003; Klein et al. 2009; Lee et al. 2011; Shimelis et al. 2014; Trotz-Williams et al. 2005). Jejich citlivost a specifčnost většinou není stoprocentní (Agnam et al. 2011).

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Paraziti

Pro účely této práce byly použity oocysty druhu *Cryptosporidium proliferans* udržované v laboratorních podmínkách ve SCID (Severe Combined Immunodeficiency) myších a krysách malých (*Mastomys coucha*) na Parazitologickém ústavu Biologického centra AVČR v.v.i. v Českých Budějovicích, *Cryptosporidium parvum* získané z přirozeně infikovaného 18-ti denního telete Holštýnského skotu (*Bos taurus*) a *Cryptosporidium baileyi* získané z přirozeně infikované kachny divoké (*Anas platyrhynchos*). Pro testování specifity rychlých imunochromatografických testů (4.1.4) byly použity vzorky trusu obsahující oocysty různých druhů a genotypů kryptosporidií (Tabulka 3). Přítomnost a genotypizace oocyst v jednotlivých vzorcích byla potvrzena na základě amplifikace části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (4.2.5).

4.1.2 Typy infekčních dávek

Živé oocysty - čisté oocysty získané po cesium chloridovém gradientu (4.2.3) o maximálním stáří 1 týden.

Devitalizované oocysty - čisté oocysty získané po cesium chloridovém gradientu (4.2.3) o maximálním stáří 1 týden vystavené účinku 90 °C po dobu 10 minut v suchém termobloku.

Solubilní kryptosporidiový antigen - čisté oocysty získané po cesium chloridovém gradientu (4.2.3) o maximálním stáří 1 týden byly excystovány při 38 °C po dobu 30 minut ve vodní lázni. Úspěšnost excystace byla kontrolována mikroskopicky. Získaná suspenze byla zfiltrována přes hepafiltr s velikostí pórů 0,20 µm (CHROMAFIL® CA-20/25, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG). Množství získaného solubilního antigenu bylo spektrofotometricky změřeno přístrojem Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) za použití softwaru NanoDrop 1000 v. 3.8.1.

Tabulka 3. Seznam druhů a genotypů kryptosporidií použitých pro testování specifity rychlých imunochromatografických testů

Druh / genotyp	Hostitel
<i>C. andersoni</i>	<i>Bos taurus</i>
<i>C. avium</i>	<i>Gallus gallus</i>
<i>C. baileyi</i>	<i>Gallus gallus</i>
<i>C. ducismarci</i>	<i>Testudo horsfieldii</i>
<i>C. hominis</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>C. muris</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>C. parvum</i>	<i>Bos taurus</i>
<i>C. parvum</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>C. parvum</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>C. proliferans</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>C. scrofarum</i>	<i>Sus scrofa</i>
<i>C. testudinis</i>	<i>Testudo horsfieldii</i>
<i>C. tyzzeri</i>	<i>Mus musculus</i>
apodemus genotype I	<i>Apodemus flavicollis</i>
apodemus genotype II	<i>Apodemus flavicollis</i>
duck genotype	<i>Anas platyrhynchos</i>
rat genotype I	<i>Rattus norvegicus</i>
rat genotype IV	<i>Rattus norvegicus</i>
vole genotype II	<i>Microtus arvalis</i>
vole genotype IV	<i>Microtus arvalis</i>

4.1.3 Laboratorní zvířata

BALB/c myši byly získány z chovu Parazitologického ústavu, Biologického centra AVČR, v.v.i. v Českých Budějovicích. Veškeré experimentální infekce byly provedeny v akreditovaném zvěřinci Biologického centra, v.v.i. Akademie věd České republiky. Při provádění experimentů byly nošeny jednorázové kombinézy, návleky na obuv a rukavice. Všechny odpadní materiály (např. podestýlka a ochranné oděvy) byly uzavřeny v igelitových pytlích a sterilizovány. Veškeré postupy včetně krmení, čištění boxů pro zvířata, infekce zvířat a odběr biologických vzorků byly provedeny na základě projektu pokusů schváleném Rezortní odbornou komisí Akademie věd České republiky pro schvalování projektů pokusů na zvířatech (Protokol č. 52/2014).

4.1.4 Imunochromatografické testy

Za účelem testování přítomnosti koproantigenů kryptosporidií v trusu přirozeně a experimentálně infikovaných hostitelů byly použity následující komerčně dodávané imunochromatografické testy (Tabulka 4).

Tabulka 4. Seznam imunochromatografických testů a jejich ceny použitých v této práci

Název testu	Výrobce	Cena (Kč/strip)
RIDA QUICK <i>Cryptosporidium</i>	R-Biopharm AG	117
Crypto-Strip C-1005	Coris BioConcept	112
CoproStripTM <i>Cryptosporidium</i>	Savyon Diagnostics	254
<i>Cryptosporidium parvum</i> BioK 15	Bio-X Diagnostic	183
OD-278 CryptoCard	VIDIA	76

4.2 Metody

4.2.1 Barvení oocyst kryptosporidií anilin-karbol-methyl violetí (Miláček et Vítovec 1985)

Chemikálie:

- Roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti; 1 ml anilinu; 1 g fenolu; 30 ml 96% alkoholu, 70 ml dH₂O)
- Roztok tartrazinu (1% tartrazin v 1% kyselině octové)
- 2% H₂SO₄

Pracovní postup:

1. Testovaný vzorek trusu nebo obsahu žaludku či střeva natřít pomocí dřevěné špejle na podložní sklíčko v tenké vrstvě.
2. Po zaschnutí vzorek fixovat metanolem v plameni.
3. Po vychladnutí vzorek barvit roztokem methylvioleti po dobu 30 minut.
4. Podložní sklíčko důkladně opláchnout vodou a dále odbarvit po dobu 2–3 minut ve 2% H₂SO₄.
5. Znovu sklíčko opláchnout vodou a barvit roztokem tartrazinu po dobu 5 minut.
6. Naposledy sklíčko opláchnout, usušit a mikroskopicky vyhodnotit.

4.2.2 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 (Kváč et al. 2007).

4.2.3 Purifikace oocyst

4.2.3.1 Sacharózový gradient (Arrowood et Sterling 1987)

Chemikálie:

- Sheaterův cukerný roztok (259 ml deionizované vody (dH₂O); 405 g cukru).
- 1% PBS Tween (1% Tween 20 v PBS (phosphate buffered saline, 1 l dH₂O; 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄ × 12 dH₂O; 2,4 g KH₂PO₄).
- 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)

Pracovní postup:

1. Trus zhomogenizovat ve třecí misce a vzniklou suspenzi přecedit přes jemné (čajové) sítko.
2. Do 100 ml silnostěnných skleněných centrifugačních zkumavek navrstvit gradient v následujícím pořadí: 1. vrstva 30 ml Sheaterův roztok 1, 2. vrstva 30 ml Sheaterův roztok 2.
3. Na vrstvu Sheaterova roztoku 2 navrstvit 15 ml suspense oocyst v dH₂O.
4. Vyvážit zkumavky a centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C.
5. Oocysty kryptosporidií se nacházejí na rozhraní Sheaterova roztoku 1 a 2.
6. Odstranit supernatant nad prstencem Sheaterova roztoku 1 a 2, zbylý supernatant přenést do nové čisté zkumavky a doplnit dH₂O.
7. Opětovně centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C.
8. Odstranit ½ supernatantu a doplnit dH₂O. Oocysty se nachází v sedimentu.
9. Dvakrát zopakovat krok 7 a 8.
10. Odsát supernatant.
11. Pelet s oocystami uchovávat při 4 °C v dH₂O.

4.2.3.2 Cesium chloridový gradient

Chemikálie:

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

Pracovní postup:

1. Oocysty po přečištění na sacharózovém gradientu (4.2.3.1) centrifugovat 10 minut při 1450 g a 4 °C.
2. Odebrat supernatant a sediment obsahující oocysty resuspendovat v PBS.
3. Do čisté mikrozkušavky napipetovat 1 ml CsCl a navrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
4. Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C.
5. Oocysty kryptosporidií se nacházejí na rozhraní CsCl a PBS.
6. Odebrat prstenec s oocystami a naředit v nadbytku PBS.
7. Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C.
8. Bod 7 dvakrát opakovat.
9. Odsát supernatant.
10. Pelet s oocystami uchovávat při 4 °C v dH₂O.

4.2.4 Zjištění koncentrace oocyst

Koncentrace oocyst byla zjištěna pomocí Bürkerovy komůrky. Čistá suspence oocyst byla napipetována do Bürkerovy komůrky. Pomocí mikroskopu bylo při zvětšení 400× spočítáno celkové množství oocyst ve 25 středních čtvercích dle návodu přiloženému k Bürkerově komůrce. Zjištěný počet oocyst byl vynásoben 10⁴ a tím byla vypočtena koncentrace oocyst v 1 ml roztoku.

4.2.5 Molekulární analýza

4.2.5.1 Izolace DNA z trusu

K izolaci DNA z trusu byl použit komerční kit ExgeneTM Stool DNA mini (GeneAll[®]).

Pracovní postup:

1. Přibližně 200 mg trusu vložit do mikrozkušavky (Safe-Lock Tube), přidat skleněné a zirkonové kuličky. Do mikrozkušavky připipetovat 1 ml FL pufry.

2. Obsah zkumavky zhomogenizovat pomocí vortexu a rozbít oocysty pomocí homogenizátoru (Fast Prep 24 Instrument, MP Bio) 1 minutu při rychlosti $5,5 \text{ m.s}^{-1}$.
3. Inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě a centrifugovat 5 minut při 14 000 g.
4. Veškerý supernatant přepipetovat na EzPass kolonku.
5. Centrifugovat 1 minutu při 14 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
6. Na kolonku napipetovat 100 μl EB pufru. Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a znovu centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
7. Po centrifugaci kolonku vyhodit a do sběrné zkumavky připipetovat 500 μl PB pufru, pipetováním promíchat a přenést na mini spin column.
8. Centrifugovat a vzniklý odpad vylít.
9. Na střed kolonky napipetovat 500 μl NW pufru a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
10. Odpad ze sběrné zkumavky vylít a kolonku přenést na čistou mikrozukmavku.
11. Na kolonku napipetovat 200 μl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a naposledy centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
12. Vyizolovanou DNA skladovat při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.5.2 Izolace DNA z tkáně

Izolace DNA z tkání byla prováděna pomocí komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).

Pracovní postup:

1. Do připravené mikrozukmavky, dát skleněné a zirkonové kuličky, a přidat 10 mg tkáně.
2. Do mikrozukmavky přidat 180 μl ATL Buffer a zvortexovat.
3. Rozbít buňky pomocí homogenizátoru (Fast Prep 24 Instrument, MP Bio) po dobu 1 minuty při rychlosti $5,5 \text{ m.s}^{-1}$.
4. Centrifugovat 10 sekund při 6 000 g.
5. Přidat 20 μl proteinase K a vše inkubovat 1 hodinu při $56 \text{ }^\circ\text{C}$, během celé inkubace pravidelně protřepávat.
6. Obsah znovu centrifugovat 10 sekund při 6 000 g a přidat 200 μl AL Buffer, zvortexovat.
7. Dále přidat 200 μl 96% EtOH, zvortexovat a centrifugovat 10 sekund při 6 000 g.

8. Supernatant přenést na kolonku se sběrnou zkumavkou a centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.
9. Vzniklý odpad ve sběrné zkumavce vylít a dále na kolonku napipetovat 500 µl AW I Buffer a centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.
10. Vylít odpad ze sběrných zkumavek, na kolonku připipetovat 500 µl AW II Buffer a centrifugovat 1 minutu při 13 400 g.
11. Po centrifugaci vyměnit sběrné zkumavky za nové mikrozukumavky a přímo na kolonku nanést 200 µl AE Buffer. Vše inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a naposledy centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.
12. Vyizolovanou DNA skladovat při -20 °C.

4.2.5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

K detekci specifické DNA kryptosporidií byla použita metoda nested PCR amplifikující variabilní část genu kódující malou ribozomální podjednotku rRNA (Jiang et al. 2005). Ke každé sadě testovaných vzorků byla zařazena pozitivní i negativní kontrola. Byly genotypovány infekční dávky, oocysty získané po infekci a druhy a genotypy kryptosporidií použité pro test senzitivity.

Chemikálie:

- PCR H₂O (Top-Bio, ČR)
- Primery (10 µM, Generi Biotech, ČR)
- PCR mastermix – HS-Taq premix AmpONE (GeneAll, Korea)

Sekvence použitých primerů:

Primární PCR (55 °C)

- SSU F1: TTCTAGAGCTAATACATGCG
- SSU R1: CCCATTCCTTCGAAACAGCA

Sekundární PCR (55 °C)

- SSU F2: GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG
- SSU R2: CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA

DNA byla amplifikována v termocykleru (Bioer, Krd). Počáteční denaturace trvala 3 minuty při teplotě 95 °C. Následovalo 35 cyklů, opakující tři kroky:

1. Denaturace při 95 °C, 45 sekund.
2. Nasedání primerů při 55 °C, 45 sekund.

3. Syntéza nového řetězce při 72 °C, 60 sekund.

Finální extenze trvala 7 minut při 72 °C. Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 2 µl primárního PCR produktu. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *C. tyzzeri*. Složení reakčních směsí pro PCR je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5. Složení reakční směsi pro PCR pro amplifikaci části genu kódující malou ribozomální podjednotku rRNA

Primární reakce			Sekundární reakce		
Reagencie	Koncentrace	Objem (µl)	Reagencie	Koncentrace	Objem (µl)
H ₂ O	-----	7	H ₂ O	-----	7
Forward	200 mM	0,5	Forward	200 mM	0,5
Reverse	200 mM	0,5	Reverse	200 mM	0,5
PCR mastermix		10	PCR mastermix		10
DNA	-----	2	Primární reakce	-----	2
CELKEM	-----	20	CELKEM	-----	20

4.2.5.4 Gelová elektroforéza

Pro detekci finálního PCR produktu byl použit 1% agarózový gel s přidaným ethidium-bromidem. Vizualizace byla provedena pomocí UV záření (vlnová délka 302 nm) transiluminátorem (Ultra-Lum Inc, USA) a výsledek byl zdokumentován (High Performance UV Transilluminator, Biotech, ČR).

Chemikálie:

- 50× TAE pufr (242 g tris báze; 57,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,00)
- Agaróza (Serva Electrophoresis, Germany)
- 100 bp DNA Ladder (10 mg.ml⁻¹; Sigma Aldrich, USA)
- Ethidium-bromid (10 mg.ml⁻¹; Sigma-Aldrich, ČR)

Pracovní postup:

1. Ve skleněné baňce smíchat agarózu s 1× TAE pufrem (80 ml TAE pufru + 0,8 g agarózy).
2. Agarózu rozpustit v mikrovlnné troubě a následně za mírného míchání zchladit pod tekoucí vodou přibližně na teplotu 50 °C.
3. Přidat 2 µl ethidium-bromidu a jemně promíchat.
4. Nalít směs do připravené formy, přidat hřebeny a gel nechat ztuhnout.

5. Po úplném zatuhnutí hřebeny vyndat a gel vložit do elektroforetické vany naplněné TAE pufrem.
6. Do první jamky napipetovat 10 µl 100 bp Ladder.
7. Do ostatních jamek napipetovat 20 µl sekundárních PCR produktů včetně pozitivních i negativních kontrol.
8. Spustit elektroforézu (napětí nastavit na 90 V po dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA).
9. Pro vizualizaci DNA fragmentů použít UV transiluminátor.

4.2.5.5 Sekvenování a genotypizace

Nukleotidové sekvence získané v této práci byly zpracovány pomocí ChromasPro 1.7.5. softwaru (Technelysium, Pty, Ltd.) a uspořádány mezi sebou a s referenčními sekvencemi získanými z GenBank pomocí online programu MAFFT verze 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Výsledné alignmenty byly ručně editovány v programu BioEdit.

4.2.6 Design experimentů

Zvířata použita pro všechny experimenty byla infikována perorálně jícní sondou vyjma experimentu, kdy byly oocysty přidávány do vody určené k napájení.

4.2.6.1 Porovnání senzitivity imunochromatografických testů s molekulárními a mikroskopickými metodami

Pro účely tohoto experimentu byly použity vzorky trusu získané z přirozeně infikovaného telete a experimentálně infikované krysy malé obsahující oocysty *C. parvum*, respektive *C. proliferans*. Byly připraveny vzorky o koncentraci 5×10^4 oocyst ve 100 mg trusu. Trus byl následně ředěn dvojkovým ředěním až do koncentrace 12×10^1 oocyst ve 100 mg trusu. Vzorky byly testovány imunochromatografickými testy na přítomnost antigenu, PCR na přítomnost specifické DNA a mikroskopicky na přítomnost oocyst.

4.2.6.2 Porovnání senzitivity imunochromatografických testů pro detekci solubilního antigenu kryptosporidií

Pro účely tohoto experimentu byl získán solubilní antigen z excystovaných oocyst *C. parvum* a *C. proliferans*. Byly připraveny vzorky odpovídající koncentraci 5×10^4 oocyst ve 100 µl roztoku. Vzorky byly následně ředěny dvojkovým ředěním, až do

koncentrace antigenu odpovídají 12×10^1 oocyst ve 100 μ l roztoku. Vzorky byly testovány imunochromatografickými testy na přítomnost antigenu.

4.2.6.3 Vliv způsobu skladování vzorků na senzitivitu imunochromatografických testů

Pro tento experiment byl použit vzorek trusu z přirozeně infikovaného telete obsahující oocysty *C. parvum* o koncentraci 1×10^6 oocyst na 1 g. Vzorky byly uchovávány při: **i)** 4–6 °C, **ii)** -18 °C, **iii)** laboratorní teplotě, **iv)** v roztoku RNAlateru při 4–6 °C, **v)** v roztoku 5% dichromanu draselného při 4–6 °C a **vi)** v 70% etanolu při laboratorní teplotě po dobu 1 roku. Každý měsíc byly 3 vzorky testovány na přítomnost antigenu pomocí imunochromatografických testů. Trus fixovaný etanolem byl vždy den před vyšetřením centrifugován 3 minuty při 13 000 g, následně byl supernatant odsán a obsah v mikrozkuhavce byl vysušen při 65 °C přes noc. Trus fixovaný RNAlaterem nebo dichromanem draselným, byl těsně před vyšetřením centrifugován 3 minuty při 13 000 g a supernatant byl odsán. Každý test byl proveden přesně dle pokynů výrobce.

4.2.6.4 Testování specifity imunochromatografických testů pro různé druhy a genotypy kryptosporidií

Specifita imunochromatografických testů (Tabulka 4) byla testována na vzorcích trusu přirozeně a experimentálně infikovaných hostitelů různými druhy a genotypy kryptosporidií (Tabulka 3). Každý test byl proveden přesně dle pokynů výrobce.

4.2.6.5 Detekce průchodu infekční dávky *Cryptosporidium proliferans* gastrointestinálním traktem zvířat v prvních 24 hodinách po infekci

V tomto experimentu bylo použito devět 8-týdenních BALB/c myší. Tři zvířata byla inokulována dávkou 1×10^6 purifikovaných, životaschopných oocyst *C. proliferans*. Další tři zvířata byla inokulována dávkou 1×10^6 purifikovaných, devitalizovaných oocyst *C. proliferans*. Poslední tři zvířata byla inokulována dávkou solubilního antigenu odpovídající množství 1×10^6 purifikovaných oocyst *C. proliferans*. Zvířata byla inokulována 5 dávkami vždy po 1 hodině. Od začátku experimentu byl z každého zvířete odebírán trus v hodinových intervalech. Přítomnost oocyst a specifické DNA kryptosporidií byla ve všech vzorcích testována mikroskopicky, PCR a imunochromatografickými testy. Za pozitivní výsledek byl považován alespoň jeden pozitivní záchyt ze tří zvířat.

4.2.6.6 Detekce průchodu infekční dávky *Cryptosporidium parvum* gastrointestinálním traktem zvířat v prvních 24 hodinách po infekci

Tento experiment je identický s předešlým (4.2.6.5) vyjma použité infekční dávky. BALB/c myši byly perorálně inokulovány oocystami nebo antigenem *C. parvum*.

4.2.6.7 Detekce průchodu infekční dávky *Cryptosporidium baileyi* gastrointestinálním traktem zvířat v prvních 24 hodinách po infekci

V tomto experimentu byly použity tři 8-týdenní BALB/c myši. Zvířata byla inokulována dávkou 1×10^6 purifikovaných, životaschopných oocyst *C. baileyi*. Zvířata byla inokulována 5 dávkami vždy po 1 hodině. Od začátku experimentu byl z každého zvířete odebírán trus v hodinových intervalech. Přítomnost oocyst a specifické DNA kryptosporidií byla ve všech vzorcích testována mikroskopicky, PCR a imunochromatografickými testy. Za pozitivní výsledek byl považován alespoň jeden pozitivní záchyt ze tří zvířat.

4.2.6.8 Detekce antigenu kryptosporidií v trusu zvířat po přidání antigenu získaného z excystovaných oocyst do pitné vody

V tomto experimentu byly použity tři 8-týdenní BALB/c myši. Každé zvíře bylo chováno individuálně v samostatné chovné nádobě. Do pitné vody byl přidán solubilní antigen získaný po excystaci oocyst *C. proliferans* v dávce odpovídající množství 200, 1000 nebo 10 000 oocyst v 1 ml vody. Po 18 hodinách byl odebírán trus a další vzorky vždy po 6 hodinách po dobu 3 dnů. Přítomnost specifického antigenu v trusu jednotlivých zvířat byla detekována imunochromatografickým testem RIDA.

4.2.6.9 Detekce *Cryptosporidium proliferans* v průběhu prepatentní periody u 7-denních a 8-týdenních BALB/c myší

Pro tento experiment bylo použito 21 7-denních a 21 8-týdenních BALB/c myší. Všechna zvířata byla perorálně inokulována dávkou 1×10^6 životaschopných, purifikovaných oocyst *C. proliferans*. Po infekci bylo vždy utraceno jedno zvíře v intervalech: 0 h, 1 h, 6 h, 12 h a pak každých 12 hodin, od 3. dne po infekci pak každých 24 hodin až do konce experimentu (15 DPI). Po usmrcení zvířete byla vždy ihned provedena pitva a byl odebírán vzorek obsahu žaludku, sliznice žaludku a trusu z rekta. Přítomnost oocyst byla testována mikroskopicky (obsah žaludku a vzorek

trusu z rekta) a antigenu imunochromatografickým testem RIDA QUICK *Cryptosporidium* (dále jen RIDA) (obsah žaludku a vzorek trusu z rekta). Specifická DNA kryptosporidií byla prokázána pomocí PCR (sliznice žaludku a vzorek trusu z rekta).

4.2.6.10 Detekce *Cryptosporidium parvum* v průběhu prepatentní periody u 7-denních a 8-týdenních BALB/c myší

Pro tento experiment bylo použito 21 7-denních a 21 8-týdenních BALB/c myší. Všechna zvířata byla perorálně inokulována dávkou 1×10^6 životaschopných, purifikovaných oocyst *C. parvum*. Po infekci bylo vždy utraceno jedno zvíře v intervalech: 0 h, 1 h, 6 h, 12 h a pak každých 12 hodin až do 3. dne po infekci. Následně bylo každých 24 hodin utraceno jedno zvíře až do konce experimentu (15 DPI). Po usmrcení zvířete byla vždy ihned provedena pitva a byl odebírán vzorek obsahu tenkého střeva, sliznice tenkého střeva a trusu z rekta. Přítomnost oocyst byla testována mikroskopicky (obsah tenkého střeva a vzorek trusu z rekta) a antigenu imunochromatografickým testem RIDA (obsah tenkého střeva a vzorek trusu z rekta). Specifická DNA kryptosporidií byla prokázána pomocí PCR (sliznice tenkého střeva a vzorek trusu z rekta).

5 Výsledky

5.1 Porovnání senzitivity imunochromatografických testů s molekulárními a mikroskopickými metodami

Nejméně citlivou metodou detekce oocyst v trusu bylo mikroskopické vyšetření barveného nátěru. Dolní limit senzitivity této metody se pohyboval mezi 781–1563 oocystami. Všechny testované imunochromatografické testy vykazovaly podobnou senzitivitu až do koncentrace ~400 oocyst v testovaném vzorku. Testem Crypto-Strip C-1005 nebyla zachycena koncentrace 200 oocyst ve vzorku, zatímco zbylé čtyři testy vykazovaly pozitivní reakci. Metoda nested PCR byla ze všech metod nejcitlivější a bylo jí detekováno ~12 oocyst ve vzorku (Tabulka 6).

Tabulka 6. Porovnání senzitivity imunochromatografických testů s molekulárními a mikroskopickými metodami

Typ vyšetření	Počet oocyst ve 100 mg trusu												
	50000	25000	12500	6250	3125	1563	781	391	195	98	49	25	12
Mikroskopické vyšetření	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Imunochromatografický test													
• RIDA QUICK	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.
• Crypto-Strip C-1005	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.
• CoproStripTM	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.
• BioK 15	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.
• OD-278 CryptoCard	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.
Nested PCR	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.

poz. – pozitivní výsledek; **neg.** – negativní výsledek

5.2 Porovnání senzitivity imunochromatografických testů na solubilní antigen kryptosporidií

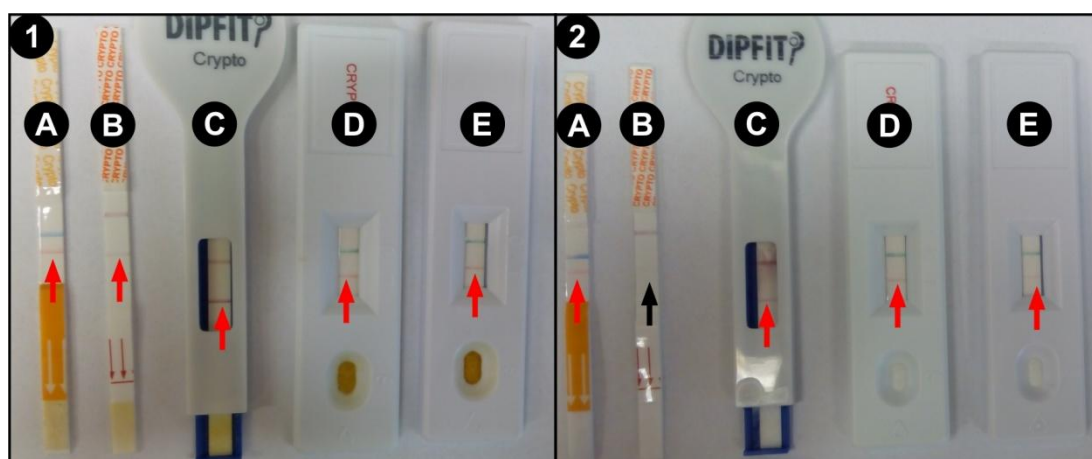
Výsledky senzitivity testů na solubilní antigen kryptosporidií byl srovnatelný se senzitivitou zjištěnou při testu detekce oocyst v trusu. Všechny testy vyjma Crypto-Strip C-1005 byl detekován antigen odpovídající koncentraci ~200 oocyst. Nejnižší koncentrace antigenu, která byla detekována testem Crypto-Strip C-1005 odpovídala 500 excystovaným oocystám (Tabulka 7). U testu BioK 15 od výrobce Bio-X Diagnostic byl na rozdíl od ostatních testů vykazující pozitivní reakci výsledný pozitivní pruh při koncentraci antigenu ekvivalentnímu 200 oocystám velmi slabý (Obrázek 2).

Tabulka 7. Porovnání senzitivity imunochromatografických testů při detekci solubilního antigenu kryptosporidií

Typ vyšetření	Koncentrace antigenu ve 100 μ l roztoku odpovídající počtu excytovaných oocyst				
	2000	1000	500	200	100
RIDA QUICK	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.
Crypto-Strip C-1005	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.
CoproStrip TM	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.
BioK 15	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.
OD-278 CryptoCard	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.

poz. – pozitivní výsledek; **neg.** – negativní výsledek

Obrázek 2. Ukázka pozitivní reakce imunochromatografických testů A) RIDA QUICK, B) Crypto-Strip C-1005, C) CoproStripTM, D) BioK 15 a E) OD-278 CryptoCard na přítomnost 1) 50 000 nebo 2) 200 oocyst ve 100 mg vzorku. Červená šipka ukazuje pozitivní výsledek; černá šipka ukazuje negativní výsledek



5.3 Vliv způsobu skladování vzorků na senzitivitu imunochromatografických testů

Výsledky tohoto testu prokázaly, že ani použitá skladovací média (RNAlater, 5% dichroman draselný a 70% etanol), ani teplota skladování (4–6 °C, -18 °C a laboratorní teplota) nemají vliv na detekci antigenu kryptosporidií v trusu při dlouhodobém uchovávání po dobu 1 roku. Všechny testované imunochromatografické testy prokázaly přítomnost antigenu kryptosporidií.

5.4 Testování specifity imunochromatografických testů pro různé druhy a genotypy kryptosporidií

Všechny námi použité imunochromatografické testy byly specifické k detekci antigenu *C. parvum*, pro který jsou testy výrobci certifikovány. Výsledky testování ukázaly, že použití testů není univerzální. U řady druhů a genotypů kryptosporidií nebyla prokázána pozitivní reakce s antigenem, přestože vzorky byly prokazatelně pozitivní a koncentrace oocyst byla dostatečná (Tabulka 8). Výsledky experimentu taktéž ukázaly, že všechny testované imunochromatografické testy vykazují shodný výsledek. Na některém byl pozitivní pruh méně intenzivní, na jiném více, odečtený finální výsledek byl však stejný. U testu Crypto-Strip C-1005 bylo stejně jako v předešlých testech pozorováno slabší zbarvení pozitivního proužku, což zhoršuje jeho odečítání (Obrázek 2).

Tabulka 8. Specifita imunochromatografických testů pro různé druhy a genotypy kryptosporidií

Druh/genotyp kryptosporidií	Imunochromatografický test				
	RIDA QUICK	Crypto-Strip C-1005	CoproStripT M	BioK 15	OD-278 CryptoCard
<i>C. hominis</i>	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.
<i>C. muris</i>	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.
<i>C. parvum</i>	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.
<i>C. proliferans</i>	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.
<i>C. tyzzeri</i>	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.
vole genotyp IV	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.
<i>C. avium</i>	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>C. baileyi</i>	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>C. ducismarci</i>	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>C. scrofarum</i>	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>C. testudinis</i>	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
apodemus genotyp I	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
apodemus genotyp II	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
duck genotyp	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
rat genotyp I	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
rat genotyp IV	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
vole genotyp II	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

poz. – pozitivní výsledek; **neg.** – negativní výsledek

5.5 Detekce průchodu oocyst a antigenu *Cryptosporidium proliferans*, *C. parvum* a *C. baileyi* gastrointestinálním traktem zvířat v prvních 24 hodinách po inokulaci

První záchyt specifické DNA nebo antigenu *C. proliferans* nebo *C. parvum* byl poprvé zaznamenán pomocí PCR a imunochromatografického testu v trusu zvířat 2–4 hodiny po inokulaci. Oocysty těchto kryptosporidií byly mikroskopicky poprvé detekovány od 3. hodiny a naposledy 12.–14. hodinu po inokulaci (Tabulka 9). Poslední pozitivní PCR analýzy a imunochromatografické testy u zvířat inokulovaných antigenem *C. proliferans* nebo *C. parvum* byly zaznamenány 16–20 hodin po zahájení experimentu, vyjma zvířat inokulovaných devitalizovanými oocystami *C. proliferans* nebo *C. parvum*. U této skupiny zvířat nebyla v žádném z odebraných vzorků detekována specifická DNA pomocí PCR, přestože vzorky trusu byly pozitivní na antigen kryptosporidií (Tabulka 9).

V experimentu, kdy byly myši inokulovány *C. baileyi*, bylo prokázáno, že specifickou DNA a oocysty je možné detekovat od 3., respektive 5. hodiny do 17., respektive 16. hodiny po inokulaci, zatímco specifický antigen nebyl detekován v žádném z testovaných vzorků (viz specifita v tabulce 8).

Tabulka 9. Detekce průchodu oocyst, specifické DNA a antigenu *Cryptosporidium proliferans* (C.pr) a *Cryptosporidium parvum* (C.pa) gastrointestinálním traktem BALB/c myši v prvních 24 hodinách po inokulaci pomocí mikroskopických a molekulárních metod a imunochromatografického testu RIDA QUICK *Cryptosporidium*. Výsledek reprezentuje detekci u tří zvířat v každé skupině. Pozitivní záchyt představuje alespoň jedno pozitivní zvíře ve skupině v daném čase.

Čas (hod)	1×10 ⁶ živých oocyst						1×10 ⁶ devitalizovaných oocyst						Antigen odpovídající 1×10 ⁶ excystovaných oocyst					
	PCR		ICT		MICRO		PCR		ICT		MICRO		PCR		ICT		MICRO	
	C.pr	C.pa	C.pr	C.pa	C.pr	C.pa	C.pr	C.pa	C.pr	C.pa	C.pr	C.pa	C.pr	C.pa	C.pr	C.pa	C.pr	C.pa
0	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2	neg.	poz.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
3	neg.	poz.	neg.	poz.	neg.	poz.	neg.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
4	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
5	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
6	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
7	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
8	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
9	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
10	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
11	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
12	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
13	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
14	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
15	poz.	poz.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
16	poz.	poz.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.
17	neg.	poz.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
18	neg.	poz.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
19	neg.	poz.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
20	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	poz.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
21–24	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

PCR – polymerázová řetězová reakce; ICT – detekce kryptosporidiového antigenu
MICRO – mikroskopická detekce oocyst; **poz.** – pozitivní výsledek; **neg.** – negativní výsledek

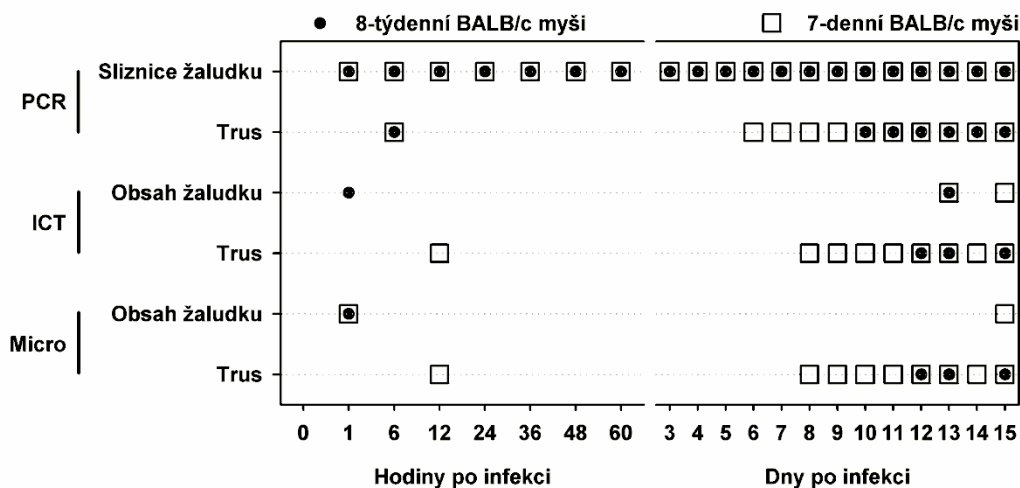
5.6 Detekce antigenu kryptosporidií v trusu zvířat po přidání antigenu získaného z excystovaných oocyst do pitné vody

U zvířat, kterým byl do pitné vody přidán antigen *C. proliferans* v množství odpovídajícím 200 nebo 1000 excystovaných oocyst, nebyl u žádného z testovaných vzorků trusu zaznamenán pozitivní imunochromatografický test. U zvířat, kterým byl do pitné vody přidán antigen odpovídající 10 000 excystovaných oocyst, byl imunochromatografickým testem antigen detekován po 18, 24 a 48 hodinách od přidání do pitné vody, naopak po 30, 36, 42, 54, 60, 66 a 72 hodinách po přidání antigenu byly testy negativní.

5.7 Detekce specifické DNA, oocyst a antigenu *Cryptosporidium proliferans* v průběhu prepatentní a patentní periody u BALB/c myši

DNA *C. proliferans* byla ve sliznici žaludku zachycena pomocí PCR již od 1. hodiny po infekci a to jak u 8-týdenních, tak 7-denních myši a následně po celou dobu trvání experimentu. Specifická DNA *C. proliferans* byla v trusu 8-týdenních myši poprvé detekována metodou PCR 6 hodin po infekci a následně až 10. den po infekci (DPI). U 7-denních myši byl pravidelný záchyt specifické DNA *C. proliferans* zaznamenán od 6. DPI. U obou věkových kategorií byla prokázána přítomnost oocyst a antigenu v obsahu žaludku 1. hodinu po infekci a následně až po uplynutí prepatentní periody. Navíc mikroskopický průkaz přítomnosti oocyst *C. proliferans* a antigenu byl v žaludečním obsahu obou věkových skupin nepravidelný (Graf 1). Až od prvního záchytu specifické DNA kryptosporidií v trusu 8-týdenních (10 DPI) a 7-denních myši (6 DPI) byly vzorky trusu pozitivně testovány pomocí mikroskopických a imunochromatografických metod (Graf 1).

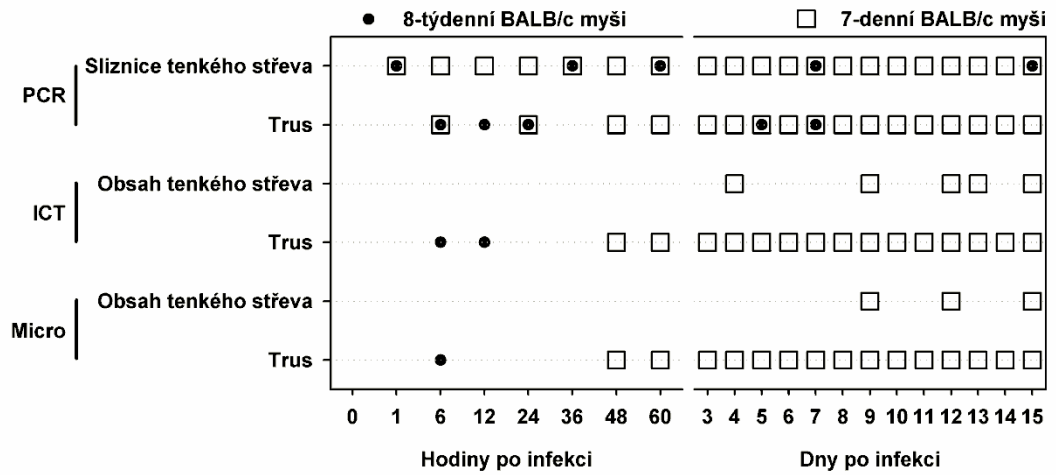
Graf 1. Detekce specifické DNA, oocyst a antigenu *Cryptosporidium proliferans* v průběhu prepatentní a patentní periody u 7-denních a 8-týdenních BALB/c myši v různých částech zažívacího traktu. PCR – polymerázová řetězová reakce, ICT – Imunochromatografický test, Micro – mikroskopické vyšetření.



5.8 Detekce *Cryptosporidium parvum* v průběhu prepatentní a patentní periody u BALB/c myši

DNA *C. parvum* byla ve sliznici tenkého střeva 7-denních myši zachycena pomocí PCR již od 1. hodiny po infekci a následně po celou dobu trvání experimentu. Naopak u 8-týdenních myši byla DNA *C. parvum* ve sliznici tenkého střeva detekována sporadicky (Graf 2). V trusu 8-týdenních myši byla DNA *C. parvum* detekována v prvních 24 hodinách po infekci a následně ojedinele, a to 5. a 7. DPI, přičemž v žádném z testovaných vzorků nebyly mikroskopicky detekovány oocysty a současně nebyl žádný z nich pozitivní na přítomnost antigenu kryptosporidií. Taktéž obsah tenkého střeva byl po celou dobu trvání experimentu negativní na přítomnost oocyst nebo antigenu. U 7-denních BALB/c myši byla zjištěna 2-denní prepatentní perioda. Od 2. DPI byl vzorky trusu pozitivní na přítomnost specifické DNA, oocyst a antigenu. Naopak v obsahu tenkého střeva byly oocysty nebo antigen detekovány ojedinele (Graf 2).

Graf 2. Detekce specifické DNA, oocyst a antigenu *Cryptosporidium parvum* v průběhu prepatentní a patentní periody u 7-denních a 8-týdenních BALB/c myši v různých částech zažívacího traktu. PCR – polymerázová řetězová reakce, ICT – imunochromatografický test, Micro – mikroskopické vyšetření .



6 Diskuse

Průjem patří ve vyspělých státech k jedné z nejčastějších příčin absence lidí v pracovním procesu, zatímco v rozvojových zemích je jednou z hlavních příčin smrti obyvatelstva (Nemes 2009). Celosvětově zemře ročně na následky průjmových onemocnění 8–10 milionů lidí, z čehož téměř 11 % představují děti do pěti let věku (Liu et al. 2012; Nemes 2009). Paraziti rodu *Cryptosporidium* jsou jednou ze čtyř nejčastějších příčin průjmů. Na rozdíl od mnoha běžných příčin infekčních enteritid, léčba a kontrola kryptosporidiózy je stále problematičtější. V současné době nejsou k dispozici žádné 100% účinné léky nebo vakcína (Striepen 2013). Kryptosporidie jsou často podceňovány zejména z důvodů omezených, anebo nevhodných diagnostických nástrojů a postupů zvláště v rozvojových zemích (Caccio et Putignami 2014). Použité metody a správná interpretace výsledků je při diagnostice kryptosporidiových infekcí zcela zásadní.

Ve většině případů je průběh kryptosporidiové infekce bez významných problémů, ale u jedinců s oslabenou imunitou mohou vyvolat závažné zdravotní problémy v podobě rozsáhlých průjmů (Tzipori et al. 2002). V případě symptomatické infekce, kdy je nutná lékařská pomoc, protože akutní průjem může být u oslabených jedinců i život ohrožující, je nezbytná rychlá diagnostika (Bouyou-Akotet et al. 2016). Přestože mikroskopické techniky jsou velmi rychlé a cenově a materiálně celosvětově dostupné, jejich citlivost je v porovnání s molekulárními metodami nízká, což prokázala i naše studie (Hadfield et al. 2011). Navíc při akutních případech nastupují klinické příznaky dříve, než jsou vylučovány oocysty (Rašková et al. 2013).

Velmi častou alternativou k molekulárním a mikroskopickým metodám se v posledním desetiletí staly imunochromatografické testy (Agnam et al. 2011; Bouyou-Akotet et al. 2014; Chalmers et al. 2011; Klein et al. 2009). Výsledky jsou známy během 10 minut, což umožňuje diagnostikovat infekci včas a ihned mohou být provedena léčebná opatření. Použití těchto testů má však řadu nevýhod, kterými se zabývala i tato práce. Všechny imunochromatografické testy jsou primárně vyvíjeny pro detekci nejčastějších druhů kryptosporidií infikujících člověka, tedy proti *C. parvum* a *C. hominis* zodpovědných za více než 90 % všech kryptosporidióz (Bouyou-Akotet et al. 2016). Nicméně člověk může být parazitován nejméně 20 dalšími druhy a genotypy kryptosporidií (Ortega et Kváč 2013). V souladu s dříve

publikovanými pracemi, jsme prokázali specifitu použitých imunochromatografických testů k *C. parvum* a *C. hominis* (Chalmers et al. 2011). Senzitivita k dalším kryptosporidiím je nejednoznačná. Zatímco Llorente et al. (2002) neprokázali přítomnost antigenu *C. meleagridis* v testovaném vzorku, přestože byl vzorek na tento druh pozitivní, Chalmers et al. (2011) uvádějí senzitivitu imunochromatografických testů k tomuto druhu kryptosporidie. Rozdíl ve výsledcích studií provedených Chalmers et al. (2011) a Llorente et al. (2002) by mohl být způsoben v použití odlišného typu testu. Na druhou stranu oba testy byly použity v této studii a na žádném z provedených experimentů nebyl zjištěn rozdíl ve specifitě a senzitivitě testů. Přestože většina prací a výrobců testů uvádí vysokou specifitu v rozmezí 95–99 % (Garcia et al. 2003, Llorente et al. 2002), v této práci jsme jednoznačně prokázali, že řada komerčních testů nereaguje s velkým množstvím druhů a genotypů kryptosporidií. Tento nedostatek činí testy zcela nevhodné pro použití ve veterinární medicíně. Také v případech, kdy by byl pacient parazitován málo frekventovanými druhy a genotypy kryptosporidií, jako například *C. scrofarum* (Kváč et al. 2009b) nebo apodemus genotyp I (Beser et al. nepublikováno), budou dle naší studie výsledky imunochromatografických testů falešně negativní. Chalmers et al. (2011) uvádí citlivost testů k *C. ubiquitum* a *C. felis*, nicméně tyto druhy nebyly v naší studii použity a proto nelze porovnat výsledky.

Naše studie prokázala, že limitní množství oocyst ve vzorku je přibližně 200 oocyst a že senzitivita testů se od sebe téměř neliší. K podobným výsledkům dospěl i Llorente et al. (2002). Senzitivita testů v jednotlivých studiích se pohybuje v rozmezí od 5,5 do 98,8 % (Agnamey et al. 2011; Bouyou-Akotet et al. 2016; Chalmers et al. 2011; Garcia et al. 2003; Llorente et al. 2002). Všechny studie byly založeny na testování klinických vzorků infikovaných pacientů, v jejichž stolici byla detekována specifická DNA kryptosporidií s následnou genotypizací (Shimelis et al. 2014). Současně však ve většině studií chybí kvantifikace intenzity infekce vyjádřená počtem oocyst v 1 g stolice. V tomto spatřujeme jednu z hlavních příčin odlišné senzitivity testů. Za zmínku stojí, že většina výrobců neuvádí minimální detekční limit oocysts. U testu Crypto-Strip C-1005 uvádí výrobce limit 50–100 oocyst. Tento test však byl v naší práci nejhorší a dle našich výsledků byl detekční limit 500 oocyst. Falešně negativní výsledky mohou být tedy dány buď nízkou koncentrací oocyst ve vzorku (senzitivita), nebo protilátky použité v testu nereagují s antigenem příslušné kryptosporidie (specifita).

Jedním z dosud nevyřešených problémů je, zda je možné od sebe odlišit aktivní infekci od pasáže oocyst zaživacím traktem a zda je možné detekovat infekci hostitele v průběhu prepatentní periody. Použití citlivých metod, jako je PCR nebo qPCR, je velmi účinné, ale pozitivní výsledek potvrzuje pouze přítomnost *Cryptosporidium* specifické DNA ve vzorku, která může, ale nutně nemusí znamenat aktivní infekční proces, o čemž svědčí celá řada případů (Arcay et al. 1995; Kváč et al. 2012). Přestože oocysty *C. parvum* byly detekovány v zaživacím traktu ryb, experimentální infekce neprokázaly vnímavost ryb k této kryptosporidii (Graczyk et al. 1996; Upton 1990). Obdobně přítomnost oocyst *C. muris*, *C. tyzzeri* nebo *Cryptosporidium* spp. v trusu z rohatky ozdobné (*Ceratophrys ornata*) (Crawshaw et Mehren 1987), užovky červené (*Elaphe guttata*), užovky černé (*Elaphe obsoleta*) nebo hroznýše (*Boa constrictor*) byla v důsledku pasáže zaživacím traktem (Xiao et al. 2004). Oocysty detekované v trusu těchto zvířat pocházely z infikovaných myší používaných ke krmení. Obdobně Kváč et al. (2012) prokázali, že prasata (*Sus scrofa*) nejsou vnímavá k infekci *C. muris* a *C. tyzzeri*, přestože se tyto paraziti v jejich trusu ojediněle vyskytují. Výsledky této práce bezpochyby prokázaly, že je v trusu hostitele možné detekovat jak specifickou DNA, tak i antigen nebo oocysty kryptosporidií, a to i v případě, že se jedná o pasáž devitalizovaných oocyst nebo hostitelsky nespécifické druhy (*C. baileyi*), které nemohou vyvolat aktivní infekci. Všechny námi použité metody v těchto případech vykazovaly falešně pozitivní výsledky. Nicméně byla vždy detekována pouze infekční dávka v prvních 24 hodinách po infekci. Na základě těchto výsledků by bylo vhodné vyšetřovat hostitele opakovaně. Avšak i tento přístup má svá omezení. Řada hostitelů, zejména volně žijících zvířat, vylučuje oocysty do prostředí nepravidelně, tedy opakovaný negativní výsledek nemusí signalizovat pasáž oocyst. Naše studie jasně ukázala, že i v případě kdy je hostitel prokazatelně infikován (přítomnost parazita v tkáni), nemusí být přítomnost specifické DNA, antigenu nebo oocyst vždy detekovatelná. Tyto výsledky jsou ve shodě s předešlými studiemi (Ježková et al. 2016; Kváč et al. 2012; Munzarová 2012).

V shodě s Munzarovou (2012) jsme jednoznačně prokázali, že v průběhu prepatentní periody není možné detekovat specifickou DNA kryptosporidií v trusu experimentálně infikovaných zvířat. Navíc jsme ukázali, že přítomnost antigenu detekovaného imunochromatografickými testy je vázána na přítomnost oocyst

v trusu, respektive na přítomnost jejich antigenu. V případě, že nejsou hostitelem produkovány oocysty je imunochromatografický test negativní.

7 Závěry

- Nebyl zjištěn rozdíl v senzitivitě použitých imunochromatografických testů.
- Detekční limit pro většinu imunochromatografických testů byl 200 oocyst ve vzorku.
- Přítomnost koproantigenu je vázána na přítomnost oocyst ve vzorku trusu/stolice.
- Falešně negativní výsledky imunochromatografických testů jsou způsobeny i) nízkou koncentrací oocyst ve vzorku (senzitivita) nebo ii) protilátky použité v testu nereagují s antigenem příslušné kryptosporidie (specifita).
- Výsledky imunochromatografických testů je vhodné kombinovat s dalšími metodami.
- V průběhu patentní periody nelze detekovat specifickou DNA, antigen nebo oocysty kryptosporidií.
- Nelze odlišit aktivní infekci a pasáž oocyst použitím kombinace PCR a imunochromatografických testů.

8 Citovaná literatura

- Agnamey P., Sarfati C., Pinel C., Rabodoniriina M., Kapel N., Dutoit E., Garnaud C., Diouf M., Garin J. F., Totet A., Derouin F., 2011:** Evaluation of four commercial rapid immunochromatographic assays for detection of *Cryptosporidium* antigens in stool samples: a blind multicenter trial. *J. Clin. Microbiol.* 49:1605–1607.
- Alvarez-Pellitero P., Quiroga M. I., Sitja-Bobadilla A., Redondo M. J., Palenzuela O., Padrós F., Vázquez S., Nieto J. N., 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.
- Alvarez-Pellitero 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.
- Arcay L., DeBorges E. B., Bruzual E., 1995:** Cryptosporidiosis experimental en la escala de vertebrados. *Parasitol. Dia.* 19:20–29.
- Arrowood B. C., Sterling C. R., 1987:** Isolation of *Cryptosporidium* oocyst and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.* 73:314–319.
- Bouyou-Akotet M. K., Owono-Medang M., Moussavou-Boussougou M. N., Mabika Mamfoumbi M., Mintsa-Nguema R., Mawili-Mboumba D. P., Kombila M., 2016:** Low sensitivity of the ImmunocardSTAT Crypto/Giardia Rapid Assay test for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fial samples from children living in Libreville, Central Africa. *J. Parasit. Dis.* 40:1179–1183.
- Bouzig M., Hunter P. R., Chalmers R. M., Tyler K. M., 2013:** *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 26:115–134
- Caccio S. M., Putignami L., 2014:** Epidemiology of Human Cryptosporidiosis. In: Caccio S. M., Widmer G. (Eds) *Cryptosporidium: parasite and disease.* pp.43–79.
- 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.
- Casemore D. P., Sands R. L., Curry A., 1985:** *Cryptosporidium* species a “new” human pathogen. *J. Clin. Pathol.* 38:132–1336.
- Cavalier-Smith T., 2014:** Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *Eur. J. Protistol.* 50:472–495.
- Centers for Disease Control and Prevention [online]:** [cit. 2017-3-9]. <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>.
- Crawshaw G. J., Mehren K. G., 1987:** Cryptosporidiosis in zoo and wild animals, in *Erkrankungen der Zootiere, Verhandlungsbericht des 29. Int. Symp. über die Erkrankungen der Zootiere von 20*, Ippen R., and Schroder H. D., Eds., Akad. Verlag. Berlin. pp.353–362.
- 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.
- Deng M., Rutherford M. S., Abrahamsen M. S., 2004:** Host intestinal epithelial response to *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 56:869–84.
- Díaz-Lee A., Mercado R., Onuoha E. O., Ozaki L. S., Munoz P., Munoz V., Martínez F. J., Fredes F., 2011:** *Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. *Vet. Parasitol.* 176:139–144.
- Elliott D. A., Coleman D. J., Lane M. A., May R. C., Machesky L. M., Clark D. P., 2001:** *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerization. *Infect. Immun.* 69:5940–5942.
- El-Moamly A. A., El-Sweify M. A., 2011:** ImmunoCard STAT! Cartridge antigen detection assay compared to microplate enzyme, immunoassay and modified Kinyoun's acid-fast staining technique for detection of *Cryptosporidium* in fecal specimens. *Parasitol. Res.* 110:1037–1041.
- 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.
- Fayer R., Santín M., Macarisin D., 2010:** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172:23–32.
- Fayer R., 2010:** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasit.* 124:90–97.
- Fayer R., Phillips L., Anderson B. C., Bush M., 1991:** Chronic cryptosporidiosis in a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 22:228–232.
- Fayer R., Santín M., 2009:** *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 164:192–200.
- 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., 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: R. Fayer (Ed.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC press, Boca Raton. 1–42.
- 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., Lal A. A., Dubey J. P., 2001:** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87:1415–1422.
- Feng Y., 2008:** *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp. Parasitol.* 124:128–137.
- Fleece M. E., Heptinstall J., Khan S. S., Kabir M., Herbein J., Haque R., Petri Jr.W. A., 2016:** Evaluation of a Rapid Lateral Flow Point-of-Care Test for Detection of *Cryptosporidium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95:840–841.
- Garcia L. S., Shimizu R. Y., 2000:** Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC

- combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J. Clin. Microbiol.* 38:1267–1268.
- Garcia L. S., Shimizu R. Y., Novak S., Carroll M., Chan F., 2003:** Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. *J. Clinical. Microbiol.* pp.209–212.
- Ghazy A. A., Abdel-Shafy S., Shaapan R. M., 2016:** Cryptosporidiosis in animals and man: 3. Prevention and Control. *Asian J. Epidemiolog.* 9:1–9.
- Graczyk T. K., Cranfield M. R., Fayer R., Anderson M. S., 1996b:** Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocyst are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. *App. Environ. Microbiol.* 62:3234–3237.
- Graczyk T. K., Fayer R. and Cranfield M. R. 1996a:** *Cryptosporidium parvum* is not transmissible to fish, amphibia, or reptiles. *J. Parasitol.* 82:748–751.
- Hadfield S. J., Robinson G., Elwin K., Chalmers R. M., 2011:** Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 49:918–924.
- Helmy Y. A., Krücken J., Nöckler K., von Samson-Himmelstjerna G., Zessin K. H., 2013:** Comparison between two commercially available serological tests and polymerase chain reaction in the diagnosis of *Cryptosporidium* in animals and diarrhoeic children. *Parasitol. Res.* 113:211–216.
- Holubová N., Sak B., Horčíčková M., Hlásková L., Květoňová D., Menchaca S., McEvoy J., Kváč M., 2016:** *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitol. Res.* 6:2243–2251.
- Hoover D. M., Hoerr F. J., Carlton W. W., Hinsman E. J., Ferguson H. W., 1981:** Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus* Bloch and Schneider. *J. Fish. Dis.* 4:425–428.
- Chalmers R. M., Campbell B. M., Crouch N., Charlett A., Davies A. P., 2011:** Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *J. Med. Microbiol.* 60:1598–1604.

- Chartier C., Rieux A., Delafosse A., Lehebel A., Paraud C., 2013:** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh calf faeces: Characteristics of two simple tests and evaluation of a semi-quantitative approach. *Vet. Journal.* 198:148–152.
- Iseki M., 1979:** *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn. J. Parasitol.* 28:285–307.
- 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.
- Jex A. R., Smith H. V., Monis P. T., Campbell B. E, Gasser R. B., 2008:** *Cryptosporidium* – biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnol. Adv.* 26:304–317.
- Ježková J., Horčíčková M., Hlásková L., Sak B., Květoňová D., Novák J., Hofmannová L., McEvoy J., Kváč M., 2016:** *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium tortoise* genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitol.* 63:035
- Jiang J., Alderisio K. A., Xiao L., 2005:** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm ebony water samples from free watersheds in New York. *App. Environ. Microbiol.* 71:4446–4454.
- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Křížek J., Modrý D., Šlapeta J., 2008:** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol.* 55:81–94.
- Johnston S. P., Ballard M. M., Beach M. J., Causer L., Wilkins P. P., 2003:** Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41:623–626.
- Klein D., Kern A., Lapan G., Benetka V., Möstl K., Hassl A., Baumgartner W., 2009:** Evaluation of rapid assays for the detection of bovine coronavirus, rotavirus A and *Cryptosporidium parvum* in faecal samples of calves. *Vet. Journal.* 182:484–486.

- 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. J. J., 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., 2014a:** *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. Vet. Parasitol. 201:9–17.
- Kváč M., Kestřánová M., Květoňová D., Kotková M., Ortega Y., McEvoy J., Sak B., 2012:** *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. Exp. Parasitol. 131:107–110.
- Kváč M., Kestřánová M., Pinková M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., Mcevoy J., Stenger B, Sak B., 2013:** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). Vet. Parasitol. 31:218–227.
- Kváč M., Kouba M., Vítovec J., 2006:** Age-related and housing dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. Vet. Parasitol. 137:202–209.
- Kváč M., Květoňová D., 2005:** Druhy a genotypy kryptosporidií parazitující u skotu. Veterinářství 55:356–358.
- Kváč M., Květoňová D., Sak B., Ditrich O., 2009b:** *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. Emerg. Infect. Dis. 15:982–983.
- Kváč M., McEvoy J., Stenger B., Clark M., 2014b:** Cryptosporidiosis in other vertebrates (Chapter 5). In: Widmer G. and Caccio S. (Eds.) *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer. Verlag Wien. pp. 237–326.
- Kváč M., Němejc K., Kestřánová M., Květoňová D., Wagnerová P., Kotková M., Rost M., Samková E., McEvoy J., Sak B., 2014c:** Age related susceptibility of pigs to *Cryptosporidium scrofarum* infection. Vet. Parasitol. 202:330–334.

- 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., Secor W. E., 2009a:** Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet. Parasitol.* 163:33–38.
- Langkjær 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.
- Levine N. D., Corliss J. O., Cox F. E., Deroux G., Grain J., Honigberg B. M., Leedale G. F., Loeblich A. R. 3rd, Lom J., Lynn D., Merinfeld E. G., Page F. C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F. G., 1980:** A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27:37–58.
- Li X., Pereira M. G. C., Larsen R., Xiao C., Phillips R., Striby K., McCowan B., Atwill E. R., 2015:** *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple Spermophilus ground squirrel species. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4:343–350.
- 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.
- Liu L., Johnson H. L., Cousens S., Perin J., Scott S., Lawn J. E., Rudan I., Campbell H., Cibulskis R., Li M., Mathers C., Black R. E., 2012:** Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet.* 379:2151–2161.
- Llorente M. T., Clavel A., Varea M., Olivera S., Castillo F. J., Sahagún J., Rubio M. C., Gómez-Lus R., 2002:** Evaluation of an Immunochromatographic Dip-Strip Test for the Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Stool Specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21:624–625.
- Mac Kenzie W. R., Hoxie N. J., Proctor M. E., Gradus M. S., Blair K. A., Peterson D. E., Kazmierczak J. J., Addiss D. G., Fox K. R., Rose J. B., Davis**

- J. P., 1994:** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331:161–167.
- McLauchlin J., Casemore, D. P., Moran S., Patel S., 1998:** The epidemiology of cryptosporidiosis: application of experimental sub-typing and antibody detection systems to the investigation of water-borne outbreaks. *Folia Parasitol.* 45:83–92.
- 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.
- Miláček P., Vítovec J. 1985:** Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 50.
- Morgan-Ryan U. M., Fall A., Ward L. A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R. C. A., Olsen M., Lal A. A., Xiao L., 2002:** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49:433–440.
- Munzarová L., 2012:** Detekce kryptosporidií pomocí molekulárních metod v klinických vzorcích: infekce nebo pasáž oocyst zaživacím traktem hostitele? Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 58 pp.
- Nemes Z., 2009:** Diarrhea from the infectologist's point of view. *Orv. Hetil.* 150:353–61.
- Nichols G. L., McLauchlin J., Samuel D., 1991:** A technique for typing *Cryptosporidium* isolates. *J. Protozool.* 38:237–240.
- Nichols G., 2008:** Epidemiology. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, second ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 79–118.
- Nime F. A., Burek J. D., Page D. L., Holscher M. A., Yardley J. H., 1976:** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70:592–598.
- Nina J. M. S., McDonald V., Dyson D. A., Catchpole J., Uni S., Iseki M., Chiodini P. L., McAdam K. P. W. J., 1992:** Analysis of oocyst wall and

- sporozoite antigens from three *Cryptosporidium* species. *Infect Immun.* 60:1509–1513.
- Ogunkolade B. W., Robinson H. A., McDonald V., Webster K., Evans D. A., 1993:** Isoenzyme variation within the genus *Cryptosporidium*. *Parasitol. Res.* 79:385–388.
- Ortega Y. R., Kváč M., 2013:** Foodborne protozoa. In: Labbé R. G. and García S. (Eds.): *Guide to Foodborne Pathogens, Second Edition.* John Wiley&Sons, Ltd. Chapter 19, pp. 330–316.
- Paperna I., Vilenken M., 1996:** Cryptosporidiosis in the gourami *Trichogaster leeri*: description of a new species and a proposal for a new genus, *Piscicryptosporidium*, for species infecting fish. *Dis. Aquat. Organ.* 27:95–101.
- Pavlásek I., Lávička M., 1995:** The first finding of a spontaneous gastric cryptosporidiosis infection in hamsters (*Phodopus roborovskii* Satunin, 1903). *Vet. Med. Praha* 40:261–263.
- Peng M. M., Wilson M. L., Holland R. E., Meshnick S. R., Lal A. A., Xiao L., 2003:** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. *Parasitol. Res.* 90:175–180.
- 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.
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning CH., Jian F., Wang R., Lv CH., Wang Q., Arrowood M. J., Xiao L., 2012:** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.* 130:274–281.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S. J., Katzer F., Bartley P. M., Hunter P. R., Nath M., Innes E. A., Chalmers R. M., 2010:** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa, Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* 40:1539–1548.

- Ryan U. M., Monis P., Enemark H. L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R. C., Xiao L., 2004:** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). J. Parasitol. 90:769–773.
- Ryan U. M., Power M., Xiao L., 2008:** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red kangaroo (*Macropus rufus*). J. Eucaryot. 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., Papparini A., Tong K., Xiao L., 2015:** *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). Exp. Parasitol. 150:31–35.
- Ryan U. M., Xiao L., 2014:** Taxonomy and molecular taxonomy. In: Caccio SM, Widmer G. (Eds.). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer Wien. pp. 3–42.
- Ryan U. M., Xiao L., Read C., Sulaiman I. M., Monis P., Lal A. A., Fayer R., Pavlásek I., 2003a:** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. J. Parasitol. 89:809–813.
- Santín M., Trout J. M., Xiao L., Zhou L., Greiner E., Fayer R., 2004:** Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. Vet. Parasitol. 122:103–117.
- Shimelis T., Tadesse E., 2014:** Performance evaluation of point-of-care test for detection of *Cryptosporidium* stool antigen in children and HIV infected adults. Paras. Vec. 7:227.
- Slavin D., 1955:** *Cryptosporidium melagridis* (sp. nov.). J. Comp. Pathol. 65:2662–2270.
- Smith H. V., Corcoran G. D., 2004:** New drugs and treatment for cryptosporidiosis. Cur. Opin. Infect. Dis. 17:557–564.
- Striepen B., 2013:** Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis. Nature 503:189–191.

- Traversa D., 2010:** Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Parasit. Vectors.* 25:3–21.
- Trotz–Willians L. A., Martin S. W., Martin D., Duffield T., Leslie K. E., Nydam D. V., Jamieson F., Peregrine A. S., 2005:** Multiattribute evaluation of two simple tests for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf faeces. *Vet. Parasit.* 134:15–23.
- Tyzzar E. E., 1907:** Asporozoan found in the peptic flanda of the common mouse. *Proc. Doc. Exp. Biol. Med.* 5:12–13.
- Tyzzar E. E., 1910:** Anextracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23:394–414.
- Tyzzar E. E., 1912:** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26:394–412.
- Tzipori S., Ward H., 2002:** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect.* 4:1047–58.
- Upton S. J., 1990:** *Cryptosporidium* spp. in lower vertebrates, in *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. Dubey J. P., Speer C. A., and Fayer R., (Eds). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 149–156.
- Valigurová A., Hofmannová L., Koudela B., Vávra J., 2007:** An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *J. Eucaryot. Microbiol.* 54:495–510.
- Vetterling J. M., Takeuchi A., Madden P. A., 1971:** Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. *J. Protozool.* 18:248–260.
- Xiao L., 2010:** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 124:80–89.
- Xiao L., Ryan U. M., Graczyk T. K., Limor J., Li L., Kombert M., Junge R., Sulaiman I. M., Zhou L., Arrowood M. J., Koudela B., Modrý D., Lal A. A. 2004:** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:891–899.