

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie – Živočišné

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Séroprevalence *Cryptosporidium* spp. v lidské populaci

Vedoucí diplomové práce: Ing. Michaela Horčíčková, Ph.D.

Školitel specialista: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Autor bakalářské práce: Valeriy Kutsyna

České Budějovice, 2020

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (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:

.....  
Valeriy Kutsyna

## **Poděkování**

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce Ing. Michaele Horčíčkové, Ph.D. za trpělivost, připomínky a obětovaný čas. Rovněž bych chtěl poděkovat prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za cenné rady a informace, a možnost pracovat v jeho laboratoři. Děkuji také kolektivu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za veškerou pomoc.

Tato bakalářská práce vznikla za finanční podpory Grantová agentury České republiky (číslo grantu 18-12364S, řešitel prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

## Abstrakt

V letech 2018 – 2020 bylo získáno 1366 vzorků sér imunokompetentních pacientů, z toho 860 z České republiky a 506 z Ukrajiny. U každého pacienta byl zjištěn věk, pohlaví a předchozí infekce kryptosporidii. Přítomnost specifických IgG protilátek proti kryptosporidii v krevním séru byly testovány pomocí nepřímého ELISA testu. Jako korpuskulární antigen byla použita drť oocyst *C. parvum* v množství  $10^5$  oocyst na jamku. Krevní sérum bylo ředěno v poměru 1:200 a protilátek 1:20 000. Věk pacientů se pohyboval v rozmezí od 1 dne věku do 89 let. Celkem bylo vyšetřeno 639 pacientů mužského pohlaví a 709 ženského pohlaví. Bylo prokázáno, že se vzrůstajícím věkem vyšetřované osoby se zvyšuje pravděpodobnost, že bude jedinec mít protilátky proti kryptosporidii, tedy se setká s infekcí. Dále jsme prokázali, že ženy jsou častěji pozitivní než muži, a to bez rozdílu národnosti. Při porovnání národností, bylo zjištěno, že Češi jsou častěji pozitivní než Ukrajinci. Ze získaných výsledků vyplývá, že u osob mladších 15 let byla zjištěna séroprevalence u méně než 20 % jedinců a u osob starších 16 let se séroprevalence pohybovala od 20 do 42 %, vyjma věkové skupiny 41 – 50 let, kde byla zjištěna séroprevalence ve výši okolo 50 %.

**Klíčová slova:** Kryptosporidie; séroprevalence; sérum; ELISA; Česká republika; Ukrajina; člověk

## Summary

In 2018 – 2020, 1366 samples of serum from immunocompetent patients, including 860 sera from the Czech Republic and 506 sera from Ukraine, were collected and examined by an indirect ELISA test to detect specific IgG antibodies against *Cryptosporidium* in human population. Age, sex, and relevant data on previous cryptosporidial infections were obtained from each patient. Oocysts of *C. parvum*,  $10^5$  oocysts per well, were used as a corpuscular antigen. Blood serum samples and secondary antibodies were diluted 1:200 and 1:20 000, respectively. The age range of patients varied from newborn infant to 89 years old. A total of 639 male and 709 female patients were examined. The results showed number of serologically positive patients increased with age. Moreover, females had higher seropositivity than males, regardless of nationality. Additionally, Czechs were more often positive than Ukrainians. The results showed less than 20 % of patients under 15 years of age were seropositive. In patients older than 15 years the seroprevalence ranged from 20 to 42 %, except the age group 41 – 50 years old, where seroprevalence was 50 %.

**Key words:** *Cryptosporidium*; seroprevalence; serum; ELISA; Czech Republic; Ukraine; human

# Obsah

1. Úvod.....	8
2. Literární přehled .....	9
2.1. Biologie a obecný přehled rodu <i>Cryptosporidium</i> .....	9
2.1.1. Historie rodu <i>Cryptosporidium</i> .....	9
2.1.2. Taxonomie kryptosporidií .....	9
2.1.3. Morfologie a vývojový cyklus kryptosporidií .....	11
2.1.4. <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	14
2.2. Kryptosporidióza .....	14
2.2.1. Terapie kryptosporidiózy.....	17
2.3. Epidemiologie a prevalence kryptosporidií.....	17
2.3.1. Epidemiologie.....	17
2.3.2. Prevalence a promořenost.....	20
2.4. Imunitní odpověď hostitele na kryptosporidiovou infekci.....	22
2.4.1. Složky vrozené imunity .....	22
2.4.2. Složky adaptivní imunity .....	25
2.4.3. ELISA test.....	28
2.4.4. Antigeny <i>C. parvum</i> .....	30
2.4.5. IgG .....	30
3. Cíle práce .....	31
4. Materiál .....	32
4.1. Vzorky sér pacientů.....	32
4.1.2. Protilátky.....	32
4.1.3. Oocysty <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	32
4.1.4. Pozitivní a negativní séra.....	32
5. Metody .....	32
5.1. Barvení nátěru trusu anilin-karbol-methyl-violetí dle Miláčka a Vítovce (1985).....	32
5.2. Purifikace oocyst .....	33
5.2.1. Sacharózový gradient (Arrowood et Sterling 1987).....	33
5.2.2. Cesium chloridový gradient.....	34
5.2.3. Ošetření oocyst chlormanem sodným (SAVO) .....	34
5.3. Testování korpuskulárního antigenu .....	35
5.4. Nepřímá ELISA.....	35
5.4.1. Příprava korpuskulárního antigenu.....	35
5.4.2. Navázání antigenů na pevnou fázi mikrotitrační destičky:.....	36
5.4.3. Příprava testovaného vzorku séra: .....	37

5.5. Hodnocení metody ELISA .....	37
5.5.1 Statistické hodnocení .....	38
6. Výsledky .....	39
6.1. Séroprevalence v ČR .....	39
6.2. Séroprevalence na Ukrajině.....	41
6.3. Statistické shrnutí .....	43
7. Diskuze.....	44
8. Závěry .....	47
9. Seznam zkratek .....	48
10. Seznam použité literatury.....	50

## 1. Úvod

Světová zdravotnická organizace a většina zemí světa uznává kryptosporidiózu jako globální problém, který se vyznačuje významným dopadem na sociální, lékařskou, veterinární, hospodářskou a environmentální sféru, což v posledních letech výrazně zvýšilo intenzitu výzkumu boje proti kryptosporidióze, včetně studií zaměřených na epidemiologii/epizootologii nemoci a vývoje nových diagnostických metod. Současná medicína považuje kryptosporidiózu za komorbidní onemocnění vyvolané silným imunopresivním stresem, které je tvořeno zvláštním komplexem symptomů s charakteristickými znaky parazitózy.

Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Teoretická část obsahuje základní informace týkající se kryptosporidií v biologickém a medicínském pojetí. V první kapitole je podrobně popsán vývojový cyklus prvoků rodu *Cryptosporidium*, jejich morfologie a taxonomie. Druhá podkapitola se zaměřuje na onemocnění kryptosporidiózu a interakce mezi parazitem a lidským tělem, rozebírá příznaky, patologii a léčbu. Třetí a čtvrtá podkapitola se zaměřuje na epidemiologii kryptosporidiózy a na vztahy mezi imunitním systémem lidského těla a parazitem. Poslední teoretická část pojednává o diagnostické metodě ELISA a jejích typech. V experimentální části je provedena laboratorní metoda ELISA: nejprve se pomocí metody Miláčka a Vítovce identifikuje vzorek stolice skotu pozitivní na *C. parvum*, poté se vzorek přečistí na sacharózovém a následně na cesium chloridovém gradientu. Dále byla přečištěná suspenze oocyst imobilizována ke dnu mikrodestičky. Nakonec se připravené vzorky séra otestovaly na přítomnost specifických protilátek proti *C. parvum* pomocí nepřímého ELISA-testu.



## **2. Literární přehled**

### **2.1. Biologie a obecný přehled rodu *Cryptosporidium***

#### **2.1.1. Historie rodu *Cryptosporidium***

Rod *Cryptosporidium* je tvořen výhradně kosmopolitně rozšířenými parazity gastrointestinálního traktu obratlovců. Během posledních 50 let byl zaznamenán narůstající zájem veřejnosti a vědců o kryptosporidie, díky jejich biologickým a patogenním vlastnostem, zejména zoonotickému potenciálu. Prvním vědcem, který identifikoval parazita a popsal životní cyklus prvoka rodu *Cryptosporidium*, byl Ernest Edward Tyzzer. V roce 1907 izoloval jednotlivá stádia ze sliznice žaludku myši a přiřadil rodové jméno *Cryptosporidium muris* podle nepřítomnosti sporocystového obalu uvnitř oocysty. O 5 let později popsal další druh – *C. parvum*, kdy byl parazit nalezen v tenkém střevě myši, později i králíků. Tyzzer se rozhodl uvést *C. parvum* jako nový druh na základě rozdílů v lokalizaci parazita ve srovnání s *C. muris* a podle odlišné morfometrie oocyst: oocysty *C. parvum* byly nalezeny jenom v tenkém střevě a byly výrazně menší než u *C. muris* (Tyzzer 1907, 1912). Během následujících sto let se podařilo popsat 45 druhů a desítky genotypů patřících do rodu *Cryptosporidium* (Holubová et al. 2019; Ryan et Xiao 2014).

Všudypřítomnost kryptosporidií je založena na schopnosti parazita infikovat všechny třídy obratlovcích hostitelů, včetně ryb, obojživelníků, plazů, ptáků a savců (Ryan et Xiao 2014). Infekční stádia jsou nesmírně odolná vůči běžnému filtrování vody, dezinfekci chloridem a UV-zářením, ale některé látky, například peroxid vodíku, chlordioxid a také zmražování oocysty ničí (Chroust et al. 1998; Rochelle et al. 2004). Oocysty zůstávají životaschopné měsíce až rok ve vodě – nejefektivnější přírodní dezinfikující prostředí způsobující zničení minimálně 70 % oocyst, podle Nicholse et al. (2004), tvoří inkubační podmínky při minimální teplotě 20 °C na dobu minimálně 12 týdnů, anebo skladování ve tmě v říční vodě při teplotě 4 °C způsobuje inaktivaci 99 % oocyst během 25 týdnů (Robertson et al. 1992).

#### **2.1.2. Taxonomie kryptosporidií**

Tradičně byly kryptosporidie řazeny do třídy Coccidia spolu s významnými parazity hospodářských zvířat – rody *Eimeria*, *Isospora*, *Sarcocystis* a dalšími, avšak bylo nalezeno velké množství zásadních rozdílů mezi kryptosporidiemi a zástupci kokcií. Základní morfologické a funkční znaky kryptosporidií jsou: nepřítomnost sporocystového obalu uvnitř oocyst, zvláštní extracytoplazmatický (ambicelulární) způsob rozmístění v hostiteli, dva odlišné typy oocyst (tlustostěnné a tenkostěnné) s

relativně jednoduchou vnější morfologií – bez mikropyle či polárních granulí, ale s unikátní strukturou – suture complex, neboli šev (Lendner et Dauschies 2017). Morfologicky a funkčně podobná struktura se nachází ve stěně oocyst rodu *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, *Isoospora* a *Goussia*, což naznačuje úzký fylogenetický vztah mezi kryptosporidii, sarcocystidy a calyptosporidy (*Goussia* a *Calyptospora*). Výše vypsání vlastností nejsou charakteristické pro kokcidie, což může naznačovat nepřesnost taxonomického systému.

Nástup molekulární éry narušil původní taxonomické zařazení kryptosporidií, proto se v současné době rod *Cryptosporidium* považuje za chybějící článek mezi třídami Coccidia a Gregarina a je přiřazen do nové skupiny Gregarinomorpha spolu s podtřídou Orthogregarinia. Příbuznost podtříd Cryptogregarina a Orthogregarinia naznačuje shodný průběh pohlavního rozmnožování merozoitů typu II, přítomnost extracytoplazmatických stádií uvnitř hostitele – trofozoitů a merozoitů a homologická podobnost epimeritového komplexu, spolu s druhotnou redukcí apikoplastu. Kromě toho byla prokázána shodnost mezi antigenními epitopy *C. muris* a čeledi Monocystidae, patřící do gregarin (Bull et al. 1998). Na základě analýz malé podjednotky rRNA a výše popsaných znaků byla prokázána teorie divergence rodu *Cryptosporidium* spolu s gregarinami od společného předka a jejich evoluční vzdálenost od skupiny kokcidií (Cavalier-Smith 2014; Chalmers et Katzer 2013). Současné taxonomické zařazení rodu *Cryptosporidium*:

Kmen: Chromalveolata

Podkmen: Výtrusovci (Apicomplexa)

Třída: Conoidasida

Podtřída: Kokcidie (Coccidiasina)

Řád: Eucoccidiorida

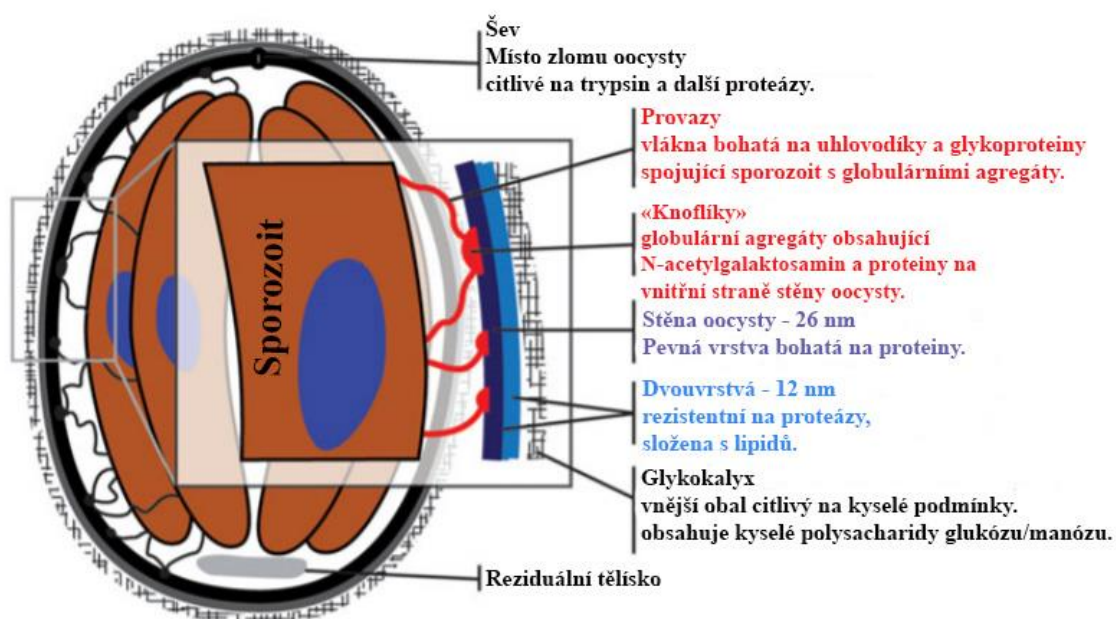
Podřád: Eimeriorina

Čeleď: Cryptosporidiae

Rod: *Cryptosporidium*

## 2.1.3. Morfologie a vývojový cyklus kryptosporidií

### 2.1.3.1. Morfologie



**Obrázek 1.** Složení oocysty *C. parvum*, upraveno podle Lendner et Dauschies (2017).

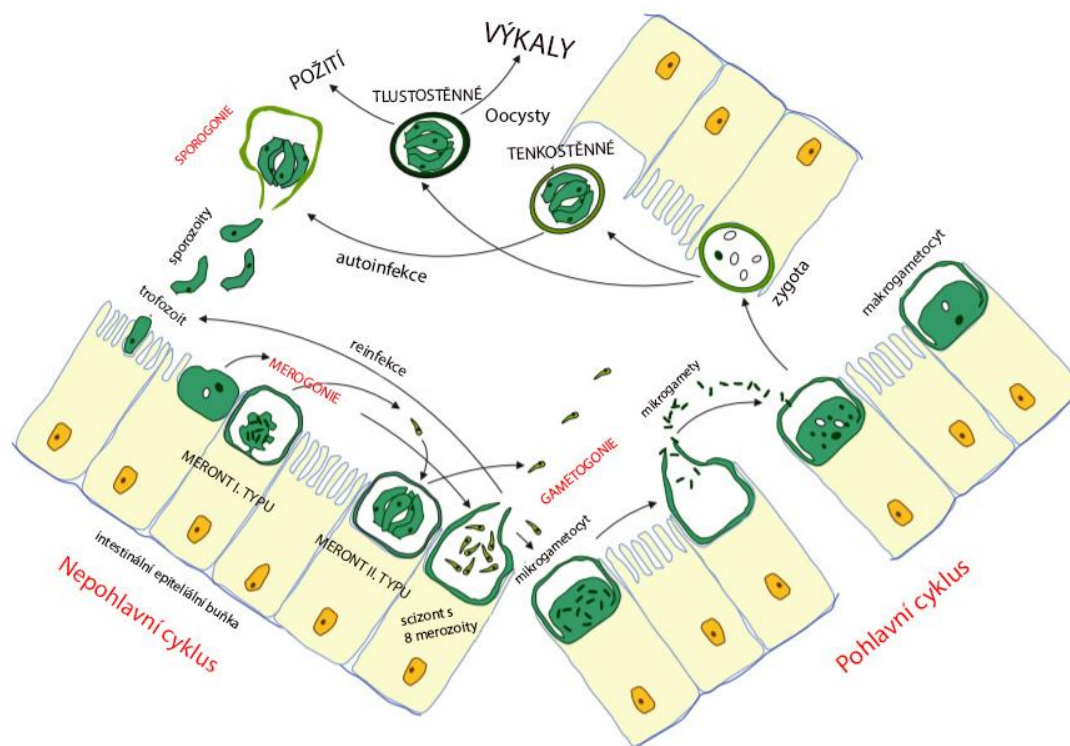
Stěna oocysty *C. parvum* je trojvrstevná (obrázek 1). Oocysta je pokryta glykokalyxem, který je schopen změny elektroforetické mobility v závislosti na prostředí a je imunogenní. Vysoká odolnost oocysty je zajištěna hydrofobní lipidovou dvojitou vrstvou a vrstvou bohatou na proteiny, která poskytuje mechanickou odolnost. Centrální obal buněčné stěny se skládá z glykolipido-lipoproteinové vrstvy. Vnitřní obal se skládá z glykoproteinových vláken poskytující stěně pružnost a pevnost a slouží k připojení sporozoitů ke stěně oocysty. Tenkostěnné oocysty se liší v tom, že jejich stěna neobsahuje vnitřní obal (Ditrich et al. 2005; Fayer et Xiao 2008; Lendner et Dauschies 2017).

**Tabulka 1.** Rozlišovací znaky jednotlivých stádií *C. parvum*, upraveno podle Borowski et al. (2009)

Čas (hod)	Stadia	Rozměr	Morfologické odlišnosti
0	Oocysta	5 × 7 μm	Oválná, hladký povrch se šterbinou pro uvolnění sporozoitu
> 24	Excystovaná oocysta	5 × 7 μm	Perforovaný povrch
> 3	Sporozoit	5 × 0,5 μm	Hrubý povrch, špičatá apikální oblast (elongovaná v blízkosti hostitelských buněk)
> 6	Raný trofozoit	< 1 μm	Hladký povrch tvořený apikální membránou hostitelské buňky
> 24	Trofozoit	2,5 μm	Epicelulární, hladký povrch, přítomnost feeder-organely, cytoplazmatická granule
> 24	Shluk trofozoitů	—	Sloučení apikálních membrán obklopujících jednotlivé parazity
> 24	Meront 1. typu	1,5 μm	Epicelulární, hladký povrch
> 24	Merozoit 1. typu	0,4 × 1 μm	Tyčinkový tvar, špičatá apikální oblast, drsný povrch
> 72	Meront 2. typu	3,5 μm	Epicelulární, hladká silná membrána
> 72	Merozoit 2. typu	0,5-1 μm	Kulatý drsný povrch
> 96	Mikrogamont	2 × 2 μm	Extracelulární, hustě obalené mikrogametami
> 96	Mikrogameta	0,1 μm	Sférický drsný povrch
> 96	Makrogamont	4 × 5 μm	Extracelulární, drsný povrch
48	Extracelulární trofozoit	2 μm	Formy v mateřské fázi, drsný povrch
96	Extracelulární meront	< 2 μm	Kulatý, extracelulární shromáždění trofozoitů

### 2.1.3.2. Vývojový cyklus

Celý vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní – probíhá pouze v jednom hostiteli. Jednotlivé vývojové fáze jsou znázorněné na obrázku 2 a popsány v tabulce 1. U střevních druhů cyklus trvá 12 – 14 hodin a zahrnuje 5 fází.



**Obrázek 2.** Vývojový cyklus *C. parvum*, upraveno podle Cacciò et Putignani (2014)

## **Excystace**

Excystace představuje složitý fyziologický proces zahrnující spuštění kombinačních kaskád působením kyselého pH (žaludeční druhy) nebo mírně alkalického pH (střevní druhy), vhodné teploty, žlučových solí a proteolytických enzymů: serinových a cysteinových endopeptidáz a aminopeptidáz, které degradují proteinovou vrstvu stěny oocysty, většinou v oblasti švu, což vede k prasknutí struktury a vypouštění sporozoitů do lumenu střeva (Ditrich et al. 2005). Rozdíly mezi žaludečními a střevními druhy, kromě místa přichycení sporozoitů, jsou dále ve výrazně menších rozměrech oocyst střevních druhů ve srovnání s žaludečními a také v rychlosti průběhu excystace: druhy s afinitou k žaludečnímu epitelu rychleji uvolňují sporozoity při vystavení tělesné teplotě a kyselému prostředí žaludku, zatímco uvolnění střevních druhů probíhá komplikovanějším způsobem, protože oocysta musí procházet skrz žaludek a dosáhnout duodena před excystací (Fayer et Xiao 2008).

### **Připojení sporozoitů a tvorba parazitoforní vakuoly**

Druhá fáze začíná pohybem sporozoitů apikálním směrem k epitelovým buňkám a následuje přichycení. Pro invazní účely využívají sporozoiti specifickou organelu, apikální komplex, která se skládá ze sekretorických váčků – mikronem, rhoptrií a denzních granul. Při adhezi na povrch buňky je parazit otáčen apikálním směrem do epitelu a je schopen zajistit procesy pro úspěšnou internalizaci (Tomley et Soldati 2001). Po tom následuje tvorba parazitoforní vakuoly: sporozoit indukuje aktinovou polymerizaci pomocí buněčného proteinového komplexu Arp2/3 a následkem toho je vakuola hluboce invaginovaná a izolovaná od lumen střeva a zároveň i od cytoplazmy hostitele (Elliott et al. 2014). Během připojení se sporozoit mění na sférický trofozoit, který je schopen se nepohlavně množit.

### **Nepohlavní dělení (merogonie)**

Merogonie je charakterizována dělením jádra trofozoitů a jejich rozpadem na meronty. Většina druhů kryptosporidií tvoří 2 typy merontů lišících se počtem, velikostí merozoitů a také schopností zahájení pohlavního rozmnožování. Meronty typu I obsahují 6 – 8 jader, ze kterých se po dozrání vyvíjí merozoiti infikující epitelální buňky, a tím pokračuje asexuální cyklus. Během následujících generací merogonie mohou vzniknout meronty typu I, nebo morfologicky odlišné meronty typu II obsahující pouze 4 merozoity (Chroust et al. 1998). Vyjimku představuje pro ptáky infekční druh, *Cryptosporidium baileyi*, produkující 3 typy merontů (Current et al. 1986).

## **Pohlavní rozmnožování (gametogonie)**

Pouze merozoiti vzniklí z merontů typu II jsou schopni se měnit v pohlavní stádia – samčí mnohjaderné mikrogamonty a samičí makrogamonty pouze s jedním jádrem. Jaderné dělení v mikrogamontu dává vzniknout mikrogametám a makrogamonty se vyvíjí v makrogamety. Uvolněné mikrogamety penetrují cytoplazmu makrogametocytů, přeměněných makrogamontů, rozmístěných na povrchu hostitelských buněk a zároveň předávají genetickou informaci. Při úspěšné konjugaci vznikají zygoty, které následně prochází fází sporogonie (Fayer et Xiao 2008).

## **Endogenní sporulace (sporogonie)**

Při sporogonii se zygoty mění v oocysty obsahující 4 sporozoity – každý má haploidní jádro s 8 chromozomy. Většina oocyst, přibližně 80 % (*C. parvum*), mají tlustou stěnu a opouští tělo hostitele s výkaly (druhy infikující epitel střeva či žaludku) nebo sputem (druhy infikující plicní epitel). Přítomnost tenkostěnných oocyst je prokázána u 20 % z celkového počtu oocyst. Tyto oocysty excystují v těle hostitele a jsou zodpovědné za případy autoinfekce (Aldeyarbi et al. 2016).

### **2.1.4. *Cryptosporidium parvum***

*Cryptosporidium parvum* je monoxenním oportunním parazitem některých savců a člověka. Infekce imunokompetentních pacientů se projevuje akutními nebo chronickými průjmy různé intenzity, současně u imunodeficientních jedinců představuje život ohrožující onemocnění. Druh *C. parvum* je jedním z hlavních původců lidské kryptosporidiózy. Genetická analýza dělí *C. parvum* podle genotypů na 14 platných subtypů: medicínsky a veterinárně významné subtypy představují subtyp IIc neboli antropnotický, zoonotické subtypy IIa a II d a výhradně zvířecí subtyp IIo. Subtyp IIa infikuje skot a člověka, IIc přítomen pouze u člověka, II d infikuje ovce, kozy a člověka (Cacciò et Widmer 2014; Fan et al. 2019).

## **2.2. Kryptosporidióza**

### **2.2.1. Patogenita a virulence**

Kryptosporidie jsou často řazeny k oportunním parazitům. U jedinců s fungující imunitou mají předvídatelný průběh: sporozoiti nejčastěji infikují epitel tenkého či tlustého střeva nebo žaludku. Patologie kryptosporidiózy spočívá v destruktivních změnách střevního epitelu v důsledku přichycení sporozoitů do apikálního povrchu a posléze ztrátou funkcí a normální fyziologie buněk. Závažná infekce vede k přemístění nebo ke ztrátě povrchového epitelu, což vede k atrofii klků, hyperplázii krypt,

způsobuje změny ve funkční anatomii a zprostředkovává zánětlivé reakce, indukované masivní infiltrací imunitních buněk do *lamina propria* a uvnitř epitelu. Tyto změny nevyhnutelně vedou ke zmenšení povrchové plochy mikroklků a v důsledku toho dochází ke zhoršení aktivity disacharidáz a aminopeptidáz na jejich apikální membráně (Ditrich et al. 2005; Farthing 2000).

O skutečnosti, zda jsou kryptosporidie schopny hostitele vůbec infikovat, se rozhoduje v prvních fázích interakce sporozoitů (nebo merozoitů) s hostitelskou buňkou, tedy při adhezi a případné internalizaci. Na obou procesech se podílí řada faktorů souhrnně nazývané determinanty virulence. Jde například o adhezni proteiny (TRAP C-1 a TRAP C-2), sporozoitový protein bohatý na cystein (SCRP), glykoproteiny (CSL a gp900) a specifické lektiny. Po excystaci v lumenu tenkého střeva se sporozoiti rychle dostávají k enterocytům, obalených mucinovou vrstvou, která představuje první obrannou bariéru proti přichycení parazita. Sporozoiti dokáží odolat tomuto mechanismu vylučováním glykoproteinů z apikálního komplexu (výše popsané CSL proteiny, glykoproteiny gp40, cp47, gp15/cp17, GP900, TRAP-C1, Muc4/5), které umožňují přichycení do enterocytů, díky pevným N-glykosylovaným vazbám a dalšímu pohybu po substrátu (Cevallos et al. 2000; Tomley et Soldati 2001). Cysteinové a serinové proteázy a argininová aminopeptidáza se podílejí na internalizaci, ale jsou aktivní již při excystaci. Po adhezi sporozoitů zahajují epiteliální buňky produkci cytokinů, které aktivují rezidentní fagocyty. Ty pak produkují histamin, serotonin, adenosin, prostaglandiny a několik dalších rozpustných faktorů, které v první řadě tlumí zánětlivé procesy ve střevě. Navíc tyto látky jednak zvyšují sekreci vody a chloridové ionty ve střevní sliznici a také inhibují absorpční schopnost střeva. Buňky střevní sliznice jsou tak poškozovány přímo i nepřímo – negativním působením vlastního imunitního systému. Kryptosporidie inhibují apoptotické procesy infikovaných hostitelských buněk prostřednictvím aktivace transkripčního komplexu NF- $\kappa$ B v časném stádiu infekce a zároveň je indukují u okolních neinfikovaných buněk. Tlumení zánětu a ovlivňování apoptózy umožňuje delší přežívání kryptosporidií ve střevní sliznici. Produkce toxinů kryptosporidii je občas předpokládána, ale nebyla dosud jednoznačně prokázána (Cacciò et Widmer 2014; Ditrich et al. 2005).

### **2.2.2. Symptomatika a patologie**

Kryptosporidiosis se projevuje sníženou resorpční schopností střeva, což způsobuje vodnaté průjmy a v patologických případech závažná poškození epitelu tenkého střeva. Infekce probíhá perorálním příjmem oocyst z kontaminované pitné vody, potravin nebo

stolice člověka nebo trusu zvířat. Sporozoiti dokáží *in vitro* vyexcystovat během 15 minut (Forney et al. 1999; Lumb et al. 1988).

Infekce druhem *C. hominis* jsou spojeny s komplikovanějšími infekcemi, o čemž svědčí delší patentní doba a také absence popsaných případů asymptomatického vylučování u testovaných skupin (Chappel et al. 2006). Na druhou stranu, intenzivnější vylučování oocyst je zaznamenáno u osob infikovaných právě *C. parvum*, ale nikoli *C. hominis* (Bushen et al. 2007). Kromě průjmů se v různé míře přidávají další příznaky: kolikové bolesti břicha, nauzea, vomitus, flatulence, zvýšená teplota, nechutenství až anorexie a váhový úbytek často i několik měsíců po infekci způsobenou druhem *C. parvum* nebo *C. hominis*. Nemoci nesouvisející s gastrointestinálními poruchami se projevují primárně po infekci *C. hominis* a nejčastěji to jsou opakující se bolesti hlavy, očí, vertigo a vzácně může infekce způsobit autoimunní onemocnění, například reaktivní arthropatie (Hunter et al. 2004; Shepherd et al. 1989).

Stupeň manifestace onemocnění záleží na věku, pohlaví, stavu imunitního systému, okolní populaci a zemi pobytu. Průběh a symptomatika onemocnění se klasifikuje do následujících typů:

- 1) Míra projevu je labilní v závislosti na stavu imunity a zdraví jedinců, liší se od asymptomatického průběhu až po závažné průjmy pozorované u imunokompetentních pacientů. Po krátké prepatentní periodě (4 – 6 dní, při vysoké infekční dávce oocyst 3 dny), nastupuje patentní perioda (6 – 18 dní); období vodnatých průjmů je o něco kratší (4 – 10 dní v typických případech), dochází k samovolnému vyléčení a k zastavení vylučování oocyst. U starších lidí dochází ke zkrácení střední prepatentní doby na 1 – 2 dny ve srovnání s dospělými a dětmi (Kváč et al. 2005; Naumova et al. 2003).
- 2) Přetrvávající průjem, který nejčastěji postihuje děti v rozvojových zemích a může být spojen s nedostatkem výživy a zdravotní péče. Období první nákazy se pohybuje v rozmezí  $12 \pm 7$  měsíců. Kryptosporidíóza probíhá se stabilním vylučováním oocyst po dobu více než 2 týdny, zvláště u dětí mladších 2 let (Agnamey et al. 2010).
- 3) Chronické průjmy, které se nejčastěji vyskytují u osob s imunodeficiencí s prokázaným stálým nálezem oocyst ve stolici během minimálně 30 dnů. Rozdílly se projevují již na buněčné úrovni: v mnohem větší míře je kolem infikovaných buněk pozorována zánětlivá infiltrace. Patentní perioda se prodlužuje na mnoho týdnů i měsíců a v této době se střídají průjmová období s relativně klidnými fázemi, kdy jsou kryptosporidie přítomny ve formované stolici. Onemocnění je chronické a nejeví tendenci k samovolnému vyléčení,



naopak často diseminuje do dalších orgánů. V první řadě se šíří do dalších úseků zažívacího traktu, směrem kraniálním (duodenum, žaludek, jícen) i kaudálním (caecum, kolon, rectum). Dále postihuje sliznice žlučových, vývody pankreatu a dýchací trakt. Průběh onemocnění závisí na stupni imunodeficience, u těžkých případů, například u pacientů s rozvinutým AIDS (počet CD4+ lymfocytů  $\leq 200$  v  $1 \text{ mm}^3$  krve) dochází ke generalizaci a ke smrti následkem metabolického rozvratu a ztrátě tělesných tekutin přes 10 l/den (Ditrich et al. 2005; Ma et Soave 1983).

### **2.2.1. Terapie kryptosporidiózy**

V současnosti neexistuje univerzální léčba proti kryptosporidióze. Ve Spojených státech je lék nitazoxanid (s účinnou látkou tizoxanid, podávaný ve formě kapek a tablet) schválen k léčbě průjmů u imunokompetentních dětí ve věku od 1 roku do 11 let, způsobených parazity rodu *Cryptosporidium* a *Giardia*, avšak účinnost nitazoxanidu je u imunodeficientních pacientů nejasná. U HIV-pozitivních dětí se používají hlavně antiretrovirální léčiva v kombinaci s inhibitory proteáz (IP), díky schopnosti IP narušovat funkci enzymů parazita. Ostatní testovaná léčiva proti kryptosporidióze zahrnují azithromycin, spiramycin, paromomycin a bovinní antikryptosporidiové imunoglobuliny – jejichž účinek nebyl dostatečně vyzkoušen nebo byla prokázána velmi slabá schopnost snižování množství vylučovaných oocyst u HIV-pozitivních pacientů (Sparks et al. 2015; Checkley et al. 2015). Důležitým trendem je postupně snižující se incidence nálezů kryptosporidií u HIV-pozitivních jedinců, hlavně mužů: výskyt kryptosporidiózy u mužů infikovaných HIV se od zavedení vysoce aktivní antiretrovirální terapie (Highly active antiretroviral therapy – HAART) výrazně snížil a poklesl pod hodnoty prevalence u žen (Painter et al. 2016). Symptomatická léčba kryptosporidiózy zahrnuje vhodnou dietu a konstantní doplňování tělesných tekutin perorálně či pomocí infuze (Jíra 2009).

## **2.3. Epidemiologie a prevalence kryptosporidií**

### **2.3.1. Epidemiologie**

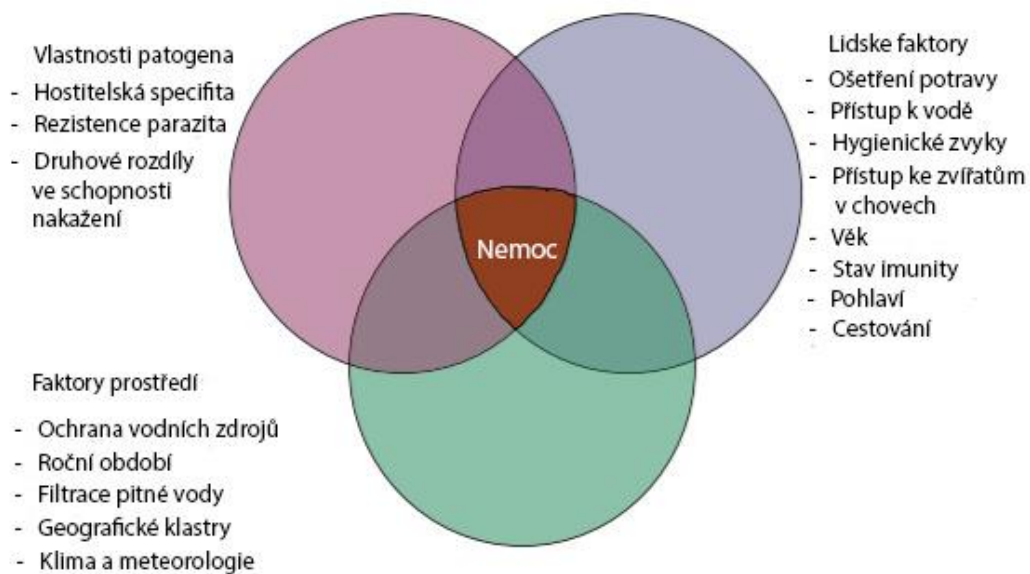
Důležitými faktory potenciálního nebezpečí kryptosporidiózy jsou obrovská rychlost rozšíření nákazy mezi lidmi nebo zvířaty v chovech a vysoký poměr morbidity. Pro druh *Cryptosporidium parvum* je 50% infekční dávka 132 oocyst a pro druh *C. hominis* od 10 do 83 oocyst (Chappell et al. 2006; DuPont et al. 1995). Způsoby přenosu kryptosporidií se dělí na přímé a nepřímé. Přímá cesta přenosu zahrnuje fekálně-orální přenos oocyst mezi lidmi (antroponóza) nebo ze zvířete na člověka (zoonóza). Hlavní cesta nepřímého přenosu se děje prostřednictvím kontaminované vody a potravy. V Evropě byl prokázán sezónní výskyt kryptosporidiózy, zvýšený výskyt infekce byl

zaznamenán zejména během pozdního jara a pozdního léta i začátku podzimu (Cacciò et Chalmers 2016).

Potenciálně patogenními druhy pro člověka jsou *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei*, *C. occultus* a *Cryptosporidium* horse genotype a *Cryptosporidium* skunk genotype (Ryan et al. 2014). Největší množství, více než 90 % lidských nákaz, je způsobeno druhy *C. parvum* a *C. hominis* (Xiao 2009). Globální studie původců průjmových onemocnění u dětí naznačily, že paraziti rodu *Cryptosporidium* jsou po rotaviru druhým nejrozšířenějším průjmovým patogenem v rozvojových státech (Kotloff et al. 2013). Za endemické zóny *C. hominis* jsou považovány městské oblasti s vyšším socioekonomickým statusem a vysokou úrovní urbanizace, naproti tomu zemědělské oblasti využívající přírodní vodní zdroje představují typické endemické zóny *C. parvum* (Lake et al. 2007). Epidemiologické analýzy ukázaly, že převaha nákaz druhem *C. hominis* byla pozorována u populace v rozvojových zemích, například testované skupiny dětí z Peru a Keňi v Severní a Jižní Americe, Africe, Austrálii (Gatei et al. 2006; Xiao et al. 2001), zatímco druh *C. parvum* způsobuje více infekcí u lidí v Evropě, zejména ve Velké Británii (Cacciò et al. 2005). V poslední době je pozorován nárůst nákaz druhem *C. meleagridis*, který je zodpovědný za 1 % všech infekcí v Anglii (Cacciò et al. 2005). V zemích Jižní Ameriky se hodnota prevalence *C. meleagridis* blíží hodnotám prevalence *C. hominis* (Cama et al. 2008).

Hlavní prvky, které jsou zodpovědné za vznik infekce: kontakt s infikovanou osobou, infikované dítě 2 – 11 let, kontakt s hospodářskými zvířaty, špatná hygiena a životní podmínky, nedostatek filtrované vody a problémy spojené s likvidací fekálního odpadu, cestování do endemických oblastí a požití kontaminované vody nebo jídla.

Krátké shrnutí hlavních epidemiologických faktorů, zodpovědných za vznik a šíření kryptosporidiózy, je znázorněno na obrázku 3.



**Obrázek 3.** Epidemiologické faktory ovlivňující rozšíření kryptosporidiózy, upraveno podle Putignani et Menichella (2010)

### **Kryptosporidióza u imunokompromitovaných pacientů**

Kromě HIV-pozitivních jedinců představují rizikovou skupinu pacienti po transplantaci orgánů, lidé podstupující imunosupresivní léčbu nebo lidé s deficitem imunoglobulinu A nebo hypogamaglobulinémií (Bhadoria et al. 2015). Kryptosporidióza je zodpovědná za 5 – 40 % případů klinického průjmu u HIV-pozitivních jedinců. Rozdíly v prevalenci kryptosporidiózy u HIV-pozitivních pacientů trpících průjmem se liší v závislosti na geografických podmínkách, použití antiretrovirové terapie a stupni imunosuprese. Na rozdíl od imunokompetentních pacientů jsou HIV-pozitivní jedinci více náchylní k nakažení druhu *C. suis*, *C. felis* a *C. meleagridis* (Wanyiri et al. 2014).

Význam sexuálního chování jako rizikového faktoru zejména pro imunodeficientní pacienty byl rovněž popsán ve velké studii v USA (16 953 testovaných HIV-pozitivních pacientů), kde byla prevalence kryptosporidiózy vyšší u osob, u nichž bylo podezření na expozici HIV prostřednictvím pohlavního styku (3,9 %) než u osob nakažených HIV jinými způsoby (2,6 %) (Sorvillo et al. 1994).

### **2.3.2. Prevalence a promořenost**

#### **Evropa**

Sledování a vyhodnocování výskytu lidské kryptosporidiózy v Evropě představuje složitější úkol kvůli nedostačujícímu povědomí zdravotního systému z hlediska role kryptosporidií způsobujících střevní nemoci (Cacciò et Chalmers 2016).

#### **Česká republika**

Během 22 let, od roku 1994 až po rok 2015, bylo laboratorně potvrzeno 109 případů kryptosporidiózy. Podle Kožíška et al. (2005) jsou některé ze symptomatických případů kryptosporidiózy klasifikovány jako průjem a akutní gastroenteritida neznámého infekčního původu (diagnóza A09 ICD-10) a z tohoto důvodu nebyly hlášeny jako kryptosporidióza. Hlavní symptomy nakažených zahrnovaly hlavně komplikace střevního traktu (Kvác et al. 2016). Séroprevalence obyvatelů České republiky, podle průzkumu Kožíška et al. (2007) se pohybuje v rozmezí 67 – 72 % (200 testovaných sér), mezi HIV-pozitivními jedinci pouze 10,71 % vykazovaly vysoké titry antikryptosporidiových protilátek (Pospíšilová et al. 1998). Státní zdravotní ústav informuje o běžném výskytu oocyst v povrchových a povrchovými vodami ovlivněných vodách, kde jsou jejich zdrojem domácí i volně žijící zvířata a také nedostatečná kontrola kvality filtrace (Pumann et Šašek 2004).

#### **Ukrajina**

Hlavní zdroje informací ohledně kryptosporidiózy na Ukrajině je soustředěn v nepublikovaném sedmiletém průzkumu (2001 – 2007) z Univerzity veterinární medicíny a biotechnologií ve Lvově. Ve studii se uvádí celkový počet vyšetřených pacientů dosahující hodnot více než 1 500 vzorků. Kromě toho existuje hodnocení prevalence kryptosporidií u imunokompetentních (889 vzorků stolice) a HIV-pozitivních pacientů (189 vzorků), které bylo provedeno na oddělení infekčních onemocnění v nemocnici města Kryvyj Rih. Zde byly oocysty detekovány ve vzorcích u 24,6 % imunokompetentních a 12,4 % HIV-pozitivních pacientů. Kvantitativní a druhová identifikace parazita ve vzorcích je znemožněna kvůli tomu, že jedinou metodou při detekci kryptosporidií na Ukrajině je barvení mikroskopických preparátů, hlavně modifikovanou Ziehl-Neelsenovou metodou. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 4.



**Obrázek 4.** Prevalence kryptosporidií na vybraných oblastí Ukrajiny, upraveno podle Pokhil et al. (2016)

### Jižní Amerika

Práce týkající se kryptosporidiózy z Jižní Ameriky jsou poměrně vzácné a výsledky pochází hlavně ze severních států. Mezi autory převládá hypotéza, že osoby v rozvojových zemích jsou už během dětství často vystaveny druhu *C. parvum* (Kuhls et al. 1994). Ungar et al. (1988) ukázali, že 20 % ekvádorských dětí s průměrem bylo séropozitivní na IgM a IgG specifické pro *C. parvum*. Podle dalších výsledků Ungar et al. (1988) uvádí séropozitivitu proti *C. parvum* u dětí do 2 let věku z Peru (389 vzorků) a Venezuely (84) v hodnotě 19,8 % a 15,5 %. Mezi HIV-pozitivními pacienty (354 pozitivních z celkového počtu 2672) v Peru byly detekovány následující druhy: *Cryptosporidium hominis* (u 67,5 %), *C. meleagridis* (12,6 %), *C. parvum* (11,3 %), *C. canis* (4,0 %), *C. felis* (3,3 %) a *C. suis* (0,5 %) (Ditrich et al. 2005).

### Afrika

Squire et Ryan (2017) publikovali velmi rozsáhlé shrnutí provedeného výzkumu prevalence kryptosporidií ve většině Afrických států. Za sedmileté období bylo celkem detekováno 13 genotypů kryptosporidií, kdy nejčastěji vyskytujícím se druhem byl *C. hominis*. Pro diagnostiku byly použité jak molekulární metody, tak ELISA kity. Hodnota prevalence se u provedených studií liší, zpravidla rizikovou skupinu představují

děti do 5 let (20 – 60 % prevalence), přičemž děti trpící imunodeficiencí mají třikrát až osmnáctkrát vyšší pravděpodobnost výskytu protilátek proti kryptosporidiím. Mezi jedinci ve věku 15 – 80 let se hodnota prevalence pohybuje v širokém rozmezí od 2 do 23 %. Mezi HIV-pozitivními pacienty je ve většině zemí podíl pozitivních jedinců výrazně menší (2 – 9 %), výjimku představuje Jihoafrická republika, kde prevalence imunodeficientních pacientů dosahuje 46 % (detekce pomocí qPCR, PCR, Ziehl-Neelsenovo barvení, immunoassay) a Keňa s prevalencí 34,1 % (immunoassay a PCR) (Squire et Ryan 2017; Wanyiri et al. 2014).

## **Asie**

Práce Mahmoudi et al. (2017) je soustředěna na statistické zpracování článků o kryptosporidiích a kryptosporidióze ve 37 zemích pevninské oblasti Asie. Výsledky z celkového počtu článků (744) naznačují, že střední hodnota prevalence se pohybuje v rozmezí 3 – 15 % s výrazně zvýšeným počtem nálezů ve východní Asii (Japonsko, Jižní Korea), kde se prevalence pohybuje až okolo 57 %. Nejčastěji se u pacientů vyskytují druhy *C. hominis* a *C. parvum*. Ostatní druhy (*C. felis*, *C. muris*, *C. meleagridis* a *C. suis*) byly hlášeny také, avšak s nízkou frekvencí a nálezem hlavně u imunodeficientních jedinců (buď u HIV-pozitivních nebo u pacientů po transplantaci orgánů).

## **Austrálie**

V Austrálii je kryptosporidióza onemocnění podléhající povinnému hlášení, statistika k dnešnímu dni naznačuje, že *C. hominis* je převládajícím druhem infikujícím lidi, s výjimkou Jižní Austrálie, kde je pozorována vyšší prevalence *C. parvum* (Ng et al. 2010). Ohniska kryptosporidiózy v Austrálii byla spojena převážně s kontaminovanými rekreačními vodami a se stykem se zvířaty v mateřské školce, a několika dalšími, pro které nebyla příčina známa (Ng-Hublin et al. 2018). V roce 2019 bylo hlášeno 211 případů kryptosporidiózy, což bylo páté nejčastější střevní onemocnění (7 případů na 100 000 obyvatel), přičemž výskyt kryptosporidiózy u žen v roce 2019 byl o 31 % vyšší než u mužů (8,5 proti 6,5 případů na 100 000 obyvatel) (OzFoodNet 2019). Bohužel zatím v Austrálii neexistují žádné články o séroprevalenci kryptosporidiózy.

## **2.4. Imunitní odpověď hostitele na kryptosporidiovou infekci**

### **2.4.1. Složky vrozené imunity**

Hlavními jednotkami přirozené imunity jsou makrofágy, dendritické buňky, NK buňky (Natural Killer cells), granulocyty, antimikrobiální peptidy, chemokiny, cytokiny, prostaglandiny, komplementový systém a epitelové buňky. Faktory vrozené imunity hrají

signalizační roli a nahlašují antigen prezentujícím buňkám a jsou schopny za velmi krátkou dobu zničit cizorodé buňky (Hořejší et Bartůňková 2017).

### **Epiteliální buňky**

Jako detekční mechanismus mají enterocyty na svém povrchu pattern recognition receptory (PRR), které rozpoznávají charakteristické PAMP (pathogen-associated molecular patterns) a spouštějí transkripci prozánětlivých genů – převážně pomocí jaderného transkripčního systému NF- $\kappa$ B. Při fyzickém setkání s antigenem, epitelové buňky produkují antimikrobiální peptidy, interferony typu I, oxid dusnatý (NO) – látky, které jsou schopné zničit nebo alespoň inhibovat růst parazita. Spolu s tím sekretují prozánětlivé cytokiny: IL-15 a IL-8. Interleukin-15 je aktivátorem NK,  $\gamma\delta$ -T lymfocytů, indukuje chemokinovou sekreci pomocí neutrofilů a monocytů a propaguje fagocytózu nakažených buněk (Dann et al. 2005). Důležitá je schopnost enterocytů produkovat mucinové glykoproteiny, schopné přímého zásahu a tlumení připojení sporozoitů (Cevallos et al. 2000).

Mechanismus apoptózy epitelových buněk při setkání se sporozoitů *C. parvum* je v současné době intenzivně zkoumán. Studie *in vitro* prokázaly, že část buněk podléhá apoptóze brzy po invazi sporozoitů. Během několika hodin však infikované buňky spouštějí transkripci antiapoptotických genů, což umožňuje parazitům dokončit první generaci merogonie (Liu et al. 2009).

### **Interferony typu I**

Barakat et al. (2009) popisují vlastnost dendritických buněk kostní dřeně a enterocytů produkovat IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ , patřících do skupiny interferonů typu I. Sekretované IFN typu I prokázaly schopnost inhibice růstu intracelulárních stádií *C. parvum* nezávisle na aktivitě a množství IFN- $\gamma$ , v důsledku toho lze zabraňovat parazitární invazi a vývoji (Barakat et al. 2009).

### **Antimikrobiální peptidy**

Antimikrobiální peptidy (AMP) jsou krátké polypeptidy (<100 aminokyselin), které mají protiparazitární a imunomodulační vlastnosti. AMP, které jsou exprimovány a vylučovány epiteliálními buňkami střeva, zahrnují  $\alpha$ -,  $\beta$ -defensiny a katelicidiny. Existuje šest lidských  $\beta$ -defensinů (HBD), z nichž je HBD-1 konstitutivně exprimován a HBD-2, HBD-3 a HBD-4 jsou exprimovány jenom během infekce či zánětu. Studie *in vitro* na lidských střevních epiteliálních buňkách prokázaly, že na začátku infekce *C. parvum*

působí snížením produkce HBD-1, což v důsledku umožňuje přežití parazitů. Infekce však také indukuje expresi a sekreci protiparazitárních HBD-2 s funkcí atraktantů dendritických buněk a T lymfocytů (Borad et Ward 2010).

### **Nk buňky**

NK buňky funkčně produkují cytokiny, nejpočetnější z nich jsou interferon gama (INF $\gamma$ ), interleukin 12 (IL-12) a tumor necrosis factory alpha a beta (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ). TNF $\beta$  efektivně poškozují cizorodé buňky a dokáže aktivovat antigen prezentující buňky (APC), například makrofágy a dendritické buňky z klků střevní mukózy. Cytotoxická povaha NK buněk spočívá v detekci snížené exprese MHC I na povrchu nakažené buňky a následné sekreci toxických proteinů (granzimů a perforinů).

### **Exosomy**

Exosomální vesikuly hrají důležitou roli v udržování homeostázy, při vývoji organismu a v obraně proti patogenům (Théry 2011). Exosomální struktury jsou sekretovány retikulocyty, neurálními, epitelovými a také nádorovými buňkami. Při setkání s *C. parvum* se exosomy na něj navazují a snaží se poškodit parazita pomocí antimikrobiálních peptidů (například HBD-2). Nejvíce citlivé vůči působení exosomů jsou extracelulární stádia: mikrogametocyty, sporozoiti a merozoiti (Hu et al. 2014).

### **Antigen prezentující buňky (APC)**

K nejdůležitějším APC patří dendritické buňky, makrofágy a Langerhansovy buňky. APC vystavují cizorodé peptidy na svém povrchu pomocí molekul hlavního histokompatibilního komplexu druhé třídy (MHC II) a současně při jejich aktivaci NK buňkami sekretují další cytokiny (IL-1 $\beta$ , IL-12). Po aktivaci APC začíná diferenciace pomocných T lymfocytů buď v podtyp 1 (T<sub>h1</sub>) nebo 2 (T<sub>h2</sub>). Lymfocyty T<sub>h1</sub> propagují cytotoxickou imunitní odpověď vylučováním příslušných cytokinů (IL-12, IFN- $\gamma$  a TNF $\alpha$ ). Lymfocyty T<sub>h2</sub> jsou zodpovědní za protilátkovou imunitní odpověď: sekretují IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13, které napomáhají v diferenciaci plazmatických B lymfocytů a indukují přesmyk IgM protilátek na ostatní izotypy (IgD, IgG, IgE) (Hořejší et Bartůňková 2017; Owen et al. 2018)

### **Komplement**

Role komplementových proteinů během kryptosporidie není dostatečně prozkoumána. Existují studie na myších modelech, ve kterých je zaznamenána účinnost klasické a lektinové dráhy aktivace komplementu: manan vázající lektin (MBL) je



schopen adheze na povrch sporozoitů a blokace připojení sporozoita na epitel, spolu s tím současně indukuje tvorbu a rozmístění C3b proteinové složky a terminálního komplementového komplexu na povrch parazita (Fayer et Xiao 2008; Kelly et al. 2000).

### **Prostaglandiny**

Prostaglandiny patří do skupiny eikosanoidů – derivátů kyseliny arachidonové a některých nenasyčených dvacetihlíkatých mastných kyselin (Berg et al. 2015). Během infekce střevní buňky sekretují zvýšené množství prostaglandinů E2 (PGE2) a F2 (PGF2), působením PGE2 a PGF2 dochází k produkci HBD antimikrobiálních peptidů a snížení produkce zánětlivých cytokinů. Kromě toho, působením prostaglandinů je upregulována sekrece mucinu z epitelových buněk, což zpomaluje rychlost připojení sporozoitů k epitelovým buňkám (Laurent et al. 1998).

### **2.4.2. Složky adaptivní imunity**

Účinnost adaptivní imunity závisí hlavně na příjmu signálů CD4+ T lymfocytů neboli T<sub>h</sub> (pomocných T lymfocytů) a dále na intenzivní tvorbě, vývoji a diferenciaci T a B lymfocytů do aktivních forem.

### **Adaptivní buněčná imunita**

Obranné schopnosti hostitele závisí nejvíce na signalizačních a cytotoxických vlastnostech T lymfocytů, zejména na populaci CD4+ a v menší míře CD8+. CD8+ jsou schopné samostatné indukce nebo se aktivují při získání signálů od CD4+ a uplatňují se, na rozdíl od CD4+, hlavně při reinfekci. T lymfocyty se aktivují, pokud jsou ve styku s APC, například s dendritickými buňkami a makrofágy a hlavně organizují povahu adaptivní imunity. T lymfocyty regulují proliferaci a diferenciaci B lymfocytů na paměťové a plazmatické buňky (Cacciò et Widmer 2014). Důkazem důležitosti T<sub>h</sub> jako obranných složek jsou obtížné průběhy infekce u pacientů s oslabenou imunitou (s celkovým počtem T<sub>h</sub> <50 buněk/mm<sup>3</sup> krve) nebo stejně tak i u imunodeficitních myší SCID kmenů (Heine et al. 1984).

### **T<sub>h1</sub> odpověď**

Látky produkované T<sub>h1</sub> lymfocyty jsou především zaměřeny na buněčnou cytotoxicitu prostřednictvím APC. T<sub>h1</sub> je nejúčinnějším mechanismem kontroly a likvidace intracelulárních stádií. Hlavním cytokinem je IL-2, který spouští proliferaci T<sub>h</sub> i T<sub>c</sub> lymfocytů. V T<sub>h1</sub> reakci IL-12 řídí T lymfocyty k produkci IFN-γ – látky zodpovědné za indukci MHC II receptorů na povrchu APC a následnou eliminaci intracelulárních patogenů. IL-12 se projevuje nejvíce při opakovaném setkání s parazitem. Produkce IFN-

$\gamma$  představuje důležitou součást adaptivní odpovědi a rezistence k reinfekci u dříve exponovaných imunokompetentních jedinců, kdy u většiny séropozitivních pacientů byla pozorovaná exprese IFN- $\gamma^+$  na povrchu buněk sliznice (Riggs 2002). Na druhou stranu, zvýšená sekrece IL-15 pozitivně koreluje u pacientů, kteří nebyli dříve vystaveni infekci *C. parvum*. Exprese IL-15 je spojena s ukončením primární infekce a zastavením vylučování oocyst u pacientů, kteří neexprimovali IFN- $\gamma$  (Robinson et al. 2001).

### **Adaptivní humorální imunita**

Protilátková odpověď představuje intenzivně zkoumaný obranný mechanismus proti kryptosporidiióze. Přítomnost imunoglobulinů proti kryptosporidiím není hlavním nástrojem eliminace parazita, nemusí nutně korelovat s aktivní infekcí, ale naznačuje, že jedinec byl infikován parazity rodu *Cryptosporidium* v určitém období života. Protilátky se objevují ve střevních tkáních, krvi a mukoze. Během infekce *C. parvum* jsou syntetizovány hlavně IgM, IgA a IgG druhy protilátek, přičemž schopnost IgA cestovat přes tkáň a obklopovat infekční stádia zabraňuje připojení patogenů k epiteliálním buňkám, zároveň napomáhá APC a kromě toho hraje roli v aktivaci komplementu. Přesto práce na myších modelech s deficientními B lymfocyty ukázaly slabou korelaci mezi přítomností protilátek v organismu a závažností infekce. Za nejvhodnější vysvětlení autoři považují zaměření protilátkové odpovědi hlavně na volně vystavená extracelulární stádia cizorodého organismu (Chen et al. 2003; Taghi-Kilani et al. 1990).

### **T<sub>h2</sub> odpověď**

Hlavní funkcí T<sub>h2</sub> populací je aktivace humorální protilátkové imunity. T<sub>h2</sub> buňky produkují různorodé cytokiny, například IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 a IL-13, které pomáhají v indukci složek humorální imunity. IL-5 inhibuje množení parazita, IL-13 má protizánětlivé účinky, IL-4 zvyšuje produkci MHC II receptorů a naopak inhibuje diferenciaci T<sub>h1</sub> buněk, makrofágů, dendritických buněk a produkci IFN- $\gamma$  (Fayer et Xiao 2008; Wynn 2003).

### **Paměťové T-lymfocyty**

Získaná rezistence vůči kryptosporidiióze u lidí je ve větší míře závislá na  $\alpha\beta$  T lymfocytech. Role paměťových T lymfocytů spočívá v urychlení odpovědi během reinfekce hostitele, přestože bylo prokázáno omezené trvání imunologické paměti u myších modelů: v období 30 dnů po vyléčení je myší organismus schopen nejefektivněji podporovat buněčnou a imunitní odpověď, ale po krátké době se paměť T lymfocytů po kryptosporidiové infekci výrazně zeslabuje (Cacciò et Widmer 2014).

## **Nekódující RNA**

Imunitní obrana pomocí nekódující RNA představuje evolučně starší mechanismus, přítomný dokonce i u bezobratlých. Nekódující RNA (ncRNA) vedou každý krok buněčné odpovědi na infekci prostřednictvím regulací vnitrobuněčných signálních kaskád, specificky interagují s jinými buněčnými faktory včetně proteinů, DNA a dalších molekul RNA; jsou přítomné v exosomálních strukturách a zprostředkovávají komunikaci mezi epitelem a imunitními buňkami. Nekódující RNA, zodpovědná za imunitní obranu, se dělí na dlouhou (lncRNA) a krátkou (miRNA) – obě jsou potenciálně důležitými mechanismy imunitního výzkumu. Celkem bylo zatím u lidí identifikováno 1048 zralých miRNA a téměř 3300 lncRNA (Kozomara et Griffiths-Jones 2011; Schonrock et al. 2012).

### **lncRNA**

lncRNA (long non-coding RNA) se obvykle skládají ze sekvence obsahující víc než 200 nukleotidů a mají velmi malou nebo vůbec žádnou translační schopnost. Způsoby působení lncRNA zahrnují kontrolu genové exprese uvnitř úseku genu nebo mezi vzdálenými geny (*cis* a *trans* regulace) prostřednictvím zapojení proteinů nebo molekulárních komplexů do specifických lokusů a interakce s jinými RNA za účelem vyvolávání posttranskripčních regulačních procesů. Genomový screening myšičího modelu v průběhu infekce ukázal aktivní účast určitých lncRNA (například NR\_045064), spolu s epigenetickými modifikátory histonů, v mediaci časných zánětlivých procesů, konkrétně usnadňováním transkripce obranných genů *Nos2* a *Csf2* (*Nos2* – gen zodpovědný za tvorbu oxidu dusnatého, *Csf2* – kolonie stimulující faktor granulocytů/makrofágů) (Chen et al. 2019).

### **miRNA**

miRNA (mikro RNA) jsou malé regulační úseky RNA, které zprostředkovávají buď štěpení mRNA nebo transkripční či posttranskripční regulace větší části savčí mRNA kódující proteiny (Liu et Olson 2010). miRNA se tvoří štěpením pri-miRNA (primární transkript, syntetizován RNA polymerázou II) na drobné úseky do 200 bp (nejčastěji 70 – 100 bp) enzymem Ribonukleázou III. Posttranskripční mechanismus regulace mRNA spočívá v nasedání určitých miRNA na 3'UTR (netranslatované úseky mRNA, lokalizovány upstream od kódující sekvence) a inhibice translačních procesů. Příklady posttranskripčních regulačních miRNA představují miR-221, miR-513, miR-424, miR-503, které jsou zodpovědné za tlumení celé řady prozánětlivých proteinů, způsobujících antimikrobiální či antiparazitické reakce. Kryptosporidie jsou schopné převzít pod vlastní

kontrolu miRNA v hostitelských buňkách a tlumit expresi příslušných cytokinů a chemokinů. Důležitá pro obranu je regulační role miRNA v exosomech (Cacciò et Widmer 2014; Théry 2011).

### **2.4.3. ELISA test**

ELISA neboli enzyme-linked immunosorbent assay (dřívě EIA, enzyme immunoassay) je imunologická metoda sloužící ke kvalitativní a kvantitativní detekci antigenů pomocí konjugovaných protilátek se značeným enzymem (avidin peroxidázou, beta-galaktosidázou nebo alkalickou fosfatázou). Po vytvoření vazby antigenu s enzymem značeným imunním sérem se ke směsi přidává substrát neboli chromogen. Substrát je štěpen enzymem a dochází ke změně barvy reakčního produktu – intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu navázaných molekul antigenu a protilátky. ELISA se používá k diagnostice virových, bakteriálních a parazitárních onemocnění a ke stanovení hormonů, enzymů, léčiv a jiných biologicky aktivních látek obsažených ve zkoušeném materiálu v malých koncentracích:  $10^{-10}$ – $10^{-12}$  g/l (Hnasko 2015).

#### **Přímá metoda ELISA**

Přímá ELISA je mnohem rychlejší než jiné typy, protože vyžaduje méně kroků. Přímá metoda je méně náchylná k chybám, nepotřebuje velké množství činidel a kroků. I když existují určité nevýhody této metody: imobilizace antigenu není specifická, protože všechny proteiny ve vzorku, včetně cílového antigenu, se budou vázat na dno destičky. Na rozdíl od nepřímé metody se nepoužívá žádná sekundární protilátka a nedochází k amplifikaci signálu, což snižuje citlivost testu (Crowther 2001).

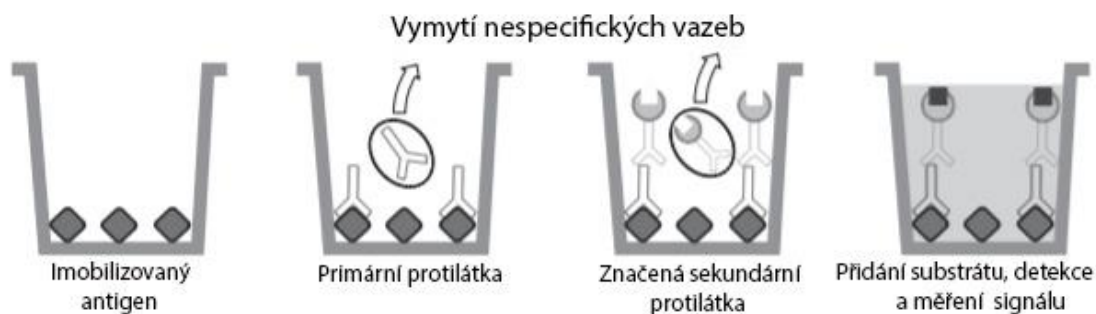
#### **Sendvičová metoda ELISA**

Sendvičové ELISA testy vyžadují použití párovaných protilátek (záchytné a detekční protilátky). Každá protilátka je proto specifická pro vlastní epitop antigenu. Postup pro sendvičovou ELISA metodu nejprve vyžaduje připojení zachytné protilátky na dno mikrodestičky. Pokud je detekční protilátka neznačená, je nezbytné použít sekundární enzymem konjugované detekční protilátky. Hlavní výhodou sendvičového ELISA testu je vysoká citlivost – je 2 – 5 krát citlivější než přímá nebo nepřímá ELISA. Sendvičové ELISA testy jsou zvláště vhodné pro analýzu komplexních vzorků, protože antigen nemusí být před testem přefiltrován, ale výsledek stále poskytuje vysokou citlivost a specificitu (například při měření hladin cytokinů v imunitní odpovědi) (Hnasko 2015).

## Kompetitivní neboli inhibiční varianta metody ELISA

Kompetitivní/inhibiční ELISA, také známá jako blokuující metoda ELISA, se používá hlavně k měření koncentrace antigenu nebo protilátky ve vzorku pomocí detekcí rozdílů ve snížení absorbance barevné reakce ve srovnání s očekávaným signálem (pro získání hodnoty očekávaného signálu se používá přímá metoda, bez přidání dalšího antigenu). Testovaný antigen nebo protilátka soutěží s kontrolním vzorkem o vazbu na omezené množství značených protilátek nebo antigenů. Čím vyšší je koncentrace testované látky, tím slabší je detekovaný signál, což znamená, že absorbance nepřímo koreluje s množstvím antigenu ve vzorku. Kromě popsanych ELISA metod existují ještě další, například POCKET ELISA, ELISPOT a různé modifikace tradičních metod (Hnasko 2015).

## Nepřímá metoda ELISA



**Obrázek 5.** Schématické zobrazení postupů při provedení nepřímé ELISA metody, upraveno podle Kohl et al. (2017)

Nepřímá ELISA má vysokou citlivost, protože více než jedna molekula značené sekundární protilátky se může vázat na primární protilátku, je ekonomičtější než přímá ELISA, nabízí výhodu v tom, že jakýkoli počet sér může být vyšetřen na vazbu k danému antigenu pomocí jediné sekundární protilátky. Mezi nevýhody patří možnost zkřížené reaktivity sekundární protilátky a připojeného antigenu. Nepřímá ELISA je nejvhodnější pro stanovení celkové koncentrace protilátek ve vzorcích. Nepřímá ELISA se využívá v diagnostických aplikacích, zejména při zkoumání velkého počtu vzorků. Hlavní problémem nepřímého ELISA testu je různý stupeň nespecifity vazeb v jednotlivých sérech, což způsobuje větší rozptyl ve výsledcích, a proto zvyšuje potřebu v mnohočetném opakování anebo zavedení specifických standardů pro posouzení spolehlivosti. Během experimentů popsanych v dané bakalářské práci byl použit Tween-20 a bovinní fetální sérum (BOFES), které sloužily jako blokuující látky a inhibovaly vznik

nespecifické reakce (Kohl et al. 2017). Kromě toho se mezi jednotlivými kroky provádělo promývání mikrodestiček izotonickým roztokem PBS pro stejné účely (obrázek 5).

#### **2.4.4. Antigeny *C. parvum***

V průběhu infekce *C. parvum* je protilátková odpověď hostitele namířena proti dvěma nízkomolekulárním sporozoitovým antigenům: rodina antigenů 27-kDa, která obsahuje přibližně 5 proteinů v hmotnostním rozmezí 23 až 27 kDa a rodina antigenů 17-kDa, obsahující 10 proteinů v rozmezí 15 až 17 kDa (Priest et al. 1999). Molekulární analýza 17-kDa a 27-kDa antigenů ukázala, že jsou to komplexní rodiny příbuzných proteinů, z nichž některé jsou asociovány s membránou a některé z nich jsou rozpustné. 10 antigenů v 17-kDa-antigenové rodině a 5- v 27-kDa-antigenové rodině sdílí stejnou primární proteinovou strukturu, ale jsou modifikované v různých mezích štěpením endopeptidázou a přidáním uhlovodíkových zbytků a mastných kyselin. V experimentálních studiích se uvádí, že reaktivita a koncentrace IgG protilátek k 27-, 17-kDa antigenům *C. parvum* dosahuje nejvyšší intenzity v období 32 dnů po inokulaci (Moss et al. 1998) a pozitivně koreluje u pacientů s asymptomatickým průběhem onemocnění (Priest et al. 1999).

#### **2.4.5. IgG**

IgG má molekulovou hmotnost okolo 150 kDa a skládá se, jako ostatní izotypy lidských imunoglobulinů, ze dvou identických těžkých řetězců a dvou identických lehkých řetězců, které jsou spolu spojeny disulfidickými vazbami. IgG je produkován plazmatickými B lymfocyty, tvoří asi 75 % veškerých imunoglobulinů v séru. Je to také molekula s nejdelším biologickým poločasem rozpadu – přibližně 22 dnů. Hlavní funkcí IgG je vázat antigeny, které iniciují aktivaci komplementu a spouští další katabolismus antigenu. U lidí existují čtyři podtřídy IgG (IgG1, 2, 3 a 4), které jsou řazené podle jejich relativního zastoupení v séru (IgG1 je nejčastější). Imunoglobuliny IgG3 a IgG1 dobře aktivují komplement, IgG2 hůř a IgG4 jej vůbec neaktivují. Zvýšené koncentrace IgG lze pozorovat při infekčních a autoimunitních onemocněních (Hořejší et Bartůňková 2017; Owen et al. 2018; Vidarsson et al. 2014).

Protilátky IgG proti antigenům 27-kDa a 17-kDa jsou detekovány ve vzorcích séra odebraných od pacientů v období 28 až 66 dní po nástupu patentní doby. Protilátky proti těmto antigenům byly navíc detekovány častěji v séru pacientů s pozdním nástupem symptomů než u pacientů s časným nástupem.

### 3. Cíle práce

- Zpracovat literární rešerši o tématu
- Popsat séroprevalenci proti infekci *Cryptosporidium* spp. v populaci lidí v závislosti na věku, stavu imunitního systému a pohlaví
- Porovnat údaje o séroprevalenci se skutečným výskytem infekcí v České republice, Ukrajině a ve světě

## 4. Materiál

### 4.1. Vzorky sér pacientů

Vzorky lidských sér byly získány z Nemocnice České Budějovice, a.s. (Česká republika), polikliniky města Svaljavy (Ukrajina) a ozdravného sanatoria „Kvítko Polonyny“ (Ukrajina).

#### 4.1.2. Protilátky

Pro detekci lidských imunoglobulinů IgG proti kryptosporidiím a pro provedení nepřímého testu ELISA byly použity sekundární anti-IgG protilátky (A0170-1ML Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA), značené enzymem avidin-peroxidázou a získané z kozích sér.

#### 4.1.3. Oocysty *Cryptosporidium parvum*

Pro ELISA test byly použity oocysty *Cryptosporidium parvum* získané z trusu přirozeně nakaženého telete (chov mléčného skotu, Jihočeský kraj).

#### 4.1.4. Pozitivní a negativní séra

Jako negativní a pozitivní kontrola bylo použito sérum získané z jednodenního imunokompetentního novorozeněte (č. 177), respektive sérum z 28-leté imunokompetentní pacientky (č. 41), která prodělala klinickou kryptosporidiózu způsobenou druhy *C. parvum* a *C. tyzzeri*.

## 5. Metody

### 5.1. Barvení nátěru trusu anilin-karbol-methyl-violetí dle Miláčka a Vítovce (1985)

Pro detekci oocyst kryptosporidií ve vzorcích trusu byla provedena metoda specifického barvení nátěru dle Miláčka a Vítovce (1985).

#### Roztoky a chemikálie:

- **Roztok methylvioleti:** 0,6 g methyl violeti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml ethanolu, 70 ml deionizované vody.
- **Roztok 2% kyseliny sírové.**
- **Tartrazin:** 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové.



### **Pracovní postup:**

1. Na podložní sklíčko udělat slabý nátěr trusu.
2. Sklíčko s nátěrem zafixovat methanolem v plameni.
3. Zafixovaná sklíčka barvit v roztoku methylvioleti po dobu 30 minut.
4. Sklíčka opláchnout vodou.
5. Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 1 minuty.
6. Sklíčka opláchnout vodou a dobarvit v tartrazinu po dobu 10 minut.
7. Sklíčka opláchnout vodou a usušit.
8. Prohlížet skla světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

## **5.2. Purifikace oocyst**

Pozitivní vzorky trusu telat byly homogenizovány v třecí misce, ředěny deionizovanou vodou a zbaveny hrubých nečistot přes sítko o velikosti 200 µm. Z takto získaného homogenátu byly oocysty kryptosporidií přečištěny na sacharózovém a následně na cesium chloridovém gradientu. Suspenze oocyst byla následně ošetřena 4,7% roztokem chlornanu sodného (SAVO) za účelem odstranění bakterií.

### **5.2.1. Sacharózový gradient (Arrowood et Sterling 1987)**

#### **Roztoky a chemikálie:**

- **Sheaterův roztok:** 405 g cukru v 259 ml dH<sub>2</sub>O
- **PBS (Phosphate Buffered Saline):** rozpustit 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ×12 H<sub>2</sub>O, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> do 1000 ml dH<sub>2</sub>O a upravit na pH 7,2 – 7,4
- **1% PBS Tween:** 0,5 ml Tween 20 + 999,5 ml PBS

#### **Postup:**

1. Homogenizovat vzorky trusu v třecí misce pomocí deionizované vody a přecedit přes sítko
2. Navrstvit gradient do skleněných kyvet:
  - 1) Dolní vrstva: 30 ml Sheater 1+2 (1 díl Sheater + 2 díly 1% PBS Tween).
  - 2) Střední vrstva: 30 ml Sheater 1+4 (1 díl Sheater + 4 díly 1% PBS Tween).
  - 3) Horní vrstva: 15 ml homogenizovaného vzorku.
3. Centrifugovat kyvety 20 minut při 1000 g a 4 °C.
4. Odsát horní čistou vrstvu.
5. Přemístit prsteneček na rozhraní dolní a střední vrstvy do nových kyvet.

6. Doplnit kyvety PBS.
7. Centrifugovat kyvety 20 minut při 1500 g a 4 °C.
8. Odsát supernatant nad sedimentem (obsahuje oocysty) s nadbytkem PBS a centrifugovat kyvety 20 minut při 1500 g a 4 °C.
9. Předchozí krok 2× opakovat a následně přenést sediment do čistých zkumavek.
10. Skladovat vzorky při 4 °C v PBS.

### **5.2.2. Cesium chloridový gradient**

#### **Roztoky a chemikálie:**

- Roztok cesium chloridu (CsCl;  $\rho = 1,15 \text{ g/ml}$ ): 21,07 g CsCl do 100 ml dH<sub>2</sub>O).
- PBS (viz výše).

#### **Postup:**

1. Napipetovat 1 ml CsCl do každé mikrozkušavky.
2. Navrstvit 0,5 ml vzorku oocyst v PBS do mikrozkušavek.
3. Centrifugovat 3 minuty při 16000 g při 20 °C.
4. Přepipetovat supernatant ze všech ependorfeček do 50 ml zkumavek.
5. Zkušavku doplnit PBS a centrifugovat 20 minut při 1000 g při 4 °C.
6. Odsát supernatant na objem 5 ml.
7. Doplnit zkušavku destilovanou vodou, vortexovat a centrifugovat 20 minut při 1000 g při 4 °C.
8. Opakovat kroky 5 – 7 minimálně 3×.
9. Uchovávat vzorek v destilované vodě při 4 °C.

### **5.2.3. Ošetření oocyst chlornanem sodným (SAVO)**

#### **Roztoky a chemikálie:**

- 4,7% roztok chlornanu sodného (SAVO): 47 g NaClO v 1 kg dH<sub>2</sub>O.
- Destilovaná voda.

#### **Postup:**

1. Vystavit oocysty účinku 4,7% chlornanu sodného (SAVO) po dobu 15 minut při 4 °C.
2. Vymýt SAVO nadbytkem deionizované vody minimálně 5× (opakovaná centrifugace při 1000 g po dobu 20 minut).

### 5.3. Testování korpuskulárního antigenu

Byl proveden pokus na zjištění postupů, které poskytnou nejvyšší absorbance při závěrečném měření na spektrofotometru:

- 1)  $\frac{1}{4}$  oocyst byla použita beze změn
- 2)  $\frac{1}{4}$  oocyst byla excystována při 38 °C 1 hodinu (rozmíchání na vortexu každých 10 minut)
- 3)  $\frac{1}{4}$  oocyst byla rozbita pomocí 0,5 mm skleněných kuliček homogenizací po dobu 60 sekund (FastPrep-24 Beadbeater)
- 4)  $\frac{1}{4}$  oocyst byla připravena kombinací postupů 2 a 3

#### Výsledek:

Nejvyšší absorbance prokázaly vzorky získané kombinací excystační metody a následné rozbití oocyst – metoda 4.

### 5.4. Nepřímá ELISA

#### 5.4.1. Příprava korpuskulárního antigenu

Na základě předpokusů byl stanoven počet oocyst na jamku, koncentrace séra a protilátek. Celkové množství oocyst *C. parvum* navázaných na dno mikrotitrační desky se rovnalo  $10^5$  oocyst na jamku ( $9,6 \times 10^6$  oocyst na desku). Větší množství oocyst na jamku, stejně jako vyšší koncentrace protilátek produkovalo nečitelnou absorbanci, naopak menší množství nevyvolávalo čitelnou reakci.

**Ředění séra:** 1:200 (2  $\mu$ l séra + 398  $\mu$ l ředícího roztoku).

**Protilátka značená peroxidázou:** protilátky v ředícím roztoku v poměru 1:20 000 (0,5  $\mu$ l roztoku anti-IgG + 10 ml T-PBS, na 96 jamek) pro optimální výsledky při měření absorbance.

#### Roztoky a chemikálie:

- **Roztok PBS:** 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  do 1000 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , upravit na pH 7,2 – 7,4.
- **Blokovací roztok:** 5% BOFES v T-PBS: 5 ml BOFES + 95 ml T-PBS
- (BOFES – bovinní fetální sérum).
- **Stopovací roztok:** 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : 196,16 g koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$  do 1000 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ .
- **Fosfátový pufr:** 14,3 g 0,2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  do 200 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ .
- **Citrátový pufr:** 4,2 g 0,1M  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (kyselina citrónová) do 200 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ .

- **0,05M Fosfáto-citrátový pufr (pH 5):** smíchat 51,4 ml fosfátového pufru a 48,6 ml citrátového pufru ve 100 ml dH<sub>2</sub>O.
- **Substrátový roztok (na 100 jamek):** 10 ml fosfáto-citrátového pufru (pH 5) + 4 µl 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4 mg 2,5mM O-Phenylendiaminu (OPD), připravit těsně před použitím.

#### 5.4.2. Navázání antigenů na pevnou fázi mikrotitrační destičky:

##### Roztoky a chemikálie:

- **Vazebný (koutovací) roztok:** 1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g NaHCO<sub>3</sub> do 1 000 ml dH<sub>2</sub>O, upravit na pH 9,6.
- **Fixační roztok:** 100 ml acetonu a 100 ml metanolu (poměr 1:1).
- **Blokovací roztok:** 5% BOFES v T-PBS (BOFES – bovinní fetální sérum) (5 ml BOFES + 95 ml T-PBS).
- **Promývací roztok T-PBS:** 0,05% Tween 20 v PBS (0,5 ml Tween 20 + 999,5 ml PBS).

##### Postup:

1. Naředit korpuskulární antigen (výše) ve vazebném roztoku v odpovídající koncentraci oocyst 10<sup>5</sup>/jámka.
2. Připravit mikrotitrační destičku 8×12 (96 jamek).
3. Do každé jamky napipetovat 100 µl roztoku korpuskulárního antigenu.
4. Inkubovat destičku 24 hodin při 4 °C ve vlhké komůrce.
5. Po inkubování vyklepnout obsah jamek a osušit destičku.
6. Přidat 200 µl fixačního roztoku aceton:metanol (1:1) do každé jamky a inkubovat roztok 10 minut při laboratorní teplotě.
7. Po inkubování znovu vyklepnout obsah jamek a osušit destičku.
8. Po fixaci vyblokovat nespecifické vazby blokovacím pufrům v množství 200 µl/jámka, inkubovat 1 hodinu v termostatu při 37 °C (nebo v lednici při 4 °C, skladovat maximálně několik dnů).
9. Jamky 3× promýt 300 µl promývacího pufru T-PBS.
10. Pokud se ELISA neprovádí hned po promývání, napipetovat 300 µl T-PBS do každé jamky a destičky zamrazit na teplotu -20 °C.

### 5.4.3. Příprava testovaného vzorku séra:

#### Roztoky a chemikálie:

- Vzorky lidských sér odebraných z nemocnic.
- Ředící roztok: 2% BOFES v PBS (2 ml BOFES + 98 ml PBS).
- Promývací roztok Tween-PBS: 0,05% Tween 20 v PBS (500 µl Tween 20 + 999,5 ml PBS).
- Antiizotypová anti-IgG protilátka značená enzymem avidin-peroxidázou.

#### Postup:

1. Do 2 ml mikrozkmavek naředit vzorek testovaného séra.
2. Ředění séra 1:200 (2 µl séra + 398 µl ředícího roztoku).
3. Po ředění vzorků přidat 100 µl ředěného séra do jamky mikrotitrační desky, testovat každý vzorek séra v triplicátu.
4. Inkubovat destičku 1 hodinu v termostatu při 37 °C (nebo 24 hodin v lednici při 4 °C).
5. 3× promýt destičku roztokem T-PBS (300 ul do jamky).
6. Do každé jamky napipetovat 100 µl antiizotypového séra proti studovaným imunoglobulinům skupiny IgG značených avidin-peroxidázou, ředit 1:20 000 ředícím pufrem (10 ml ředícího pufru + 0,5 ul protilátky).
7. Inkubovat 1 hodinu při 37 °C.
8. 3× vymýt vzorky promývacím pufrem T-PBS (300 ul do jamky).
9. Napipetovat 100 µl substrátového roztoku (10 ml fosfáto-citrátového pufru, 4 µl 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4 mg 2,5mM OPD), přemístit destičku na 10 minut do tmy.
10. Pro zastavení enzymové reakce použít 100 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do každé jamky.
11. Měřit absorbanci ELISA spektrofotometrem při vlnové délce 490 nm.

### 5.5. Hodnocení metody ELISA

Každé hodnocení ELISA testu musí probíhat podle přesně stanovených standardů. Jako hlavní orientační jednotky během posuzování platnosti provedeného testu slouží hodnoty absorbance blank (prázdného) vzorku, obsahujícího jenom ředící roztok bez přidání séra, pozitivní a především negativní kontroly. Pozitivní kontrola obsahovala sérum pacienta, který prokazatelně prodělal kryptosporidiózu, a negativní kontrola obsahovala sérum pacienta, u kterého byl vysoký předpoklad, že kryptosporidiózou neprošel. Cut-off, neboli hodnota minimálního kritického výpočtu byla stanovena jako dvojnásobek absorbance negativní kontroly.

### 5.5.1 Statistické hodnocení

Pro mezistátní porovnání byla stanovena nulová hypotéza, která značí, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi absorbancí a četností séropozitivních pacientů z České republiky a Ukrajiny.

Při řešení byl použit generalizovaný lineární model (GLM), ve kterém byla závislá proměnná binárního charakteru (negativní, pozitivní) vysvětlována prostřednictvím proměnných faktorů: věk (numerická proměnná), pohlaví (binární charakter) a státní příslušnost (binární: CZ a UKR). Vzhledem k výše uvedenému byla pro tento regresní model využita logistická regrese s logitovou linkovací funkcí. Po odhadnutí regresních koeficientů bylo možno odhad pravděpodobnosti pozitivního testu vyjádřit jako:

$$\pi_i = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip}}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip}}}$$

Kde  $\pi_i$  je odhad pravděpodobnosti pozitivního testu u  $i$ -tého probanda. Symboly  $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_p$  jsou odhadnuté regresním koeficientem prostřednictvím ML metody a IRLS algoritmu. Symboly  $x_{i1}, \dots, x_{ip}$ , pak představují hodnoty vysvětlujících regresorů u  $i$ -tého probanda. Numerické výpočty byly provedeny pomocí programovacího prostředí R (R Core Team).

## 6. Výsledky

V průběhu let 2018 – 2020 bylo získáno celkem 1366 vzorků sér pacientů, z toho 860 na území ČR a 506 na Ukrajině. Zatímco na Ukrajině odpovídá počet získaných sér počtu vyšetřovaných osob, v České republice bylo z důvodů opakovaných odběrů krve vyšetřeno menší množství osob než vzorků sér (dále).

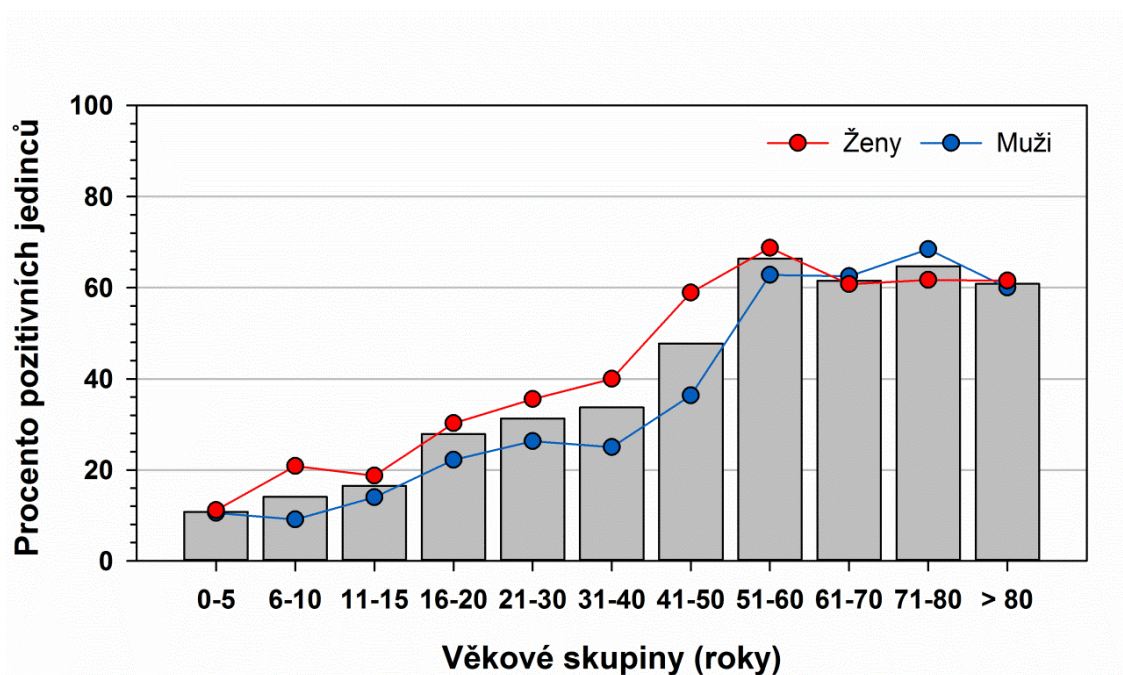
### 6.1. Séroprevalence v ČR

Během období duben 2019 – únor 2020 bylo z České republiky získáno celkem 860 vzorků sér od 842 pacientů, přičemž 825 pacientů bylo vyšetřeno jednorázově, u 16 pacientů byla přítomnost protilátek proti kryptosporidiím vyšetřována dvakrát ze dvou různých odběrů v rozmezí 3 – 6 týdnů a u jednoho pacienta ze tří různých odběrů. Věk pacientů se pohyboval v rozmezí od několika dní do 89 let. Celkem bylo vyšetřeno 388 pacientů mužského pohlaví a 454 ženského pohlaví. Z 842 pacientů bylo 351 pozitivních (40,4 %, tabulka 2). Procentuální zastoupení osob majících protilátky proti kryptosporidiím v jednotlivých věkových skupinách je uvedeno v obrázku 7. Výsledky této práce ukázaly, že se vzrůstajícím věkem dochází k nárůstu počtu séropozitivních jedinců v populaci. U osob mladších 15 let byla zjištěna séroprevalence u méně než 20 % jedinců. U osob mezi 16 až 40 rokem života se seroprevalence pohybovala do 40 % a u osob nad 60 let je vyšší než 60 % (obrázek 7). Byl zjištěn významný rozdíl mezi séroprevalencí mužů a žen ( $p = 0.0001$ ). Ze 17 opakovaně vyšetřovaných pacientů bylo 9 negativních a 8 pozitivních na přítomnost protilátek proti kryptosporidiím. U opakovaně pozitivně testovaných pacientů nebyl zjištěn rozdíl ve výši detekovaných protilátek v čase.

Žádný z pacientů z České republiky, který byl zařazen do této studie, netrpěl v průběhu odběru krve chronickým nebo akutním průjmem a parazitologické vyšetření, pokud bylo provedeno, neprokázalo přítomnost oocyst kryptosporidií ve stolici. Současně žádné z osob nebyla v minulosti kryptosporidióza diagnostikována.

**Tabulka 2.** Počet vyšetřených a sérologicky pozitivních pacientů podle věkových skupin a podle pohlaví v České Republice.

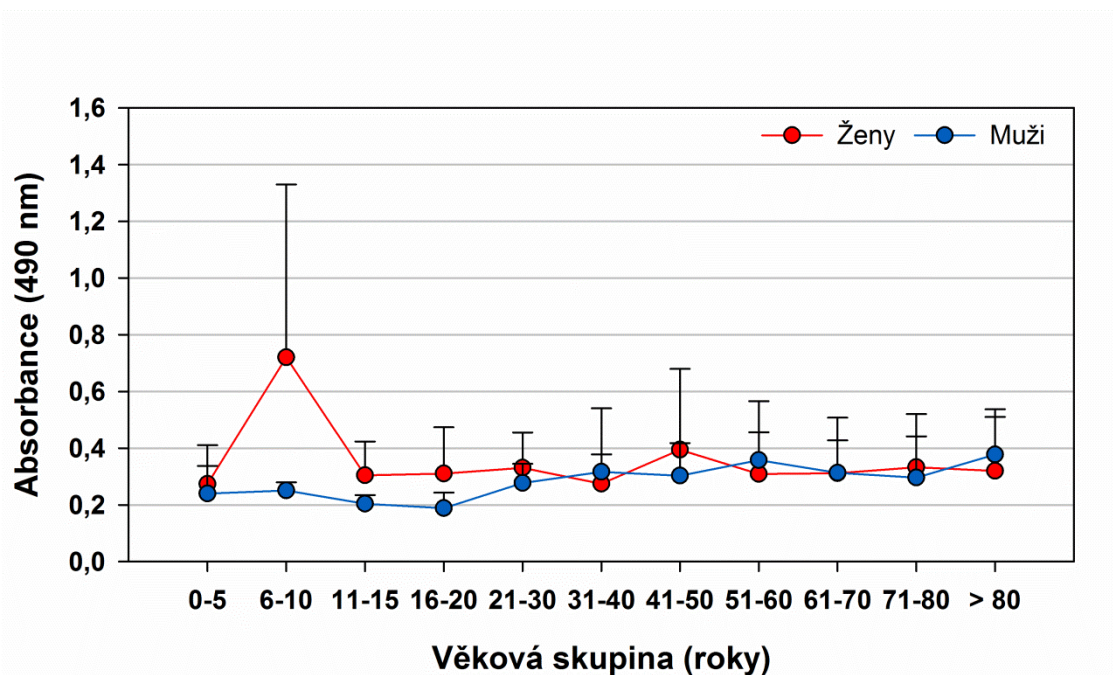
Věkové skupiny (roky)	Muži	Ženy	Celkem
	Vyšetření/positivní (%)		
0-5	38/4 (10,5 %)	27/3 (11,1 %)	65/7 (10,8 %)
6-10	33/3 (9,1 %)	24/5 (20,8 %)	57/8 (14,0 %)
11-15	42/6 (14,2 %)	48/9 (18,8 %)	90/15 (16,7 %)
16-20	18/4 (22,2 %)	43/13 (30,2 %)	61/17 (27,9 %)
21-30	37/9 (24,3 %)	45/16 (35,6 %)	82/25 (30,4 %)
31-40	36/9 (25,0 %)	49/20 (40,8%)	85/29 (34,1 %)
41-50	54/20 (37,0 %)	53/31 (58,5 %)	107/51 (47,7 %)
51-60	42/26 (61,9 %)	59/43 (72,8 %)	101/69 (68,3 %)
61-70	40/25 (62,5 %)	48/30 (62,5 %)	88/55 (62,5 %)
71-80	38/26 (68,4 %)	45/28 (62,2 %)	83/54 (65,1 %)
81+	10/6 (60 %)	13/8 (61,5 %)	23/14 (60,9 %)
<b>Celkem</b>	<b>388/138 (35,6 %)</b>	<b>454/206 (45,4 %)</b>	<b>842/344 (40,9 %)</b>



**Obrázek 7.** Procentuální zastoupení séropozitivních pacientů v České republice podle věkové skupiny a pohlaví

Statistickou analýzou nebyl zjištěn rozdíl ve výši absorbance, tedy množství naměřených protilátek, mezi jednotlivými věkovými skupinami a pohlavím vyšetřovaných osob.



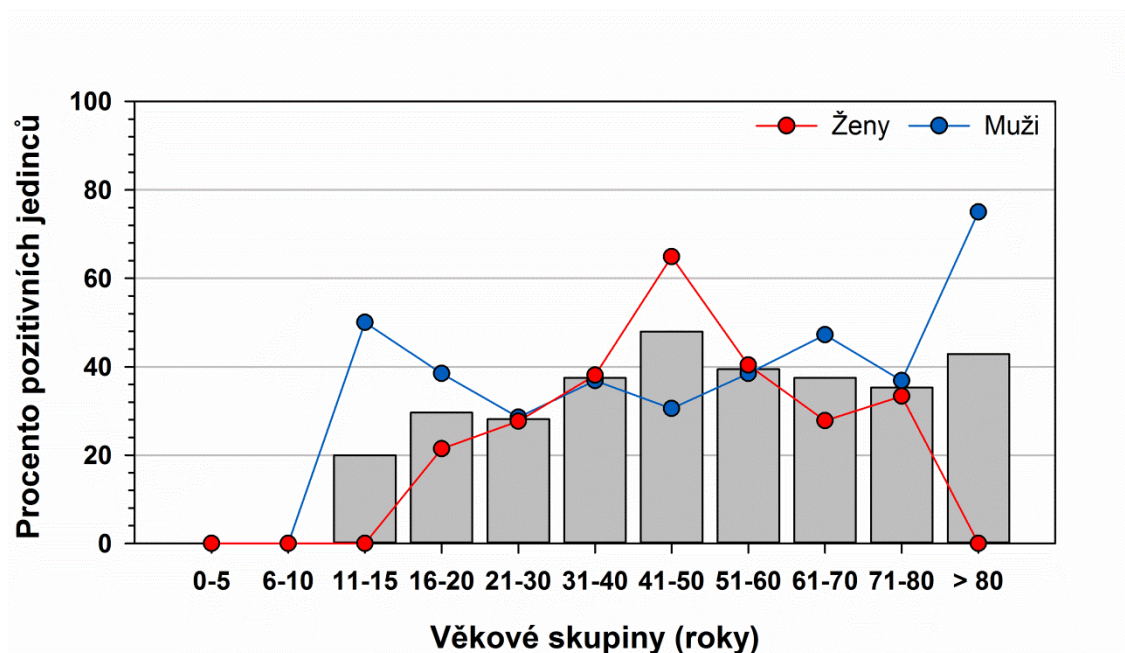


**Obrázek 8.** Průměrné hodnoty absorbance se směrodatnou odchylkou sér pacientů z České republiky podle věkové skupiny a pohlaví

## 6.2. Séroprevalence na Ukrajině

Vzorky sér byly získány z polikliniky a zdravotního sanatoria během tříměsíčního období: červenec 2019 – září 2019. Každá osoba byla odebrána pouze jedenkrát. S ohledem na typ zařízení, ve kterém byla studie prováděna, nebyly získány vzorky sér od osob mladších 10 let. Výsledné množství séropozitivních pacientů bylo 186 (36,8 %) z 506 (tabulka 3).

Ze získaných výsledků vyplývá, že u osob mladších 15 let byla zjištěna séroprevalence u méně než 20 % jedinců a u osob starších 16 let se seroprevalence pohybovala od 20 do 42 %, vyjma věkové skupiny 41 – 50 let, kde byla zjištěna seroprevalence ve výši 48 % (obrázek 9).



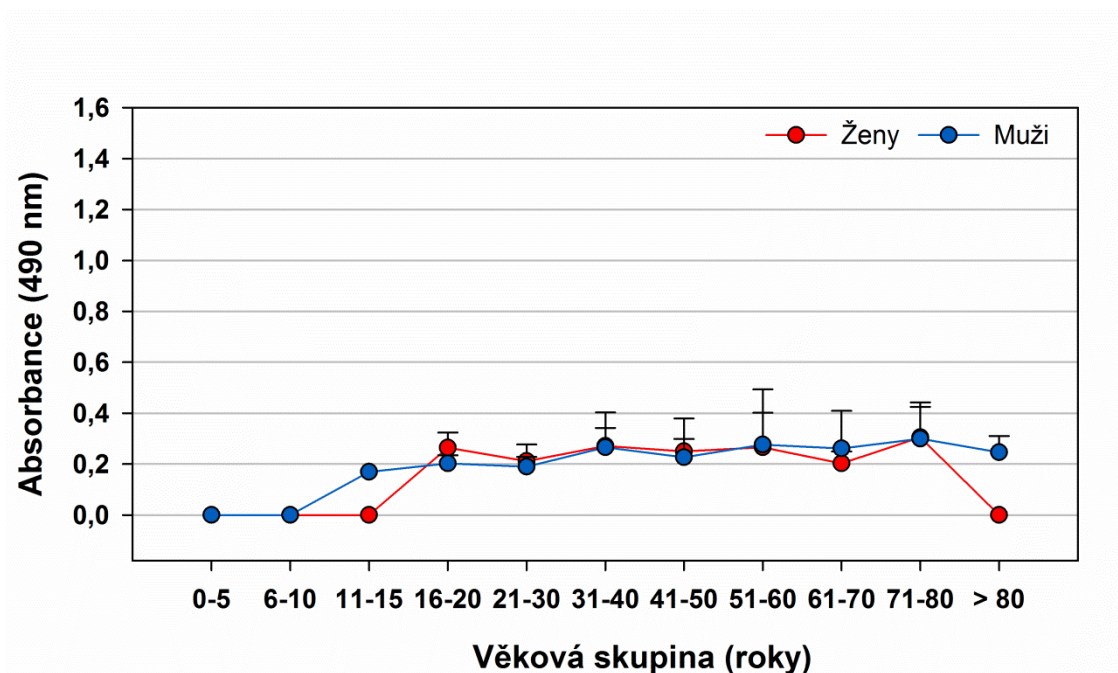
**Obrázek 9.** Procentuální zastoupení séropozitivních pacientů na Ukrajině podle věkové skupiny a pohlaví

**Tabulka 3.** Počet vyšetřených a sérologicky pozitivních pacientů podle věkových skupin a podle pohlaví z Ukrajiny

Věkové skupiny (roky)	Muži		Ženy		Celkem
	vyšetřeni	pozitivní (%)	vyšetřeni	pozitivní (%)	
0-5	1/0	(0 %)	0/0	(0 %)	1/0 (0 %)
6-10	1/0	(0 %)	1/0	(0 %)	2/0 (0 %)
11-15	2/1	(50 %)	14/3	(21,4 %)	5/1 (20 %)
16-20	13/5	(38,5 %)	43/13	(30,2 %)	27/8 (29,6 %)
21-30	49/14	(28,6 %)	47/13	(27,7 %)	96/27 (28,1 %)
31-40	38/14	(36,8 %)	42/16	(38,1 %)	80/30 (37,5 %)
41-50	36/11	(30,6 %)	37/24	(64,9 %)	73/35 (47,9 %)
51-60	52/20	(38,5 %)	57/23	(40,4 %)	109/43 (39,4 %)
61-70	36/14	(38,8 %)	36/13	(36,1 %)	72/27 (37,5 %)
71-80	19/7	(36,8 %)	15/5	(33,3 %)	34/12 (35,3 %)
81+	4/3	(75 %)	3/0	(0 %)	7/3 (42,8 %)
<b>Celkem</b>	<b>251/92</b>	<b>(36,7 %)</b>	<b>255/94</b>	<b>(36,9 %)</b>	<b>506/186 (36,8 %)</b>

Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v naměřené absorbanci mezi ženami a muži v jednotlivých věkových kategoriích ani v rámci všech věkových skupin (Obrázek 10).

U žádného z pacientů vyšetřovaného na Ukrajině nebyly v průběhu studie zjištěny žádné klinické příznaky kryptosporidiové infekce. Současně u žádné z osob nebyla v minulosti prokázána kryptosporidiová infekce.



**Obrázek 10.** Průměrné hodnoty absorbance se směrodatnou odchylkou sér pacientů z Ukrajiny podle věkové skupiny a pohlaví

### 6.3. Statistické shrnutí

Na základě odhadu regresních koeficientů byl proveden odhad pravděpodobnosti pozitivního testu u jednotlivých kategorií. Bylo prokázáno, že se vzrůstajícím věkem vyšetřované osoby se zvyšuje pravděpodobnost, že bude jedinec mít protilátky proti kryptosporidiím, tedy se setká s infekcí ( $p < 0,001$ ). Dále jsme prokázali, že ženy jsou častěji pozitivní než muži ( $p = 0,01$ ), a to bez rozdílu národnosti. Při porovnání národností bylo zjištěno, že Češi jsou častěji pozitivní než Ukrajinci ( $p = 0,001$ ).

## 7. Diskuze

Kryptosporidiové infekce patří mezi častá onemocnění člověka, zejména v rozvojových zemích a zemích/oblastech s nízkými hygienickými standardy (King et al. 2019; Kotloff et al. 2013; Putignani et Menichella 2010). Výsledky nedávných studií ukazují na značné rozdíly ve výskytu kryptosporidióz v lidské populaci v zemích s obdobnými standardy a ekonomickou silou (Lake et al. 2007, Plutzer et al. 2018). Plutzer et al. (2018) poukazují na výrazný rozdíl nejen mezi zeměmi střední a východní Evropy, ale také na rozdíl mezi zeměmi západní a střední Evropy. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozličným přístupem zdravotního systému k vyšetřování pacientů na kryptosporidiové infekce (Plutzer et al. 2018, Cacciò et Chalmers 2016).

V České republice je ročně hlášeno do šesti případů kryptosporidióz (ECDC 2019), přičemž v letech 2013 – 2017 bylo detekováno pouze 12 případů infekcí. Těmto výsledkům odpovídají závěry této práce, kdy u žádného z vyšetřovaných pacientů v České republice nebyla zjištěna manifestní kryptosporidiová infekce. Obdobně nízký záchyt kryptosporidiových infekcí jako v České republice je i v dalších státech střední a východní Evropy, například Polsko (22), Slovensko (18), Rumunsko (6) a Maďarsko (78). Naopak ve státech západní Evropy je hlášen relativně vysoký počet případů. Například v Německu bylo za stejné období hlášeno 8485 případů nálezů kryptosporidii, v Holandsku 7148, v Irsku 2463 nebo ve Velké Británii 25798 (ECDC 2019). Přestože absolutní počty hlášených nálezů nemusí odrážet promořenost v jednotlivých státech z důvodů rozdílné velikosti populace, je četnost výskytu kryptosporidiových infekcí na 100 000 obyvatel vyšší v západní Evropě (2 – 12) než v ostatních částech Evropy (0 – 0,1) (ECDC 2019).

Oficiální údaje o výskytu kryptosporidiových infekcí na Ukrajině nejsou k dispozici, nicméně Pokhil et al. (2016) uvádějí prevalenci kryptosporidií v různých oblastech Ukrajiny v rozmezí 4,4 – 26,9 % (obrázek 4) a ve čtyřech studiích zaměřených na výskyt kryptosporidií v závislosti na věku u imunokompetentních osob byla zjištěna promořenost u dětí ve výši 19,9 % a u dospělých 20,7 % (Bohach 2007; Kovalenko 2014; Poletaeva 2010; Shulezhko et Snisarenko 2011). Na rozdíl od výše uvedených údajů nebyla kryptosporidiová infekce detekována u žádného pacienta z Ukrajiny před ani v průběhu studie.

Přestože jsou kryptosporidiové infekce často spojovány s klinickým onemocněním hostitele (Certad et al. 2017; Farthing 2000), infekce mohou probíhat bezpříznakově a

takový pacient není pozitivně testován. Například Checkley et al. (1997) uvádí, že 63 % (36 z 57) kryptosporidiových infekcí u peruánských dětí do 2 let probíhá bezpříznakově. Ve studii provedené v Libanonu byly zjištěny asymptomatické průběhy kryptosporidiových infekcí u 27 % dětí ve věku 3 – 16 let (Osman et al. 2016). Studie u předškolních dětí ve Spojeném království ukázala, že všechny děti (3 z 230) s kryptosporidiovou infekcí měly bezpříznakový průběh onemocnění (Davies et al. 2009). Z těchto a dalších prací vyplývá, že bezpříznakový průběh infekce se může pohybovat v rozmezí od 1 % do 65 % případů (Brockmann et al. 2008; Checkley et al. 1997; Davies et al. 2009; Frost et al. 2005; Reh et al. 2019; Körkoca et al. 2013; Osman et al. 2016; Vandenberg et al. 2012). Z výše uvedeného je zřejmé, že séroprevalence kryptosporidiových protilátek v populaci je mnohonásobně vyšší než procento detekovaných případů.

V této studii jsme prokázali, že séroprevalence proti kryptosporidiím se u imunokompetentních osob pohybuje v rozmezí od 20 do 68 % v České republice a od 20 do 40 % na Ukrajině v závislosti na věku. Naše výsledky z České republiky jsou výrazně nižší než 95% pozitivita v České republice zjištěná pomocí metody Western Blot pomocí antigenu 27-kDa (Kožíšek et al. 2008). Rozdíly mezi pracemi mohou být způsobeny rozdílnou metodou pro zjištění séropozitivity. Z výsledků Frost et al. (1998) vyplývá, že počet pozitivních jedinců je při použití metody Western Blot a antigenu 27-kDa 3 krát vyšší než při ELISA testu.

Za rizikové a nejvíce ohrožené skupiny osob jsou obecně považovány děti a imunodeficientní lidé (Cacciò et Chalmers 2016). Cacciò et Widmer (2014) uvádějí, že průměrný výskyt oocyst ve stolici u dětí a dospělých z Evropských zemí se pohybuje v rozmezí 1 – 2 %, respektive okolo 4 %. Celosvětově se procento detekovaných případů pohybuje až do 26 %. Rozdíl je pravděpodobně způsoben různými epidemiologickými faktory (Becker et al. 2015).

Z výsledků této práce je patrné, že 10 % českých dětí ve věku do 5 let se setkalo s kryptosporidiovou infekcí. Kuhls et al. (1994) uvádí zvyšující se trend séropozitivity v souvislosti s navštěvováním předškolních a školních zařízení.

Z výše uvedených dat lze předpokládat, že většina případů zůstala neodhalena a to buď z důvodů asymptomatického průběhu onemocnění, nebo záměny kryptosporidiosis za jinou gastrointestinální infekci. Námi zjištěné výsledky jsou tak v souladu s předešlými pracemi, v kterých byla detekována vysoká seroprevalence IgG protilátek

(až 82 %) zatímco přítomnost oocyst ve stolici se pohybovala od 4,3 % do 22,2 % (Abdel-Messih et al. 2005; Gatei et al. 2006; Kuhls et al. 1994; Miron et al. 2000). Tyto rozdíly mohou být způsobeny v důsledku vzniku částečné nebo úplné rezistence po opakovaných infekcích. Na zvířecích modelech a lidských dobrovolnících bylo prokázáno, že průběh infekce u opakovaně infikovaného hostitele probíhá s nižší intenzitou nebo vůbec (Horčíčková 2019; Kváč et al. 2009; Okhuysen et al. 1997).

Podle Moss et al. (1998) již existující protilátky nemusí chránit před následnou infekcí, ale mohou chránit před projevem symptomů při následném onemocnění, což neplatí pro pacienty s oslabenou imunitou a starší děti. Tomuto tvrzení odpovídají výsledky experimentální infekce dobrovolníků. U dobrovolníků, kteří měli protilátky proti kryptosporidiím, bylo zapotřebí 3 krát větší infekční dávky k vyvolání infekce než u dobrovolníků bez protilátek (Chappell et al. 1999).

V této práci jsme zjistili statisticky významný rozdíl v séroprevalenci mužů a žen s tím, že ženy byly častěji pozitivní než muži. Vyšší množství nákaz u žen může být vysvětleno rolí žen jako hlavních pečovatelek o malé děti v domácnosti i mimo domov (například v mateřské škole), případně práce v zemědělství. Ženy jsou tak vystaveny zvýšenému riziku infekce (Painter et al. 2015; Kožíšek et al. 2008; Pumann et Šašek 2004).

Z výsledků této práce vyplývá, že lidé se s kryptosporidiovými infekcemi pravděpodobně setkávají opakovaně po celý život a s opakovanými infekcemi dochází k vzniku protektivní imunity u většiny osob. Painter et al. (2015) na vzorku více než 100 000 osob prokázal, že se vzrůstajícím věkem se snižuje pravděpodobnost klinické kryptosporidiózy. Kožíšek et al. (2008) a Ramsey et al. (2014) předpokládají pozitivní korelaci mezi množstvím exprimovaných protilátek, celkovou séroprevalencí a systémem ošetření vody v místě bydliště testovaných skupin. Autoři naznačují ochranný vliv konzumace kontaminované pitné vody, obsahující nízké množství oocyst kryptosporidií. V případě změny filtračního systému došlo k odstranění oocyst kryptosporidií z pitné vody a tím snížení výskytu infekcí přenášené vodou, ale paradoxně zvýšení rizika infekce z jiných zdrojů kvůli vymizení protektivní imunity (Ramsey et al. 2014; Roy et al. 2004).

## **8. Závěry**

- Procento detekovaných klinických případů kryptosporidiových infekcí v České republice a na Ukrajině je nízké
- S přibývajícím věkem se zvyšuje procento osob s protilátkami proti kryptosporidiím
- Ženy jsou více seropozitivní než muži
- Nebyl zjištěn rozdíl ve výši absorbance mezi skupinami (národnost, pohlaví, věk)

## 9. Seznam zkratek

**Ab** – Antibody, protilátka

**Ag** – Antigen

**AIDS** – Acquired Immune Deficiency Syndrome, syndrom získaného selhání imunity

**ANOVA** – Analysis of variance, analýza rozptylu

**AMP** – Antimicrobial peptide, antimikrobiální peptidy

**APC** – Antigen presenting cells, antigen prezentující buňky

**BOFES** – Bovine foetal serum, hovězí fetální sérum

**CI** – Confidence interval, interval spolehlivosti

**ČR** – Česká republika

**DNA** – Deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

**ELISA** – Enzyme-linked immunosorbent assay, enzymově vázaná imunosorpční esej

**HBD** – Human Beta-Defensin, lidský  $\beta$ -defensin

**HIV** – Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti

**HPR** – Horseradish peroxidase, avidin peroxidáza

**IFN** – Interferon

**IgA** – Imunoglobulin A

**IgD** – Imunoglobulin D

**IgE** – Imunoglobulin E

**IgG** – Imunoglobulin G

**IgM** – Imunoglobulin M

**IL** – Interleukin

**kDa** – Kilodalton

**MBL** – Mannose-binding lectin, manan vázající lektin

**MHC** – Major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex

**NK** – Natural killer cell



**OD** – Optical density, absorbance

**OPD** – O-fenylendiamin

**PBS** – Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr

**RNA** – Ribonucleic acid, ribonukleová kyselina

**TNF** – Tumor necrosis factor, faktor nádorové nekrózy

**UTR** – Untranslated region, nepřekládaná oblast

**UV** – Ultraviolet, ultrafialové záření

## 10. Seznam použité literatury

1. **Abdel-Messih I. A., Wierzba T. F., Abu-Elyazeed R., Ibrahim A. F., Ahmed S. F., Kamal K., Sanders J., Frenc R. 2005.** Diarrhea associated with *Cryptosporidium parvum* among young children of the Nile River Delta in Egypt. *Journal of Tropical Pediatrics*. 51(3): 154-159.
2. **Agnamey P., Djeddi D., Diallo A., Vanrenterghem A., Brahimi N., da Costa C., Totet A. 2010.** Childhood cryptosporidiosis: a case report. *Journal of Parasitology Research*. 935625.
3. **Aldeyarbi H., Karanis P. 2016.** The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology*. 143(6): 749-761.
4. **Anderson B. C. 1987.** Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Veterinary Pathology*. 24: 235-238.
5. **Arrowood M. J., Sterling C. R. 1987.** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradient. *Journal of Parasitology*. 73: 314-319.
6. **Barakat F. M., McDonald V, Foster G. R., Tovey M. G., Korbel D. S., 2009.** *Cryptosporidium parvum* infection rapidly induces a protective innate immune response involving type I Interferon. *The Journal of Infectious Diseases*. 200: 1548-1555.
7. **Becker D. J., Oloya, J., Ezeamama A. E. 2015.** Household Socioeconomic and Demographic Correlates of *Cryptosporidium* Seropositivity in the United States. *Neglected Tropical Diseases*. 9(9): e0004080.
8. **Berg J., Tymoczko J., Gatto G., Stryer L. 2015.** Biochemistry. W H. Freeman, New York. 1232 s. ISBN-13: 978-1464126109
9. **Bhadauria D., Goel A., Kaul A., Sharma R.K., Gupta A., Ruhela V., Gupta A., Vardhan H., Prasad N. 2015.** *Cryptosporidium* infection after renal transplantation in an endemic area. *Transplant Infectious Disease*. 17: 48-55.
10. **Bohach M. V. 2007.** Střevní invaze krůt (šíření, diagnostika, patogeneze, prevence). *Vetinform*. 224 (článek v ukrajinštině).
11. **Borad A., Ward H. 2010.** Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiology*. 5(3): 507-519.

12. Borowski H., Thompson R., Armstrong T., Clode P. 2010. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. *Parasitology*. 137(1): 13-26.
13. Brockmann S. O., Dreweck C., Wagner-Wiening C., Hagen R. M., Kimmig P., Petry F., Jakobi V. 2008. Serological and epidemiological analysis of an outbreak of gastroenteritis among military recruits in Germany caused by *Cryptosporidium parvum*. *Infection*. 36(5): 450-457.
14. Bull S., Chalmers R., Sturdee A.P., Curry A., Kennaugh J. 1998. Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Veterinary Parasitology*. 77(2-3): 195-197.
15. Bushen O., Kohli A., Pinkerton R., Dupnik K., Newman R., Sears C., Fayer R., Lima A., Guerrant R. 2007. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 101(4): 378-384.
16. Cacciò S., Chalmers R. 2016. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 22(6): 471-480.
17. Cacciò S., Thompson R. C. McLauchlin J., Smith H. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*. 21: 430-437.
18. Cacciò S., Widmer G. 2014. *Cryptosporidium: parasite and disease*. Vienna: Springer. ISBN-13: 978-1420052268.
19. Cama V. A., Bern, C., Roberts J., Cabrera, L., Sterling C. R., Ortega Y., Gilman R. H., Xiao L. 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerging Infectious Diseases*. 14(10): 1567-1574.
20. Cavalier-Smith T. 2014. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology*. 50(5): 472-495.
21. Certad G., Viscogliosi E., Chabe M., Cacciò S. 2017. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology*. 33(7): 561-576.
22. Cevallos A. M., Zhang, X., Waldor M. K., Jaison S., Zhou X., Tzipori S., Neutra M. R., Ward H. D. 2000. Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infection and Immunity*. 68(7): 4108-4116.
23. Chalmers R. M., Katzer F. 2013. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology*. 29(5): 237-245.

24. Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry R, Widmer G, Akiyoshi DE, Tanriverdi S, Tzipori S. 2006. *Cryptosporidium hominis*: Experimental challenge of healthy adults. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 75(5): 851-857.
25. Checkley W., White A. C. Jr, Jaganath D., Arrowood M. J., Chalmers R. M., Chen X., Fayer R., Griffiths J. K., Guerrant R. L., Hedstrom L., Huston C. D., Kotloff K. L. Kang, G., Mead J. R., Miller M., Petri W. A. Jr, Priest J. W., Roos D. S., Striepen B., Thompson R. C., Ward H. D., Van Voorhis W., Xiao L., Zhu G., Houpt E. R. 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet. Infectious Diseases*. 15(1): 85-94.
26. Chen X., Deng S., Gong A., Wang Y., Zhang X., Li M., Li J., Mathy N. 2019. Induction of a long non-coding RNA, lncRNA-Chr1:1226, by *Cryptosporidium* infection primes intestinal epithelial cells for IFN- $\gamma$ -mediated host antimicrobial gene transcription. *The Journal of Immunology*. 202(1): 935625.
27. Chen X., Huang B., Splinter P., Cao H., Zhu G., McNiven M., LaRusso N. 2003. *Cryptosporidium parvum* invasion of biliary epithelia requires host cell tyrosine phosphorylation of cortactin via c-Src. *Gastroenterology*. 125: 216-28.
28. Chroust K., Lukešová D., Modrý D., Svobodová V. 1998. Veterinární protozoologie. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno. 113 s. ISBN 8085114-27-5.
29. Crowther J. 2001. The ELISA Guidebook. Springer Science & Business Media, Berlin. 446 s. ISBN 9781607611073.
30. Current, W. L., Upton, S. J., Haynes, T. B. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology*. 33: 289-296.
31. Dann S., Wang H., Gambarin K, Actor J., Robinson P., Lewis D., Caillat-Zucman S., White C. 2005. Interleukin-15 Activates Human Natural Killer Cells to Clear the Intestinal Protozoan *Cryptosporidium*. *The Journal of Infectious Diseases*. 192(7): 1294-1302.
32. Davies A. P., Campbell B., Evans M. R., Bone A., Roche A., Chalmers R. M. 2009. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 28(9): 838-840.

- 33. Ditrich O., Kváč M., Květoňová D. 2005.** Kryptosporidióza: rizika pro imunokompetentní a imunodeficitní jedince. Seminář oportunní a opomíjené protozoární střevní nákazy. 21-26.
- 34. DuPont H., Chappell C., Sterling C., Okhuysen P., Rose J., Jakubowski W. 1995.** The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. *The New England Journal of Medicine*. 332: 855-859.
- 35. 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. *Infection and Immunity*. 69(9): 5940-5942.
- 36. European Centre for Disease Prevention and Control. 2019.** Cryptosporidiosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/cryptosporidiosis-annual-epidemiological-report-2017>
- 37. Fan Y., Feng Y. Xiao, L. 2019.** Comparative genomics: how has it advanced our knowledge of cryptosporidiosis epidemiology? *Parasitology Research*. 118: 3195-3204.
- 38. Farthing M. J. F. 2000.** Clinical aspects of human cryptosporidiosis Cryptosporidiosis and Microsporidiosis. *Contributions to Microbiology*. 6: 50-74.
- 39. Fayer R., Xiao L. 2008.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Florida, USA. ISBN 9781420052268.
- 40. Forney J. R., DeWald D. B., Yang S., Speer, C. A., Healey M. C. 1999.** A role for host phosphoinositide 3-kinase and cytoskeletal remodeling during *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*. 67(2): 844-852.
- 41. Frost, F. J., de la Cruz, A. A., Moss, D. M., Curry, M., Calderon, R. L. 1998.** Comparisons of ELISA and Western blot assays for detection of *Cryptosporidium* antibody. *Epidemiology and Infection*. 121(1): 205-211.
- 42. Frost F. J., Roberts M., Kunde T. R., Craun G., Tollestrup K., Harter L., Muller T. 2005.** How clean must our drinking water be: The importance of protective immunity. *The Journal of Infectious Diseases*. 191(5): 809-814.
- 43. Gatei W., Wamae C. N., Mbae C., Waruru A., Mulinge E., Waithera T., Gatika S. M., Kamwati S. K., Revathi G., Hart C. A. 2006.** Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 75(1): 78-82.
- 44. Heine J., Moon H., Woodmansee D. 1984.** Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic mice. *Infection and Immunity*. 43: 856-869.

45. **Hnasko R. 2015.** ELISA: methods and protocols. Humana Press, New York. ISBN 978149395385. 420s.
46. **Holubová N., Zikmundová V., Limpouchová Z., Sak B., Konečný R., Hlásková L., Rajský D., Kopacz Z., McEvoy J., Kváč M. 2019.** *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *European Journal of Protistology*. 69: 70-87.
47. **Horčíčková M., Čondlová Š., Holubová N., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R., Sedláček F., Clark M., Giddings, C., McEvoy J., Kváč, M. 2019.** Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology*. 146(2): 220-233.
48. **Hořejší V., Bartůňková J. 2017.** Základy imunologie. Triton, Praha. 304 s. ISBN 978-80-7553-250-3.
49. **Hu Y., Feng, Y., Huang C., Xiao L. 2014.** Occurrence, source, and human infection potential of *Cryptosporidium* and *Enterocytozoon bieneusi* in drinking source water in Shanghai, China, during a pig carcass disposal incident. *Environmental Science & Technology*. 48(24): 14219-14227.
50. **Hunter P. R., Hughes S., Woodhouse S., Syed, Q., Verlander N. Q., Chalmers R. M., Morgan K., Nichols G., Beeching N., Osborn K. 2004.** Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerging Infectious Diseases*. 10(7): 1241-1249.
51. **Jíra J. 2009.** Lékařská protozoologie. Galén, Praha. 567 s. ISBN 978-80-7262- 381-5.
52. **Kelly P., Jack D., Naeem A., Mandanda B., Pollok R., Klein N., Turner M., Farthing M. 2000.** Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. *Gastroenterology*. 119: 1236-1242.
53. **King P., Tyler K. M., Hunter P. R. 2019.** Anthroponotic transmission of *Cryptosporidium parvum* predominates in countries with poorer sanitation: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*. 12(1): 16.
54. **Kohl T., Ascoli C. 2017.** Indirect immunometric ELISA. Cold Spring Harbor Protocols.
55. **Körkoca H., Göz Y., Ataş A. D., Kurtoğlu M. G., Ekici K., Berктаş M. 2013.** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in asymptomatic food workers. *Turkish Journal of Parasitology*. 37(4): 241-244.

- 56. Kotloff K., Nataro J., Blackwelder W., Nasrin D., Farag T., Panchalingam S., Wu Y., Sow, S., Sur, D., Breiman R., Faruque A., Zaidi, A., Saha D., Alonso P., Tamboura B., Doh, U., Manna B., Ramamurthy T., Levine M. 2013.** Burden and Aetiology of Diarrhoeal Disease in Infants and Young Children in Developing Countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A Prospective, Case-Control Study. *Lancet*. 9888(382): 209-222.
- 57. Kovalenko G. 2014.** Kryptosporidióza domácích ptáků (šíření, diagnostika, patogeneze, prevence). *Veterinární medicína Ukrajiny*. 10: 25-27.
- 58. Kovats R. S., Grundy C. 2007.** Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. *European Journal of Epidemiology*. 22(11): 805-811.
- 59. Kozisek F., Craun G. F., Cerovska L., Pumann P., Frost, F., Muller T. 2008.** Serological responses to *Cryptosporidium*-specific antigens in Czech populations with different water sources. *Epidemiology and Infection*. 136(2): 279-286.
- 60. Kozomara A., Griffiths-Jones S. 2011.** miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 39: 152-157.
- 61. Kuhls T., Mosier D., Crawford D., Griffis J. 1994.** Seroprevalence of Cryptosporidial Antibodies During Infancy, Childhood, and Adolescence. *Clinical Infectious Diseases*. 18(5): 731-735.
- 62. Kváč M., Květoňová D., Ditrich O. 2005.** Kryptosporidie a životní prostředí. Seminář oportunní a opomíjené protozoární střevní nákazy. 29-32.
- 63. Kváč M., Sak B., Kvetonová D., Secor W. E. 2009.** Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Veterinary Parasitology*. 163(1-2): 33-38.
- 64. Plutzer J., Lassen B., Jokelainen P. Djurković-Djaković O., Kucsera I., Dorbek-Kolin E., Šoba B., Sréter T., Imre K., Omeragić J., Nikolić A., Bobić B., Živičnjak T., Lučinger S., Stefanović L. L., Kučinar J., Sroka J., Deksne G., Keidāne D., Kváč M., Hůzová Z., Karanis P. 2018.** Review of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the eastern part of Europe, 2016. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 23(4): 816-825.
- 65. Lake I. R., Harrison, F. C., Chalmers R. M., Bentham, G., Nichols G., Hunter P. R., Kovats R. S., Grundy C. 2007.** Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. *European Journal of Epidemiology*. 22(11): 805-811.

- 66. Laurent F., Kagnoff M. F., Savidge T. C., Naciri M., Eckmann L. 1998.** Human intestinal epithelial cells respond to *Cryptosporidium parvum* infection with increased prostaglandin H synthase 2 expression and prostaglandin E2 and F2 alpha production. *Infection and Immunity*. 66(4): 1787-1790.
- 67. LeChevallier M. W., Norton, W. D., Siegel J. E., Abbaszadegan M. 1995.** Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(2): 690-697.
- 68. Lendner M., Dauschies A. 2014.** *Cryptosporidium* infections: Molecular advances. *Parasitology*. 141(11): 1-22.
- 69. Liu N., Olson E. N. 2010.** MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Developmental Cell*. 18(4): 510-525.
- 70. Liu J., Deng, M., Lancto C. A., Abrahamsen M. S., Rutherford M. S., Enomoto S. 2009.** Biphasic modulation of apoptotic pathways in *Cryptosporidium parvum*-infected human intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*. 77(2): 837-849.
- 71. Lumb R. Smith K., O'Donoghue P., Lanser J. 1988.** Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitology Research*. 74: 531-536.
- 72. Ma P., Soave R. 1983.** Three-Step Stool Examination for Cryptosporidiosis in 10 Homosexual Men with Protracted Watery Diarrhea. *The Journal of Infectious Diseases*. 147(5): 824-828.
- 73. Mahmoudi M., Ongerth J., Karanis P. 2017.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis: The Asian perspective. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 220(7): 1098-1109.
- 74. Messner M. J., Berger P. 2016.** *Cryptosporidium* Infection Risk: Results of New Dose-Response Modeling. *Risk Analysis*. 36: 1969-1982.
- 75. Miron D., Colodner R., Kenes Y. 2000.** Age-related seroprevalence of *Cryptosporidium* in northern Israel. *The Israel Medical Association Journal*. 2(5): 343-345.
- 76. Moss D., Chappell C., Okhuysen P., DuPont H., Arrowood M., Hightower A., Lammie P. 1998.** The Antibody Response to 27-, 17-, and 15-kDa *Cryptosporidium* Antigens following Experimental Infection in Humans, *The Journal of Infectious Diseases*. 178(3): 827-833.



- 77. Miláček P., Vítovec J. 1985.** Differential staining of cryptosporidia by anilinecarbonyl-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica*. 32: 50.
- 78. Naumova E. N., Egorov A. I., Morris R. D., Griffiths J. K. 2003.** The elderly and waterborne *Cryptosporidium* infection: gastroenteritis hospitalizations before and during the 1993 Milwaukee outbreak. *Emerging Infectious Diseases*. 9(4): 418-425.
- 79. Osman M., El Safadi D., Cian A., Benamrouz S., Nourrisson C., Poirier P., Pereira B., Razakandrainibe R., Pinon, A., Lambert C., Wawrzyniak I., Dabboussi F., Delbac F., Favennec L., Hamze M., Viscogliosi E., Certad G. 2016.** Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 10(3).
- 80. Owen J. A., Punt. J., Stranford S. A., Jones P., 2018.** Kuby immunology. W.H. Freeman, Macmillan Learning, New York. 832 s. ISBN:9781464189784
- 81. Painter J., Gargano J., Yoder J., Collier S., Hlavsa M. 2016.** Evolving epidemiology of reported cryptosporidiosis cases in the United States, 1995-2012. *Epidemiology and Infection*. 144(8): 1792-1802.
- 82. Pokhil S. I., Torianik I. I., Timchenko Ye. N., Chigirinskaya N. À., Kostyria I. À., Torak T. Î., Chemerys S. A. 2017.** Cryptosporidiosis: a new medical and social problem. The principal way of decision (brief analysis of scientific, theoretical and patent information). *Ukrainian Scientific Journal of Urology, Andrology, Nephrology*. 21(4) (článek v ukrajinštině).
- 83. Poletaeva E. 2010.** Šíření kryptosporidiózy u prasat. *Veterinární Medicína*. 93: 327-330 (článek v ukrajinštině).
- 84. Pospíšilová Z., Ditrich O., Stanková M., Kodým P. 1998.** Parasitic opportunistic infections in Czech HIV-infected patients. *Central European Journal of Public Health*. 5: 208-213.
- 85. Priest J. W., Kwon J. P., Moss D. M., Roberts J. M., Arrowood M. J., Dworkin M. S., Juranek D. D., Lammie P. J. 1999.** Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(5): 1385-1392.
- 86. Pumann P., Šašek J. 2004.** Přístupy ke sledování parazitických prvoků ve vodách (s důrazem na *Cryptosporidium*). Seminář Problematika prvoků rodu *Cryptosporidium* a *Giardia* ve vodě. Státní zdravotní ústav v Praze.

- 87. Putignani L., Menichella D. 2010.** Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2010: 753512.
- 88. Ramsay C. N., Wagner A. P., Robertson C., Smith H. V., Pollock K. G. 2014.** Effects of drinking-water filtration on *Cryptosporidium* seroepidemiology, Scotland. *Emerging Infectious Diseases*. 20(1): 70-76.
- 89. Reh L., Muadica A. S., Köster P. C. Balasegaram S. Verlander N. Q. Chércoles E. R., Carmena D. 2019.** Substantial prevalence of enteroparasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in asymptomatic schoolchildren in Madrid, Spain, November 2017 to June 2018. *Euro Surveill*. 24(43): 1900241.
- 90. Riggs M. 2002.** Recent advances in cryptosporidiosis: The immune response. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*. 4(10):1067-1080.
- 91. Robertson L. J., Campbell A. T., Smith, H. V. 1992.** Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(11): 3494-3500.
- 92. Robinson P., Okhuysen P. C., Chappell C. L., Lewis D. E., Shahab I., Janecki A., White A. C. Jr 2001.** Expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in jejunum of volunteers after experimental challenge with *Cryptosporidium parvum* correlates with exposure but not with symptoms. *Infection and immunity*. 69(2): 1172-1174.
- 93. Rochelle P. A., Fallar, D., Marshall M. M., Montelone B. A., Upton S. J. and Woods K. 2004.** Irreversible UV Inactivation of *Cryptosporidium* spp. Despite the Presence of UV Repair Genes1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 51: 553-562.
- 94. Roy S. L., DeLong S. M., Stenzel S. A., Shiferaw B., Roberts J. M., Khalakdina A., Marcus R., Segler S. D., Shah D. D., Thomas S., Vugia D. J., Zansky S. M., Dietz V., Beach M. J. & Emerging Infections Program FoodNet Working Group 2004.** Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(7): 2944-2951.
- 95. Ryan U., Fayer R., Xiao L. 2014.** *Cryptosporidium* species in humans and animals: Current understanding and research needs. *Parasitology*. 141(13): 1667-1685.
- 96. Shepherd R., C. Smail P. J., Sinha G. P. 1989.** Reactive arthritis complicating cryptosporidial infection. *Archives of Disease in Childhood*. 64(5): 743-744.
- 97. Shulezhko V., Snisarenko V. 2011.** Kryptosporidióza: Diagnostika a interpretace Výsledků Výzkumu. *Zprávy z Medicíny a Farmacie*. 17(386). (článek v ukrajinštině).

- 98. Schonrock N., Harvey R., Mattick J. 2012.** Long Noncoding RNAs in Cardiac Development and Pathophysiology. *Circulation Research*. 111: 1349-1362.
- 99. Sorvillo F., Lieb L., Kerndt P., Ash L. 1994.** Epidemiology of Cryptosporidiosis Among Persons with Acquired Immunodeficiency Syndrome in Los Angeles County. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 51(3): 326-331.
- 100. Sparks H., Nair G., Castellanos-Gonzalez A., White A. C. Jr 2015.** Treatment of *Cryptosporidium*: What We Know, Gaps, and the Way Forward. *Current Tropical Medicine Reports*. 2(3): 181-187.
- 101. Squire S. A., Ryan U. 2017.** *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasites & Vectors*. 10(1): 195.
- 102. Taghi-Kilani R., Sekla L., Hayglass K.T. 1990.** The role of humoral immunity in *Cryptosporidium* spp. infection. Studies with B cell-depleted mice. *The Journal of Immunology*. 145: 1571-1576
- 103. Théry C. 2011.** Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *FI000 Biology Reports*. 3: 15.
- 104. Thompson, R.A. Fayer R, Xiao L, 2008.** *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *Parasites & Vectors*. 1: 47.
- 105. Tomley F., Soldati D. 2001.** Mix and match modules: Structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends in Parasitology*. 17(2): 81-88.
- 106. Tyzzer E. E. 1907.** A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology*. 5: 12-13.
- 107. Tyzzer E. E. 1912.** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde*. 26: 394-412.
- 108. Ungar B., Gilman R., Lanata C., Perez-Schael I. 1988.** Seroepidemiology of *Cryptosporidium* Infection in Two Latin American Populations. *The Journal of Infectious Diseases*. 157(3): 551-556.
- 109. Vandenberg O, Robberecht F, Dauby N, Moens C., Talabani H., Dupont E., Menotti J., van Gool T., Levy J. 2012.** Management of a *Cryptosporidium hominis* outbreak in a day-care center. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 31(1): 10-15.
- 110. Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. 2014.** IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*. 5: 520.
- 111. Wanyiri J. W., Kanyi H., Maina S., Wang D. E., Steen A., Ngugi P., Kamau T., Waithera T., O'Connor R., Gachuhi K., Wamae C. N., Mwamburi M., Ward H.**

- D. 2014.** Cryptosporidiosis in HIV/AIDS patients in Kenya: clinical features, epidemiology, molecular characterization and antibody responses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 91(2): 319-328.
- 112. Wynn T. 2003.** IL-13 Effector functions. *Annual Review of Immunology*. 21: 425-456.
- 113. Xiao L. 2009.** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*. 124: 80-89.