

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vývoj protilátkové imunitní odpovědi proti
kryptosporidiovým infekcím**

Bakalářská práce

Jana Tinavská

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

Školitel specialista: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

České Budějovice 2021

Tinavská J., (2021): Vývoj protilátkové imunitní odpovědi proti kryptosporidiovým infekcím [Development of humoral immune response against cryptosporidial infections, Bc. Thesis, in Czech] – 61 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This bachelor thesis is focused on the development of humoral immune response against cryptosporidial infections in BALB/c mice. Mice were infected with various *Cryptosporidium* spp., namely *C. parvum*, *C. proliferans*, *C. baileyi* and *C. andersoni*. *Cryptosporidium*-specific IgG antibodies were detected by ELISA. In this work, cross-reactivity of antibodies with different *Cryptosporidium* species was also monitored.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

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 fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 13. dubna 2021

.....
podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala hlavně svému školiteli prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za odborné vedení mé práce, cenné rady a trpělivost. Děkuji také všem pracovníkům Laboratoře veterinární a lékařské protistologie, Parazitického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za jejich ochotu a přátelské prostředí. V neposlední řadě děkuji mé rodině a příteli za podporu při studiu a psaní bakalářské práce.

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

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GAČR 18-12364S a 21-23773S (řešitel prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

Obsah

1	Úvod.....	6
2	Literární přehled	7
2.1	Rod <i>Cryptosporidium</i>	7
2.1.1	Historie.....	7
2.1.2	Taxonomie	9
2.1.3	Zdroj a přenos infekce	9
2.1.4	Prepatentní a patentní perioda.....	10
2.1.5	Klinické projevy	10
2.1.6	Životní cyklus	10
2.1.7	Vybrané druhy rodu <i>Cryptosporidium</i>	12
2.2	Imunitní systém a imunitní odpověď	13
2.2.1	Vrozená imunita.....	13
2.2.2	Adaptivní imunita	14
2.2.3	Imunita proti kryptosporidiióze	14
2.2.4	Cytokinová kontrola imunitní odpovědi	19
2.2.5	Specifická protilátková odpověď	19
2.2.6	ELISA test.....	20
3	Cíle práce	22
4	Materiál a metodika	23
4.1	Materiál	23
4.1.1	Paraziti	23
4.1.2	Experimentální zvířata	23
4.2	Metody	24
4.2.1	Purifikace oocyst.....	24
4.2.2	Sacharózový gradient.....	24
4.2.3	Cesium chloridový gradient.....	25
4.2.4	Barvení nátěru trusu anilin-karbol-methyl-violetí	25
4.2.5	Průběh experimentu	26
4.2.6	Nepřímá ELISA	27
4.2.7	Hodnocení metody ELISA.....	30
5	Výsledky	32
5.1	Průběh infekce.....	32
5.1.1	Průběh infekce u <i>Cryptosporidium parvum</i>	32
5.1.2	Průběh infekce u <i>Cryptosporidium proliferans</i>	32

5.1.3	Průběh infekce u <i>Cryptosporidium baileyi</i> a <i>Cryptosporidium andersoni</i>	35
5.2	Vývoj protilátkové odpovědi	35
5.2.1	Vývoj protilátkové odpovědi u <i>Cryptosporidium parvum</i>	35
5.2.2	Vývoj protilátkové odpovědi u <i>Cryptosporidium proliferans</i>	35
5.2.3	Vývoj protilátkové odpovědi u <i>Cryptosporidium baileyi</i> a <i>Cryptosporidium andersoni</i>	36
5.3	Zkřížená reakce protilátek na různé korpuskulární antigeny	36
6	Diskuse	38
7	Závěr	42
8	Seznam zkratk	43
9	Seznam použité literatury	44

1 Úvod

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou kosmopolitně rozšíření parazitární prvoci, kteří infikují epitelální buňky gastrointestinálního traktu všech tříd obratlovců. Průběh infekce se liší podle druhu kryptosporidie a druhu, věku a imunitního stavu hostitele. Některé druhy kryptosporidií jako například *C. parvum*, infikují více druhů hostitelů, jiné se omezují na skupiny, jako jsou hlodavci nebo přežvýkavci a o dalších je známo, že napadají pouze jeden hostitelský druh, například *C. baileyi* (Fayer a Xiao 2008). U většiny lidských infekcí je identifikován druh *C. hominis*, ty zoonotické způsobuje hlavně druh *C. parvum* (Checkley et al. 2015). Kryptosporidie infikují především žaludek, střeva a respirační trakt svých hostitelů. Onemocnění vyvolané těmito parazity nazýváme kryptosporidióza. Může se projevovat jako akutní, ale také jako chronické onemocnění. Nejčastěji je průběh infekce doprovázen silným průjmovým onemocněním spojeným s úbytkem hmotnosti a dehydratací, nejen u mláďat různých druhů zvířat, ale také u dětí a osob s poruchami imunitního systému, zejména u pacientů s AIDS (Chen a LaRusso 2002; Fayer 2000; Fayer a Xiao 2008). Infekce je přenášena zejména fekálně-orální cestou, nejčastěji kontaminovanou vodou a potravou, dále je častý přenos přímým kontaktem s infikovaným zvířetem nebo osobou (Bouزيد et al. 2013).

2 Literární přehled

2.1 Rod *Cryptosporidium*

2.1.1 Historie

První vědec, který rozpoznal, jasně popsal a zveřejnil zprávu o parazitu, kterého často nacházel v žaludečních žlázách laboratorních myší, byl Ernest Edward Tyzzer. V roce 1907 popsal jeho vývojová stádia (Tyzzer 1907). Zjistil, že oocysty jsou z hostitele vylučovány spolu s exkrementy. Identifikoval parazita, který neměl přítomný sporocystový obal uvnitř oocysty a pojmenoval jej *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1910). V roce 1912 následovalo popsání dalšího (dnes nejvíce prozkoumaného) druhu *Cryptosporidium parvum*, nalezeného v tenkém střevě myši domácí, jenž má znatelně menší oocysty než *C. muris* (Tyzzer 1912).

Na počátku sedmdesátých let byly kryptosporidie označeny za původce průjmových onemocnění skotu (Panciera et al. 1971). Ve druhé polovině sedmdesátých let byly zaznamenány první dva případy lidské kryptosporidiózy (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976). Kryptosporidie byly potvrzeny u dvou imunosuprimovaných pacientů sdílejících společnou domácnost. Oba pacienti byli v přímém kontaktu s dobyt看em a trpěli silným průjmem (Lasser et al. 1979).

Další zájem o studie kryptosporidií vzrostl v roce 1993, kdy propukla epidemie vodnatého průjmu obyvatel v Milwauke (Wisconsin, USA). Odhaduje se, že bylo infikováno přibližně 403 000 lidí. Bylo zjištěno, že příčinou epidemie byla přítomnost oocyst ve vodě, které prošly nepoškozené i přes filtrační systém čističky vod (Mac Kenzie et al. 1994). Následné molekulární analýzy prokázaly, že původce této dosud největší epidemie byl druh *C. hominis*.

Od konce devadesátých let minulého století, spolu s rozvojem molekulárních metod, došlo v rámci studia k výraznému posunu znalostí diverzity kryptosporidií. Doposud bylo popsáno a uznáno 47 druhů kryptosporidií. Seznam platných druhů je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*.

Druh	Hostitelé	Lokalizace	Reference
<i>C. abrahamseni</i>	ryby	střevo	Zahedi et al. 2021
<i>C. alticolis</i>	hraboš obecný	tenké střevo	Horčíčková et al. 2019
<i>C. andersoni</i>	skot	žaludek	Lindsay et al. 2000
<i>C. apodemi</i>	myšice	střevo	Čondlová et al. 2018
<i>C. avium</i>	ptáci	střevo	Holubová et al. 2016
<i>C. baileyi</i>	drůbež	střevo, dýchací a močové cesty	Current et al. 1986
<i>C. bollandi</i>	ryby	žaludek	Bolland et al. 2020
<i>C. bovis</i>	skot	tenké střevo	Fayer et al. 2005
<i>C. canis</i>	psi	tenké střevo	Fayer et al. 2001
<i>C. cichlidis</i>	ryby	tenké střevo	Paperna a Vilenkin 1996
<i>C. cuniculus</i>	králíci a lidé	tenké střevo	Robinson et al. 2010; Inman a Takeuchi 1979
<i>C. ditrichi</i>	myšice	tenké střevo	Čondlová et al. 2018
<i>C. ducismarci</i>	želvy	střevo	Ježková et al. 2016
<i>C. erinacei</i>	ježci	tenké střevo	Kváč et al. 2014
<i>C. fayeri</i>	klokani	tenké střevo	Ryan et al. 2008
<i>C. felis</i>	kočky	tenké střevo	Iseki 1979
<i>C. fragile</i>	žáby	žaludek	Jirků et al. 2008
<i>C. galli</i>	ptáci	žláznatý žaludek	Ryan et al. 2003
<i>C. homai</i>	morče	střevo	Zahedi et al. 2017
<i>C. hominis</i>	lidé	tenké střevo	Morgan-Ryan et al. 2002
<i>C. huwi</i>	ryby	žaludek	Ryan et al. 2015
<i>C. macropodum</i>	klokani	střevo	Power a Ryan 2008
<i>C. meleagridis</i>	drůbež a lidé	střevo	Slavin 1955
<i>C. microti</i>	hraboš obecný	tlusté střevo	Horčíčková et al. 2019
<i>C. molnari</i>	ryby	střevo	Alvarez-Pellitero a Sitjà-Bobadilla 2002
<i>C. muris</i>	hlodavci	žaludek	Tyzzler 1910; 1907
<i>C. natoris</i>	ryby	střevo	Hoover et al. 1981
<i>C. occultus</i>	potkani	tlusté střevo	Kváč et al. 2018
<i>C. ornithophilus</i>	ptáci	tlusté střevo	Holubová et al. 2020
<i>C. parvum</i>	savci	tenké střevo	Upton a Current 1985
<i>C. proliferans</i>	hlodavci	žaludek	Kváč et al. 2016
<i>C. proventriculi</i>	papoušci	žaludek	Holubová et al. 2019
<i>C. reichenbachklinkei</i>	ryby	žaludek	Paperna a Vilenkin 1996
<i>C. ratti</i>	potkani	tlusté střevo	Ježková et al. 2021
<i>C. rubeyi</i>	veverky	střevo	Li et al. 2015
<i>C. ryanae</i>	skot	tenké střevo	Fayer et al. 2008
<i>C. scophalmi</i>	ryby	střevo	Alvarez-Pellitero et al. 2004
<i>C. scrofarum</i>	prasata	střevo	Kváč et al. 2013
<i>C. serpentis</i>	plazi	žaludek	Levine 1980
<i>C. suis</i>	prasata	střevo	Ryan et al. 2004
<i>C. testudinis</i>	želvy	neznámý	Ježková et al. 2016
<i>C. tyzzeri</i>	myši	tenké střevo	Ren et al. 2012

Tabulka 1. Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium* (pokračování).

Druh	Hostitelé	Lokalizace	Reference
<i>C. ubiquitum</i>	ovce a kozy	střevo	Fayer et al. 2010
<i>C. varanii</i>	plazi	střevo	Pavlásek a Ryan 2008
<i>C. viatorum</i>	lidé	neznámý	Elwin et al. 2012
<i>C. wrairi</i>	morčata	tenké střevo	Vetterling et al. 1971
<i>C. xiaoi</i>	ovce a kozy	střevo	Fayer a Santín 2009

2.1.2 Taxonomie

Rod *Cryptosporidium* je řazen do třídy Apicomplexa. Charakteristickým znakem této třídy je přítomnost apikálního komplexu, který slouží k infekci hostitelské buňky (Fayer a Xiao 2008). Na rozdíl od ostatních apikomplex nebyl u kryptosporidií jednoznačně prokázán apikoplast, zbytek plastidu získaného během fylogeneze od endosymbionta, i když bylo nalezeno minimálně 7 genů pravděpodobně z apikoplastu pocházejících. Dalších minimálně 24 genů pochází pravděpodobně z prokaryotického endosymbionta (Waller a McFadden 2005; Zhu et al. 2000). Postavení rodu *Cryptosporidium* je z taxonomického pohledu poměrně nestálé. Původně byly kryptosporidie řazeny mezi kokcidie, a to především na základě podobností morfologických a vývojového cyklu. Avšak molekulární analýzy odhalily jejich blízký vztah ke gregarinám (Carreno et al. 1999).

2.1.3 Zdroj a přenos infekce

Kryptosporidie se šíří fekálně-orální cestou. Rozlišují se dva základní způsoby přenosu infekce. Prvním způsobem může být přímý kontakt s infikovaným jedincem, tedy člověk a zvíře, člověk a člověk nebo zvíře a zvíře, anebo druhým způsobem přenosu infekce je požití kontaminované vody či potravy (Cacciò a Widmer 2014). Právě kontaminovaná voda bývá nejčastějším zdrojem nákazy, protože oocysty s trilaminární strukturou stěny jsou velmi odolné vůči negativním podmínkám vnějšího prostředí a mohou přežívat i ve vodě. Ke kontaminaci vody nebo potravy dochází výkaly nebo stolicí obsahujícími oocysty (Fayer a Xiao 2008).

2.1.4 Prepatentní a patentní perioda

V průběhu infekce rozlišujeme prepatentní a patentní periodu. Prepatentní perioda je období od nákazy po výskyt prvních vývojových stádií, například vajíček, cyst, oocyst nebo larev ve zkoumaném vzorku (krev, trus). Délka prepatentní periody kryptosporidiových infekcí závisí na druhu kryptosporidie, druhu a věku hostitele a imunitním stavu hostitele. Délku prepatentní periody výrazně neovlivňuje výše infekční dávky (Champelle et al. 1999). Prepatentní perioda byla stanovena u řady druhů na základě experimentálních infekcí. Například u lidí s infekcí *C. parvum* se pohybuje v rozmezí od 4 do 22 dnů, u telat s infekcí stejným druhem od 2 do 7 dnů (DuPont et al. 1995; Tzipori 1983), nebo u kuřat infikovaných *C. baileyi* 4 až 24 dní (Current et al. 1986). Naopak patentní perioda je označení pro dobu, kdy je parazit v hostiteli přítomen (Svobodová et al. 2013). Délky patentních period se pohybují od 1 do 12 dní u telat, 1 až 20 dní u lidí s infekcí *C. parvum* (Fayer a Xiao 2008; Tzipori 1983), a u kuřat infikovaných *C. baileyi* netrvá patentní perioda déle než 18 dní (Current et al. 1986).

2.1.5 Klinické projevy

Klinické projevy kryptosporidíózy jsou závislé především na stavu hostitele, druhu parazita, ale také na lokalizaci infekce v těle hostitele. Kryptosporidíóza byla identifikována u imunokompetentních i imunokompromitovaných jedinců. Hlavním klinickým projevem onemocnění je obvykle silný průjem. Závažnost nemoci a další klinické příznaky, jako jsou například bolest břicha, malátnost, zvracení nebo zvýšená tělesná teplota se mohou lišit v závislosti na imunitním stavu a věku postiženého jedince (Cacciò a Widmer 2014; Jíra 2009).

Inkubační doba od počátku infekce k nástupu příznaků, se může pohybovat od 1 dne do 1 měsíce v závislosti na druhu kryptosporidie a na imunitním stavu hostitele (Cacciò a Widmer 2014).

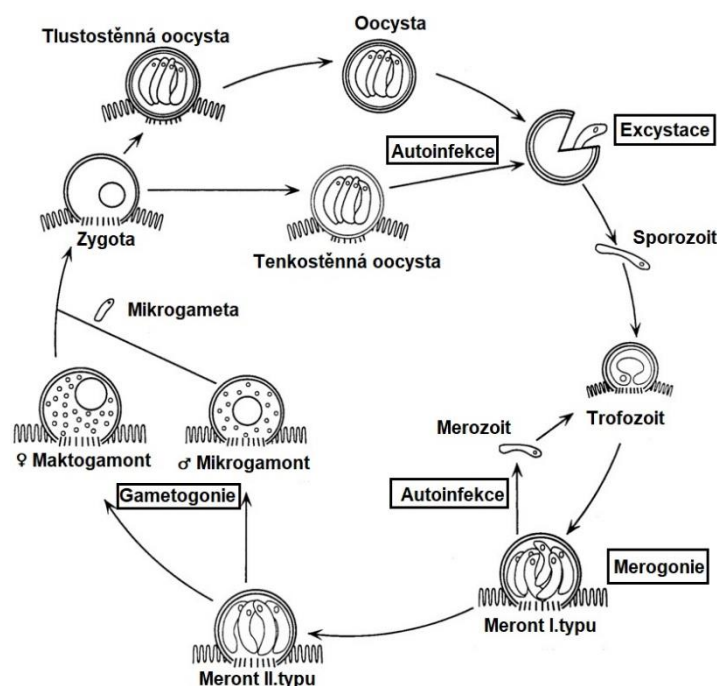
2.1.6 Životní cyklus

Životní cyklus parazita je dokončen v jednom hostiteli, jedná se tedy o monoxenní cyklus, a zahrnuje jak asexuální, tak sexuální replikaci (Fayer a Xiao 2008). Životní cyklus zahrnuje fáze – excystaci, merogonii, gamogonii a sporogonii (Obrázek 1). Nejpodrobněji byl do nedávna prozkoumaný životní cyklus střevního druhu *C. parvum*, ale cykly ostatních druhů, *C. baileyi*, *C. muris* nebo

C. proliferans, se příliš neliší (Current et al. 1986; Kváč et al. 2016; Melicherová et al. 2014).

První krok k infekci je excystace. Z oocysty se uvolňují sporozoiti, kteří se epicelulárně přemění na trofozoity. Jádro trofozoita se rozdělí a nastává merogonie, což je opakované mnohonásobné nepohlavní dělení, přičemž vznikají meronti dvojího typu. Meronti I. typu se dále dělí na 6–8 merozoitů, kteří infikují další hostitelské buňky a vyvíjejí se v další meronty I. nebo II. typu. Následuje gametogonie, sexuální rozmnožování, které spouští meront II. typu. Při gametogonii vznikají samčí mikrogamonti a samičí makrogamonti. Dále z nich vznikají mikrogamety a makrogamety (Fayer a Xiao 2008). Uvolněné mikrogamety splývají s makrogametou a výsledkem je jedno diploidní stádium – zygota, která prodělává podobný proces meióze a vzniká oocysta (Clode et al. 2015). Schéma vývojového cyklu je uvedeno na obrázku 1 (Slifko et al. 1997).

Většina oocyst má silnou stěnu a opouští tělo hostitele s výkaly (druhy infikující epitel střeva či žaludku) nebo případně hlenem (druhy infikující plicní epitel). Nicméně i druhy osidlující plicní epitel jsou většinu vylučovány výkaly. Přítomnost tenkostěnných oocyst je prokázána u 20 % z celkového počtu oocyst. Tyto oocysty excystují v těle hostitele a jsou zodpovědné za případy autoinfekce (Aldeyarbi a Karanis 2016).



Obrázek 1. Vývojový cyklus *Cryptosporidium* spp., (Slifko et al. 1997). Upraveno.

2.1.7 Vybrané druhy rodu *Cryptosporidium*

Pro tuto práci byli vybráni čtyři zástupci z rodu *Cryptosporidium*. Byli vybráni na základě hostitelské specifity a lokalizace infekce v těle hostitele. Dalším důvodem pro výběr těchto parazitů byla dostupnost velkého množství oocyst nezbytných pro účely této práce.

Cryptosporidium parvum

Cryptosporidium parvum je druh s nejširším hostitelským spektrem. Tato kryptosporidie parazituje ve střevě savců, včetně člověka, je ale infekční i pro některé ptáky (Holubová et al. 2019). Infekce imunokompetentních jedinců se projevuje akutními nebo chronickými průjmy různé intenzity, u imunodeficientních pacientů představuje tato infekce život ohrožující onemocnění (Cacciò a Widmer 2014).

Cryptosporidium proliferans

Cryptosporidium proliferans je druh adaptovaný primárně na hlodavce, ale byly popsány i ojedinělé infekce kopytníků (Kváč et al. 2016). Vyvíjí se výhradně ve žláznaté části žaludku, podobně jako *C. muris* a *C. andersoni*. Prepatentní perioda se pohybuje v rozmezí 6 až 21 dní, a je tedy delší než u druhu *C. muris* (Kváč et al. 2016; Melicherová et al. 2014). Naopak patentní perioda (doba vylučování oocyst) může trvat několika dní, měsíců nebo dokonce let (Kváč et al. 2016).

Cryptosporidium baileyi

Cryptosporidium baileyi bylo poprvé popsáno roku 1986 u brojlerových kuřat (*Gallus gallus* f. *domestica*) (Current et al. 1986). Tento druh je adaptovaný na ptáky. *Cryptosporidium baileyi* napadá respirační trakt a kloaku ptáků, a proto k hlavním klinickým příznakům patří potíže s dýcháním, kýčání a výtok z nostril a průjem. Právě napadení dýchacího traktu způsobuje vysokou mortalitu (Lindsay a Blagburn 1990). Infekce ve většině případů způsobuje úhyn ptačího hostitele (van Zeeland et al. 2008).

Cryptosporidium andersoni

Tento druh kryptosporidií byl poprvé popsán z výkalů skotu (*Bos taurus*). Oocysty jsou strukturně podobné těm, které byly popsány u myši *C. muris*, ale jsou například větší než u *C. parvum* (Lindsay et al. 2000).

Cryptosporidium andersoni je parazit, který infikuje výhradně žláznatý žaludek. Infekce tímto druhem jsou u skotu většinou asymptomatické. Výjimečně mohou být pozorovány klinické projevy, zejména gastritida, pokles produkce mléka a nižší váhový přírůstek (Wang et al. 2011).

2.2 Imunitní systém a imunitní odpověď

Organismus je schopen rozeznávat a likvidovat cizí i vlastní škodlivé struktury, čímž je zajištěna integrita organismu. K tomu využívá vrozenou i adaptivní imunitu založenou na obranných mechanismech humorálních i buněčných zprostředkovaných složek (Hořejší et al. 2017).

2.2.1 Vrozená imunita

Nespecifická, neboli vrozená imunita představuje první obrannou linii organismu. Je evolučně starší a vyskytuje se v různé míře u všech mnohobuněčných organismů. Jedním z nejdůležitějších znaků vrozené imunity je absence imunologické paměti. Nespecifická imunita tak není ovlivněna předchozím setkáním s antigenem, a díky tomu zasahují příslušné buňky vždy stejnou silou, a to i po opakovaném kontaktu s konkrétním typem antigenu (Hořejší et al. 2017).

Vrozená imunita zahrnuje složku buněčnou reprezentovanou buňkami myeloidní linie a NK (natural killer) buňkami, které jsou charakterizovány produkcí cytokinů vyvolávajících zánět a stimulujících antimikrobiální obranu buňkami v místě infekce. Produkované cytokiny dále aktivují makrofágy, neutrofile a eosinofily (Janeway et al. 2001; Toman et al. 2009). Další složkou nespecifické imunity je složka humorální, tvořenou komplementovým systémem a mnohými sérovými proteiny (Toman et al. 2009). Neimunitní buňky, například epitelální buňky, mají také imunologické funkce, jako je schopnost produkovat cytokiny a antimikrobiální peptidy (Fayer a Xiao 2008).

2.2.2 Adaptivní imunita

Specifická neboli adaptivní imunita se od té nespecifické liší tím, že je fylogeneticky novější, je tedy mladší a vyskytuje se pouze u obratlovců. K hlavním rozdílům mezi nespecifickou a specifickou imunitou patří schopnost specificky rozpoznávat cizorodé struktury a imunologická paměť. Díky těmto vlastnostem je každá buňka adaptivní imunity geneticky předurčena k rozpoznání pouze jednoho druhu antigenu, kdy opakované setkání s konkrétním antigenem vyvolá vždy o něco rychlejší a efektivnější imunitní odpověď, tzv. sekundární (anamnestickou) odpověď (Hořejší et al. 2017).

Specifická imunita je tvořena buněčnou složkou, tedy T lymfocyty, a složkou humorální, kam řadíme především B lymfocyty, které produkují protilátky, a cytokiny (Hořejší et al. 2017). V rámci T lymfocytární populace můžeme definovat několik funkčně odlišných subpopulací. K nejdůležitějším patří subpopulace pomocných T lymfocytů (povrchový znak CD4) a subpopulace cytotoxických T lymfocytů, pro které je typická povrchová molekula CD8 (Krejsek et al. 2016). Účinnost adaptivní imunity závisí hlavně na příjmu signálů CD4⁺ T lymfocytů a dále na intenzivní tvorbě, vývoji a diferenciaci T a B lymfocytů do aktivních forem. CD4⁺ T lymfocyty se aktivují při kontaktu s buňkami prezentující antigen (APC), jako jsou dendritické buňky a makrofágy a hlavně organizují povahu adaptivní imunity (Cacciò a Widmer 2014). T lymfocyty následně aktivují B lymfocyty k proliferaci a diferenciaci na plazmatické buňky, které produkují protilátky (Kalia et al. 2006).

K úplnému rozvoji adaptivní imunity dochází během několika dnů až týdnů. Její aktivace je přitom založena na klonálním (anticipačním) principu, díky kterému imunitní systém předvídá setkání s jakýmkoliv typem antigenu. Toho je dosaženo množstvím odlišných typů T a B lymfocytů, které jsou v organismu vždy předem připraveny (Hořejší et al. 2017).

2.2.3 Imunita proti kryptosporidióze

Z níže citovaných studií vyplývá, že specifická imunitní odpověď je zatím jediný známý efektivní mechanismus vedoucí k vyléčení hostitele z kryptosporidiózy. Jiná účinná terapie nebyla dosud popsána (Hommer et al. 2003). Znalosti o imunitní odpovědi na kryptosporidiovou infekci pochází ze studií provedených

na *C. parvum*, což je střevní druh, který je ale věkově specifický a dospělí hostitelé k němu nejsou vnímaví (McDonald et al. 2013; Tyzzer 1912).

U imunokompetentního jedince vyvolá parazit silnou protilátkovou odpověď. I přes to, že sérové protilátky nemají jednoznačný protektivní účinek, tak některé studie uvádí, že podané protilátky mohou ve střevním lumenu pomoci hostiteli zvládnout infekci (Doyle et al. 1993). Velmi důležitou roli při probíhající infekci hraje počet CD4⁺ T lymfocytů. Studie prováděné u pacientů s AIDS zjistily, že při počtu 180 CD4⁺ T lymfocytů na mm³ krve dojde ke spontánnímu uzdravení za 4 týdny. U nižšího počtu pomocných T lymfocytů došlo k rozvoji chronické infekce (Clark a Sears 1996).

2.2.3.1 Úloha T-lymfocytů ve vývoji protektivní imunity

Morfologická studie prokázala, že během střevní kryptosporidiózy dochází k poškození sliznice střeva, například atrofii mikrovilů a hyperplázii krypt, která je charakteristická pro patologii vyvolanou T lymfocyty (MacDonald a Spencer 1992).

Infekce *C. parvum* vede k významnému zvýšení subpopulací T lymfocytů v mukózním epitelu (Abrahamsen et al. 1997; Boher et al. 1994). Jakmile se infekce dostane pod kontrolu, velikost subpopulací T lymfocytů ve střevě klesá na normální hladinu (Abrahamsen et al. 1997). První přímý důkaz toho, že T lymfocyty jsou nezbytné pro potlačení infekce *Cryptosporidium* spp., ukazuje studie, která byla provedena na myších bez thymu. U těchto myší došlo k rozvoji chronické infekce a její průběh byl často letální (Heine et al. 1984). Chronické infekce dospělých imunodeficitních SCID a nude (nahých) myší byly pozorované zejména při nálezích *C. muris* a *C. parvum* (McDonald et al. 1992; Mead et al. 1991; Ungar et al. 1990). Injekce histokompatibilních lymfocytů do nude nebo SCID myší způsobila eliminaci infekce *C. parvum*, ale pokud byly z darovaných buněk odstraněny T lymfocyty, nedošlo k vývoji žádné protektivní imunity (Chen et al. 1993; McDonald et al. 1994; Mead et al. 1991; Perryman et al. 1994). Výsledky těchto experimentů vedou k závěru, že buněčná imunita, a především T lymfocyty jsou hlavním ochranným mechanismem proti kryptosporidiovým infekcím.

2.2.3.2 T-buněčný receptor (cell receptor, TCR) $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$

T lymfocyty mají na svém povrchu dva typy T-buněčných receptorů, TCR $\alpha\beta$ nebo TCR $\gamma\delta$. Většinu populace tvoří T lymfocyty s TCR $\alpha\beta$, a ty jsou také hlavním efektozem v buněčné imunitní odpovědi na infekci (Krejsek et al. 2016). Jeho funkcí je rozpoznání specifického antigenního peptidu prezentovaného molekulami MHC II (major histocompatibility complex) na APC, jako jsou dendritické buňky, nebo molekuly MHC I exprimované na jaderných buňkách (Gao et al. 2002). Naopak, T lymfocyty s receptorem TCR $\gamma\delta$ jsou běžné v epitelích některých savců, hlavně hlodavců, ale celkově tvoří pouze 5–10 % lymfocytární populace (Born et al. 2006; Hayday a Tigelaar 2003; Hořejší et al. 2017). Funkce TCR $\gamma\delta$ T lymfocytů je stále relativně nejasná, je ovšem známo, že může být spojena s vrozenou či adaptivní imunitou, s prezentací antigenu dalším T lymfocytům nebo může regulovat záněty (Born et al. 2006).

Rozdílná role TCR $\alpha\beta$ a TCR $\gamma\delta$ T lymfocytů v imunitě proti infekci *C. parvum* byla sledována na transgenních myších s nedostatkem jednoho nebo druhého typu TCR. Bylo prokázáno, že infikované myši s nedostatkem TCR $\alpha\beta$ T lymfocytů měly prodlouženou patentní periodu, zatímco dospělé myši s nedostatkem TCR $\gamma\delta$ byly k infekci stejně odolné jako myši zdravé (Waters a Harp 1996). Tato zjištění tedy naznačují, že pro vývoj protektivní imunity jsou nutné TCR $\alpha\beta$ T lymfocyty, zatímco TCR $\gamma\delta$ T lymfocyty mají sice ochrannou funkci, ale nejsou nezbytně nutné (Fayer a Xiao 2008).

2.2.3.3 CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty

T lymfocyty exprimující TCR typu $\alpha\beta$ se dají rozdělit na ty, které na svém povrchu nesou molekuly CD8 – cytotoxické T lymfocyty (Tc), a ty, které nesou molekuly CD4 – pomocné T lymfocyty (Th) (Fayer a Xiao 2008; Hořejší et al. 2017). CD4⁺ T lymfocyty jsou aktivovány rozpoznáním antigenu prezentovaného MHC II na APC, jako jsou dendritické buňky, monocyty, makrofágy a B lymfocyty. Bylo prokázáno, že CD4⁺ T lymfocyty jsou nezastupitelné ve své roli podporovat B lymfocyty v diferenciaci v plazmatické buňky produkující protilátky, zejména IgG, IgA a IgE třídy, a v obraně proti intracelulárním patogenům Th1 odpovědi (Krejsek et al. 2016). Naproti tomu CD8⁺ T lymfocyty rozpoznávají peptidy prezentované molekulami MHC I. Cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty jsou zodpovědné

za přímé zabíjení infikovaných buněk cytotoxickou cestou (Gao et al. 2002; Hořejší et al. 2017).

Důkazy o protektivní funkci CD4⁺ T lymfocytů přinesla řada experimentů. Myši s deficitem MHC II, tedy ty které postrádaly aktivaci CD4⁺ T lymfocytů, se nebyly schopny vyléčit z infekce *C. parvum* po dobu nejméně 8 týdnů (Aguirre et al. 1994). Další studie ukázala, že při podání protilátek proti CD4⁺ antigenu se významně zhoršil průběh infekce (McDonald et al. 1994; Ungar et al. 1991). Při pokusu na SCID myších, kdy byla do myši injikovaná suspenze lymfocytů, bylo prokázáno, že myši byly schopny kontrolovat infekci, ale když byly CD4⁺ T lymfocyty ze suspenze odstraněny, jejich ochranný účinek byl ztracen (Chen et al. 1993; McDonald et al. 1994).

Význam CD8⁺ T lymfocytů pro eliminaci střevní kryptosporidiózy dosud není úplně známý, nicméně aktivované CD8⁺ T lymfocyty specifické pro *C. muris* mají schopnost chránit hostitele před žaludeční kryptosporidiózou (Kváč et al. 2011). V experimentech na myších s deficitem MHC I, které postrádají aktivaci CD8⁺ T lymfocytů, měly tyto myši srovnatelnou hladinu infekce s neinfikovanými myšmi (Aguirre et al. 1994). Při léčbě imunokompetentních myší infikovaných *C. parvum* podáním protilátek anti-CD8 a anti-CD4 se prokázalo, že se výrazně zvýšila intenzita infekce oproti infikovaným imunokompetentním myším, které léčeny nebyly. Podání samotných anti-CD4 protilátek intenzitu infekce zvýšilo oproti infikovaným myším, které léčeny nebyly, ale ne v takovém rozsahu, jako u myší po podání obou anti-CD8 a anti-CD4 protilátek. Naproti tomu, podání samotných anti-CD8 protilátek nemělo na průběh infekce žádný vliv (Ungar et al. 1990). Jiná studie prokázala, že při infekci myší *C. parvum*, došlo k výrazné migraci CD8⁺ T lymfocytů do sliznice tenkého střeva a jejich možnou roli ve vyléčení z této infekce díky sekreci IFN- γ CD8⁺ T-lymfocyty (Leav et al. 2005). Celkově je tedy pravděpodobné, že CD8⁺ T lymfocyty se podílejí na vývoji adaptivní imunity, ale mají vedlejší roli vůči CD4⁺ T lymfocytům a nejsou rozhodující (Fayer a Xiao 2008).

2.2.3.4 Intraepiteliální lymfocyty

Pokud je infekce situována do epiteliálních povrchů, účastní se imunitní odpovědi tzv. intraepiteliální lymfocyty (IELs), které jsou představovány převážně CD8⁺ T lymfocyty většinou exprimující TCR $\alpha\beta$. T lymfocyty s receptorem TCR $\gamma\delta$ jsou zastoupeny v menší míře. Za normálních okolností je na každých 100 epitelových buněk vmezeřen jeden IEL lymfocyt (Krejsek et al. 2016). Tyto buňky mají zatím nedostatečně objasněnou funkci, avšak je známo, že hlavní imunitní roli hrají CD8⁺ T lymfocyty, které cytotoxickou cestou zabíjejí infikované epiteliální buňky. Současně mohou tyto lymfocyty regulovat zánětlivou reakci infekce, kde mohou mít významnou roli $\gamma\delta$ ⁺ T lymfocyty (Hayday a Tigelaar 2003; Krejsek et al. 2016).

Kryptosporidióza je charakteristická právě napadením epiteliálních buněk gastrointestinálního traktu (GIT), a tedy s největší pravděpodobností zde hrají podstatnou roli při rozvoji imunitní odpovědi právě IELs (Fayer a Xiao 2008). Toto tvrzení podporuje řada experimentů, jako například ten, kdy při infekci myši střevním druhem *C. parvum* došlo ke zvýšení počtu TCR $\gamma\delta$ T lymfocytů v IELs (Eichelberger et al. 2000). Další studie byla provedena na dobytku, který byl infikován *C. parvum* a bylo pozorováno zvýšené množství IELs CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů jak v průběhu infekce (Fayer et al. 1998), stejně tak po vyléčení (Wyatt et al. 1999). Při reinfekci dobytka byla taktéž sledována zvýšená migrace pouze CD8⁺ T-lymfocytů do střevního epitelu (Abrahamsen et al. 1997).

2.2.3.5 Paměťové T-lymfocyty

Imunologická paměť je jedním ze základních znaků adaptivní imunity. Při vývoji imunitní odpovědi, buněčné, ale i té humorální, se diferencuje část lymfocytů na tzv. paměťové B nebo T lymfocyty, které zůstávají v organismu různě dlouhou dobu a hrají roli při reinfekci (Krejsek et al. 2016).

Paměťové T lymfocyty CD4⁺ i CD8⁺ po kontaktu se specifickým antigenem obdrží potřebné homeostatické signály, které zajistí jejich dlouhodobé přežití a schopnost po opakovaném kontaktu s tímto antigenem rychleji proliferovat (Krejsek et al. 2016). Tuto skutečnost prokázaly také experimenty, kdy byly myši reinfikovány. Velmi rychlá a silná buněčná imunitní odpověď se vyvinula při reinfekci imunokompetentních BALB/c myši do 30 dnů po vyléčení z primární infekce ve srovnání s kontrolními myšmi (McDonald et al. 1992).

Protektivní imunita byla taktéž přenesena pomocí IELs (intraepiteliálních lymfocytů) z myši infikovaných před 8 měsíci, ale tyto buňky měly menší ochranný účinek než IELs získané z myši pouze 3 měsíce po infekci. Tato studie ukázala, že imunologická paměť T lymfocytů se po kryptosporidiové infekci časem zeslabuje (McDonald a kol. 2000).

2.2.4 Cytokinová kontrola imunitní odpovědi

V závislosti na povaze antigenů, se kterými se imunitní systém setkává, mohou CD4⁺ Th lymfocyty indukovat buněčnou zprostředkovanou imunitní odpověď (Th1) nebo protilátkovou zprostředkovanou odpověď (Th2). V Th1 odpovědi je hlavní produkovaný interleukin IL-2 a IFN γ , jehož produkce je řízena zejména interleukinem IL-12 produkovaným dendritickými buňkami a makrofágy (Fayer a Xiao 2008; Hořejší et al. 2017). Funkcí Th1 reakcí je především obrana před intracelulárními parazity. Naopak odpověď Th2 je spojena především s produkcí interleukinů IL-4, IL-5, IL-9 a IL-13 (Fayer a Xiao 2008). Imunitní odpověď Th2 vzniká zejména při obraně proti extracelulárním patogenům, jako například mnohobuněčným parazitům, a vede k tvorbě specifických protilátek (Krejsek et al. 2016).

Za nejdůležitější cytokin, který hraje roli ve vyléčení kryptosporidiové infekce je považován IFN γ , který je při tomto onemocnění produkován CD4⁺ T lymfocyty (Harp et al. 1994; Tilley et al. 1995), a pravděpodobně i NK buňkami (McDonald et al. 2000). Význam IFN γ při kryptosporidióze potvrzuje experiment, při kterém myši deficientní pro IFN γ měly mnohem těžší průběh infekce *C. parvum* než kontrolní myši (Hayward et al. 2000). Během kryptosporidiózy se na imunitní odpovědi podílejí kromě IFN γ i další Th1 cytokiny, jako je například IL-2. Tento interleukin nicméně nebyl prokázán jako nezbytný pro vyléčení hostitele (Enriquez a Sterling 1993; McDonald et al. 1994; Tilley et al. 1995; Ungar et al. 1991). Další spojitost mezi IFN γ a Th1 cytokinem IL-12 prokázal experiment, kdy IL-12 zmírnil průběh kryptosporidiové infekce (Ehigiator et al. 2005; McDonald et al. 2004; Urban et al. 1996).

2.2.5 Specifická protilátková odpověď

Schopnost organismu odpovědět tvorbou protilátek na antigenní podnět je známa a v praxi využívána, například při očkování (Jílek 2014). Nezbytný předpoklad tvorby protilátek je založen na rozpoznání antigenu povrchovými

antigenně specifickými receptory B lymfocytů (BCR) (Hořejší et al. 2017). Za vhodných podmínek se stimulované B lymfocyty pomnoží a diferencují na plazmatické buňky, které dále migrují především do kostní dřeně a produkují protilátky požadované specifity a třídy (Krejsek et al. 2016). Protilátkovou odpověď zprostředkovávají imunoglobulinové molekuly, které lze rozdělit 5 základních imunoglobulinových tříd – IgG, IgA, IgM, IgE a IgD (Krejsek et al. 2016).

U kryptosporidiových infekcí je protilátková odpověď obranný mechanismus, který je intenzivně zkoumán. Přítomnost imunoglobulinů proti kryptosporidiím není hlavním nástrojem odstranění parazita, a také nemusí nutně indikovat aktivní infekci, ale spíše naznačuje, že byl jedinec v určitém období svého života kryptosporidii infikován (Fayer a Xiao 2008). Bylo potvrzeno, že protilátky specifické pro kryptosporidiovou infekci se objevují jak v krevním oběhu, ale také ve střevní sliznici a mukóze (Hill et al. 1990; Peeters et al. 1992; Ungar et al. 1986). Během infekce se objevují především IgG, IgM a IgA třídy protilátek, jejichž hladiny se s rostoucí intenzitou infekce zvyšují a po vyléčení opět klesají, ačkoli IgG může v séru daného jedince přetrvávat až několik měsíců (Ungar et al. 1986). Sekreční IgA (sIgA), produkovaný během infekce, hraje roli obzvláště v ochraně povrchu sliznice před toxiny a mikrobiálními patogeny. sIgA se objevují především u imunokompetentních dospělých jedinců s příznaky infekce, tedy u jedinců, kteří vylučovali oocysty a měli průjem (Dann et al. 2000). Pacienti s vrozenou hypogamaglobulinemií se nejsou schopni vyléčit z infekce vyvolané *C. parvum* (Lasser et al. 1979), což naznačuje, že pro vyléčení je protilátková odpověď zásadní.

2.2.6 ELISA test

ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay, která se může také označovat jako EIA, Enzyme Immunoassay, patří mezi jednu z nejpoužívanějších imunologických metod, která je určena pro detekci antigenů pomocí konjugovaných protilátek se značeným enzymem (avidin peroxidázou, beta- alaktosidázou nebo alkalickou fosfatázou), tedy funguje na bázi imunoenzymatické reakce (Hnasko 2015; Toman et al. 2009). Po vytvoření vazby antigenu s enzymem značeným imunním sérem se ke směsi přidává substrát, který je enzymem štěpen a dochází ke změně barvy reakčního produktu.

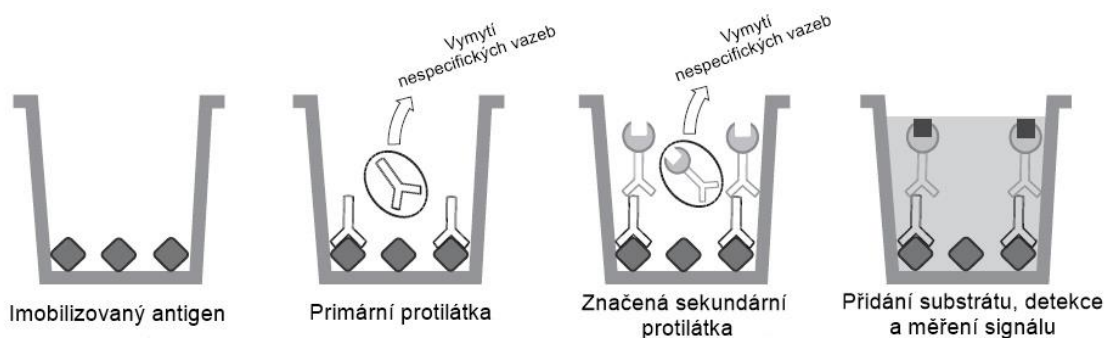
Intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu navázaných molekul antigenu a protilátky a je dále měřena imunofluorescenční metodou (Hnasko 2015).

Existují čtyři druhy ELISA testů:

- 1) Přímá ELISA, která se používá pro detekci antigenu;
- 2) Nepřímá ELISA, která se používá pro detekci specifických protilátek;
- 3) Přímá sendvičová ELISA, používaná pro detekci antigenu;
- 4) Nepřímá sendvičová ELISA, používaná pro detekci specifických protilátek.

V této práci byla použita pouze metoda nepřímého ELISA testu, která je popsána níže (Obrázek 2).

2.2.6.1 Nepřímá metoda ELISA



Obrázek 2. Schématické zobrazení postupů při provedení nepřímé ELISA metody (Kohl a Ascoli 2017). Upraveno.

Jedná se o základní metodu s vysokou citlivostí pro průkaz specifických protilátek. Nepřímá ELISA je nejvhodnější pro stanovení celkové koncentrace protilátek ve vzorcích (Kohl a Ascoli 2017). Metoda je založena na vazbě antigenu na plastovou mikrotitrační desku. Na desku se dále přidává testované sérum, protilátka proti druhově specifickým imunoglobulinům příslušného typu (IgG, IgM nebo IgA) konjugovaná s enzymem – konjugát. Nakonec se přidá detekční systém – substrát reagující s enzymem, za vzniku barevné reakce (Toman et al. 2009). Výhodou této metody je, že pomocí jediného konjugátu může být vyšetřen jakýkoli počet sér na specifickou vazbu k danému antigenu (Kohl a Ascoli 2017).

3 Cíle práce

- Zpracovat literární rešerši o tématu
- Sledovat vývoj zkřížené protilátkové imunitní odpovědi hostitele na infekci/inokulaci hostitelsky specifickými a nespecifickými druhy kryptosporidií

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Paraziti

- *Cryptosporidium parvum* izolát WERU: získán z člověka (*Homo sapiens*). Izolát je dlouhodobě udržován v imunodeficitních SCID myších.
- *Cryptosporidium proliferans* izolát TS03: získán z hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*). Izolát je dlouhodobě udržován v imunodeficitních SCID myších.
- *Cryptosporidium baileyi* izolát NH: získán z kachny domácí (*Anas platyrhynchos f. domestica*). Izolát je dlouhodobě udržován v kuřatech.
- *Cryptosporidium andersoni* izolát LI03: získán z tura domácího (*Bos taurus*).

4.1.2 Experimentální zvířata

Pokus byl prováděn na myších kmene BALB/c. Tyto myši patří mezi nejvyužívanější imunokompetentní kmeny inbredních myší, vyznačujících se produkcí monoklonálních protilátek po jejich imunizaci.

Myši byly chovány za standardních podmínek v oddělených plastových boxech ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i. v Českých Budějovicích. Režim ve zvěřinci byl 12 hodin světla a 12 hodin tmy při teplotě 22 °C, krmena byla komerční granulovanou směsí pro hlodavce a napájena vodou *ad libitum*.

4.2 Metody

4.2.1 Purifikace oocyst

Trus s oocystami byl zhomogenizován v třecí misce, zředěn deionizovanou vodou (dH₂O) a zbaven hrubých nečistot přes sítko. Následně byl přečištěn na sacharózovém gradientu (Arrowood a Sterling 1987) a dočištěn pomocí cesium chloridového gradientu.

4.2.2 Sacharózový gradient

Roztoky a chemikálie:

- **Sheaterův roztok** (405 g cukru v 259 ml dH₂O).
- **PBS (Phosphate Buffered Saline)** (rozpusťte 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄×12 H₂O, 2,4 g KH₂PO₄ do 1000 ml dH₂O a upravte na pH 7,2–7,4)
- **1 % T-PBS (PBS Tween)** (0,5 ml Tween 20 + 999,5 ml PBS).

Pracovní postup:

- Homogenizovat vzorek trusu v třecí misce v dH₂O a přecedit přes sítko.
- 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.
- Centrifugovat 20 minut při 1000 g a teplotě 4 °C.
- Odsát horní čirou vrstvu.
- Přemístit prstenec na rozhraní dolní a střední vrstvy do nových kyvet.
- Doplnit kyvety PBS.
- Centrifugovat 20 minut při 1500 g a teplotě 4 °C.
- Odsát supernatant nad sedimentem (obsahuje oocysty) s nadbytkem PBS a centrifugovat 20 minut při 1500 g a teplotě 4 °C.
- Předchozí krok 2× opakovat a následně přenést sediment do čistých zkumavek.
- Skladovat vzorky v PBS při teplotě 4 °C.

4.2.3 Cesium chloridový gradient

Roztoky a chemikálie:

- **Roztok cesium chloridu** (CsCl ; $\rho = 1,15 \text{ g/ml}$) (21,07 g CsCl do 100 ml dH_2O).
- **PBS** (rozpustit 80 g NaCl , 2 g KCl , 14,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$, 2,4 g KH_2PO_4 do 1000 ml dH_2O a upravit na pH 7,2–7,4).

Pracovní postup:

- Napipetovat do každé mikrozkušavky 1 ml CsCl .
- Do zkušavky s CsCl navrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
- Centrifugovat 3 minuty při 16000 g při teplotě 20 °C.
- Přepipetovat supernatant do 50 ml zkušavek a sediment vyhodit.
- Zkušavku doplnit PBS a centrifugovat 20 minut při 1370 g při teplotě 4 °C.
- Odsát supernatant na objem 5 ml, doplnit zkušavku dH_2O , vortexovat a centrifugovat při teplotě 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g (opakovat 3×)
- Oocysty uchovat v dH_2O při teplotě 4 °C.

4.2.4 Barvení nátěru trusu anilin-karbol-methyl-violetí

Detekce oocyst kryptosporidií ve vzorcích trusu byla provedena metodou specifického barvení nátěru podle (Miláček a Vítovec 1985).

Roztoky a chemikálie:

- **Roztok methylvioleti** (0,6 g methyl violeti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml ethanolu, 70 ml dH_2O).
- **Roztok 2% kyseliny sírové**.
- **Tartrazin** (1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové).

Pracovní postup:

- Rozetřít trus do slabého nátěru na podložní sklíčko.
- Zafixovat methanolem a následně v plameni.
- Zafixovaná sklíčka barvit v roztoku methylvioleti po dobu 30 minut.
- Opláchnout pod tekoucí vodou.
- Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 1 minuty.
- Opláchnout pod tekoucí vodou.
- Dobarvit v tartrazinu po dobu 15 minut.
- Opláchnout pod tekoucí vodou a nechat sušit.

- Sklíčka prohlížet světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Vyhodnocení:

Oocysty kryptosporidií se barví temně fialově na žlutém, žlutohnědém nebo světle fialovém pozadí.

4.2.5 Průběh experimentu

4.2.5.1 Infekce myši

K pokusu byly použity myši tří věkových skupin, konkrétně 7 dní staré, 14 dní staré a 8 týdnů staré. BALB/c myši byly infikovány perorálním způsobem dávkou 1×10^6 spor v 10 μ l dH₂O na myš, vyjma věkové skupiny 7 dní staré, kde byla dávka 1×10^6 spor v 5 μ l dH₂O na myš.

Počítání koncentrace oocyst pro infekční dávku

Pracovní postup:

- Do Bürkerovy komůrky přidat suspenzi s oocystami.
- Komůrku prohlížet světelným mikroskopem (Olympus BX 51) při zvětšení 400×.
- Oocysty spočítat v 25 různých čtvercích.
- Konečnou koncentraci oocyst v 1 ml suspenze stanovit součtem všech oocyst v 25 čtvercích vynásobených 10^4 .

4.2.5.2 Design experimentu

Čtyři skupiny myši (každá po 18 jedincích) byly perorálně infikovány oocystami *C. parvum* izolát WERU nebo *C. proliferans* izolát TS03 nebo *C. baileyi* izolát NH nebo *C. andersoni* izolát LI03. Tyto čtyři skupiny se opakovaly u tří věkových kategorií, tedy u 7 dní starých myši, 14 dní starých myši a u 8 týdenních myši. Jako negativní kontrola sloužily skupiny stejně starých myši inokulovaných dH₂O.

Všechny myši byly od 4. dne po infekci (DPI) vyšetřovány na přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu. Trus byl odebírán individuálně. Pro vyhodnocení intenzity infekce byly pravidelně sledovány skupiny 10 myši od každé věkové skupiny infikované jednotlivými druhy kryptosporidií. U každého vyšetření byla zjištěna hmotnost trusu (v gramech) jako rozdíl hmotnosti preparátu (trusu natřeného na sklíčku před fixací a barvením) a hmotnosti čistého sklíčka. Nátěr trusu byl poté obarven metodou dle Miláčka a Vítovce (1985) (viz 4.2.4) a prohlížen světelným

mikroskopem (Olympus IX 70) při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Při nízké intenzitě infekce byly počítány všechny oocysty nalezené na preparátu, při vysoké intenzitě infekce byl počítán počet oocyst ve 30 náhodných zorných polích. Ze zjištěných údajů (hmotnost trusu, počet zorných polí a počet oocyst na sklíčku) byla spočítána intenzita infekce a vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu (OPG, oocysts per gram) (Kváč et al. 2007).

Každý sedmý a následně každý čtrnáctý den (7, 14, 28, 42, 56 a 70 DPI) byly tři myši z každé skupiny, experimentální i kontrolní, usmrceny a byl získán vzorek srážlivé krve.

Zdravotní stav zvířat byl kontrolován dvakrát denně a při odběru trusu byla posouzena jeho konzistence.

4.2.5.3 Odběr myších sér

Myši byly usmrceny v anestezii, která byla provedena inhalačně isofluranem. Periferní krev byla myším odebrána z *arteria carotis*. Objem odebrané krve závisel na věku zvířete a pohyboval se kolem 0,5–1 ml. Krev byla ponechána v 1,5 ml mikrozkuřavkách 60 minut při laboratorní teplotě, kdy došlo ke sražení krevních komponent, a poté byla stáčena 5 minut při rychlosti 500 g. Oddělené sérum (supernatant) bylo přeneseno do nové mikrozkuřavky, řádně popsáno a uchováno při – 20 °C.

4.2.6 Nepřímá ELISA

4.2.6.1 Příprava korpuskulárního antigenu

Na základě předpokusů byl stanoven počet oocyst na jamku, koncentrace séra a protilátek. Celkové množství oocyst navázaných na dno mikrotitrační desky bylo stanoveno na 10^5 oocyst na jamku, tedy $9,6 \times 10^6$ oocyst na 96-jamkovou desku. Větší množství oocyst na jamku, stejně jako vyšší koncentrace protilátek produkovalo nečitelnou absorbanci, naopak menší množství vyvolávalo nečitelnou reakci (Kutsyna 2020).

Ředění séra: 1:200 (2 μ l séra + 398 μ l ředícího roztoku).

Protilátka značená peroxidázou (konjugát): protilátky v ředícím roztoku v poměru 1:20000 (0,5 μ 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 Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 2,4 g KH₂PO₄ do 1000 ml dH₂O, upravit na pH 7,2–7,4).
- **Blokovací roztok** (5% BOFES (bovinní fetální sérum) v T-PBS: 5 ml BOFES + 95 ml T-PBS).
- **Stopovací roztok** (2 M H₂SO₄: 196,16 g koncentrované H₂SO₄ do 1000 ml dH₂O).
- **Fosfátový pufr** (14,3 g 0,2M Na₂HPO₄ · 12 H₂O do 200 ml dH₂O).
- **Citrátový pufr** (4,2 g 0,1M C₆H₈O₇ (kyselina citrónová) do 200 ml dH₂O).
- **0,05 M Fosfáto-citrátový pufr (pH 5)** (smíchat 51,4 ml fosfátového pufru a 48,6 ml citrátového pufru ve 100 ml dH₂O).
- **Substrátový roztok (množství na 96 jamek)** (10 ml fosfáto-citrátového pufru (pH 5) + 4 μ l 0,03 % H₂O₂ + 4 mg 2,5mM O-Phenylendiaminu (OPD), připravit těsně před použitím).

4.2.6.2 Navázání antigenů na pevnou fázi mikrotitrační destičky

Roztoky a chemikálie:

- **Vazebný (koutovací) roztok** (1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ do 1 000 ml dH₂O, upravit na pH 9,6).
- **Fixační roztok** (100 ml acetonu a 100 ml metanolu).
- **Blokovací roztok** (5 % BOFES (bovinní fetální sérum) v T-PBS: 5 ml BOFES + 95 ml T-PBS).
- **Promývací roztok T-PBS** (1% Tween 20 v PBS: 0,5 ml Tween 20 + 999,5 ml PBS).

Pracovní postup:

- Oocysty excystovat při 38 °C 5 minut.
- Následně oocysty rozbít za pomoci 0,5 mm skleněných kuliček homogenizací po dobu 60 sekund (FastPrep-24 Beadbeater).
- Ve vazebném roztoku naředit korpuskulární antigen (výše) v odpovídající koncentraci 10⁵ oocyst /jamka.
- Připravit mikrotitrační destičku 8×12 (96 jamek).
- Napipetovat 100 µl roztoku korpuskulárního antigenu do každé jamky.
- Inkubovat destičku 24 hodin při teplotě 4 °C ve vlhké komůrce.
- Po inkubování vyklepnout obsah jamek a osušit destičku.
- Napipetovat 200 µl fixačního roztoku do každé jamky a inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě.
- Po inkubaci znovu vyklepnout obsah jamek a osušit destičku.
- Vyblokovat nespecifické vazby blokovacím pufrům napipetováním 200 µl/jamka, inkubovat 1 hodinu v termostatu při teplotě 37 °C.
- Po inkubaci 3× promýt jamky 300 µl promývacího pufru T-PBS.
- Pokud se ELISA neprovádí hned po promývání, napipetovat 300 µl T-PBS do každé jamky a destičky zamrazit na teplotu -20 °C.

4.2.6.3 Příprava testovaného vzorku séra

Roztoky a chemikálie:

- **Vzorky myších krevních sér.**
- **Ředící roztok** (2% bovinní fetální sérum (BOFES) v PBS: 2 ml BOFES + 98 ml PBS).
- **Promývací roztok T-PBS** (1% Tween 20 v PBS: 500 µl Tween 20 + 999,5 ml PBS).
- **Konjugát** (Antiizotypová anti-IgG protilátka značená enzymem avidin-peroxidázou).

Pracovní postup:

- Naředit vzorek testovaného séra do mikrozkušavek.
- Ředění séra 1:200 (2 μ l séra + 398 μ l ředícího roztoku).
- Přidat 100 μ l ředěného séra do jamky mikrotitrační desky, každý vzorek séra testovat v triplicátu.
- Inkubovat destičku 1 hodinu v termostatu při teplotě 37 °C (nebo 24 hodin v lednici při teplotě 4 °C).
- 3 \times promýt destičku roztokem T-PBS (300 μ l do jamky).
- Do každé jamky napipetovat 100 μ l antiizotypového séra proti studovaným imunoglobulinům skupiny IgG značených avidin-peroxidázou, ředit 1:20 000 ředícím pufrům (0,5 μ l protilátky + 10 ml ředícího roztoku).
- Inkubovat 1 hodinu při teplotě 37 °C.
- 3 \times promýt vzorky promývacím roztokem T-PBS (300 μ l do jamky).
- Napipetovat 100 μ l substrátového roztoku (10 ml fosfáto-citrátového pufru, 4 μ l 0,03% H₂O₂, 4 mg 2,5 mM OPD).
- Inkubovat destičku při laboratorní teplotě 10 minut ve tmě.
- Zastavit enzymovou reakci napipetováním 100 μ l 2 M H₂SO₄ do každé jamky.
- Měřit absorbanci ELISA spektrofotometrem při vlnové délce 490 nm.

4.2.7 Hodnocení metody ELISA

Každé hodnocení ELISA testu musí probíhat podle přesně stanovených standardů. Hlavní orientační jednotky během posuzování platnosti provedeného testu jsou hodnoty absorbance blank (prázdného) vzorku, obsahujícího jenom ředící roztok bez přidání séra, dále hodnoty pozitivní, a především negativní kontroly. Pozitivní kontrola obsahovala sérum myši, která prokazatelně prodělala kryptosporidiózu, tedy bylo u myši detekováno vylučování oocyst (viz 4.2.4). Negativní kontrola obsahovala sérum myši, která nakažená nebyla. Cut-off, neboli hodnota minimálního kritického výpočtu byla stanovena jako dvojnásobek absorbance negativní kontroly (Lardeux et al. 2016; Ridge a Vizard 1993).

4.2.7.1 Index positivity (IP)

Hodnoty absorbancí byly následně přepočítány na tzv. index positivity. Tento index byl vypočítán jako absorbance vzorku, která byla vydělena průměrnou hodnotou cut-off (Obrázek 3).

$$IP = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Průměrná absorbance CUT-OFF}}$$

Obrázek 3. Vzorec pro výpočet indexu positivity.

Interpretace výsledků vyšetření uvádí tabulka (Tabulka 2).

Tabulka 2. Interpretace ELISA výsledků na základě indexu positivity

Index positivity (IP)	Hodnocení
menší než 0,8	negativní
0,8 až 1,2	hraniční
větší než 1,2	pozitivní

5 Výsledky

5.1 Průběh infekce

5.1.1 Průběh infekce u *Cryptosporidium parvum*

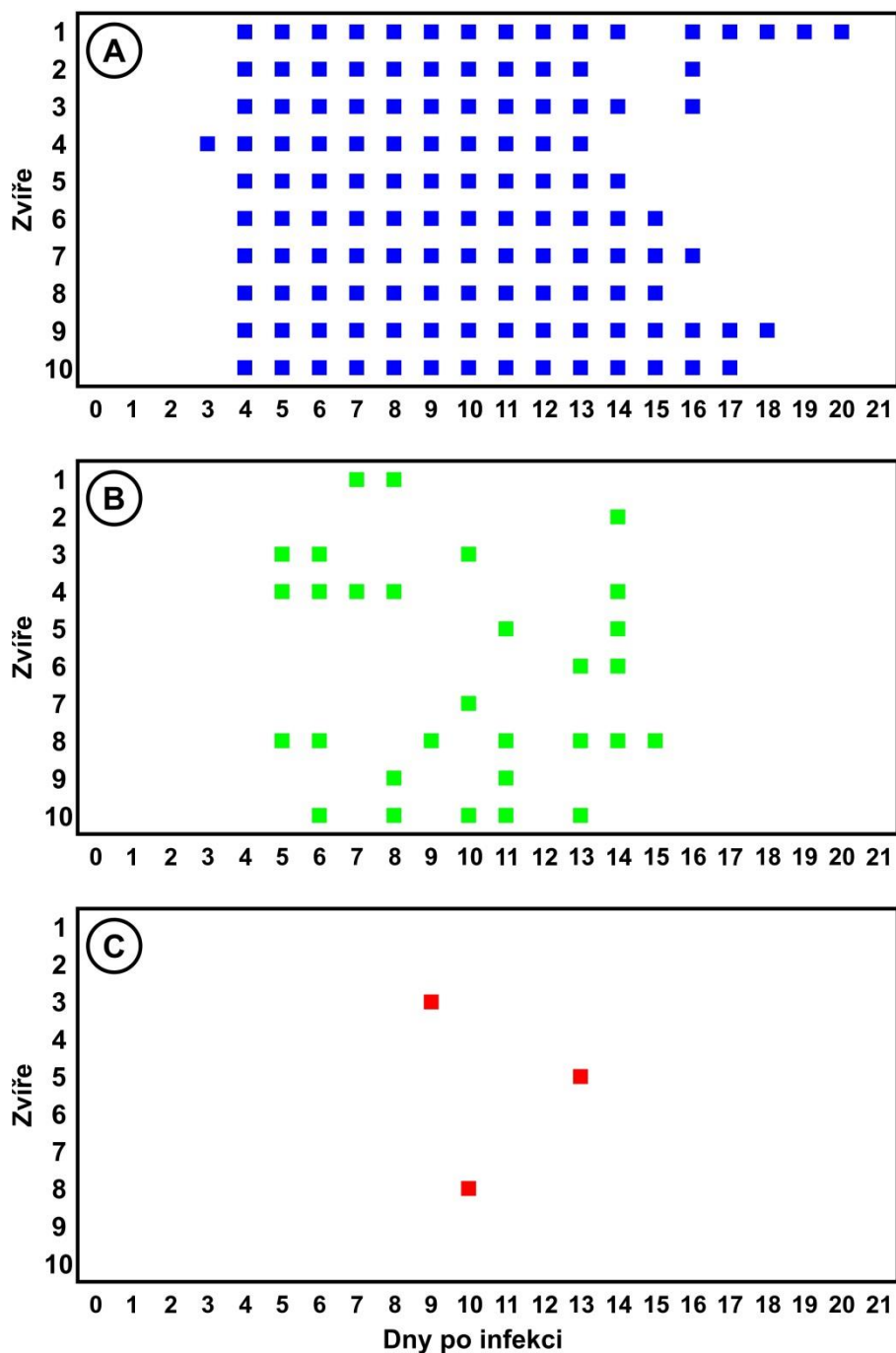
Vyšetření trusu BALB/c myši infikovaných *C. parvum* prokázalo, že všechny myši infikované ve věku 7 a 14 dnů vylučovaly mikroskopicky detekovatelné množství oocyst, zatímco myši infikované ve věku 8 týdnů vylučovaly detekovatelné množství oocyst velmi ojediněle (Graf 1). Prepatentní perioda u 7 denních myši byla 4 dny s jednou výjimkou, kdy byly oocysty pozorovány již 3 DPI. Většina myši infikovaných ve věku 14 dní začala vylučovat mikroskopicky detekovatelné množství oocyst od 5 DPI. Zatímco 7 denní myši vylučovaly oocysty téměř denně po dobu 10–14 dnů, u ostatních věkových kategorií bylo vylučování intermitentní s výrazně kratší patentní periodou (Graf 1).

Byl zaznamenán výrazný rozdíl v intenzitě infekce mezi jednotlivými věkovými kategoriemi. U myši infikovaných ve stáří 7 dnů se intenzita infekce pohybovala od 2 000 do 250 000 OPG, přičemž na začátku infekce byly pozorovány vyšší hodnoty OPG a od poloviny patentní periody došlo k postupnému snižování OPG. U 14 dní starých myši a u 8 týdnů starých myši byly oocysty detekovány pouze velmi sporadicky. Intenzita infekce se pohybovala od 2 000 do 20 000 OPG u 14 dní starých myši a od 2 000 do 4 000 OPG u 8 týdnů starých myši. U skupiny 14 denních a 8 týdních myši nebyly v průběhu experimentu pozorovány žádné klinické příznaky kryptosporidiózy. U myši infikovaných ve věku 7 dnů byla v prvním týdnu po infekci pozorována změna konzistence trusu oproti kontrolním jedincům bez infekce. Trus infikovaných myši měl řidší konzistenci, nicméně v žádném z případů se nejednalo o vodnatý průjem.

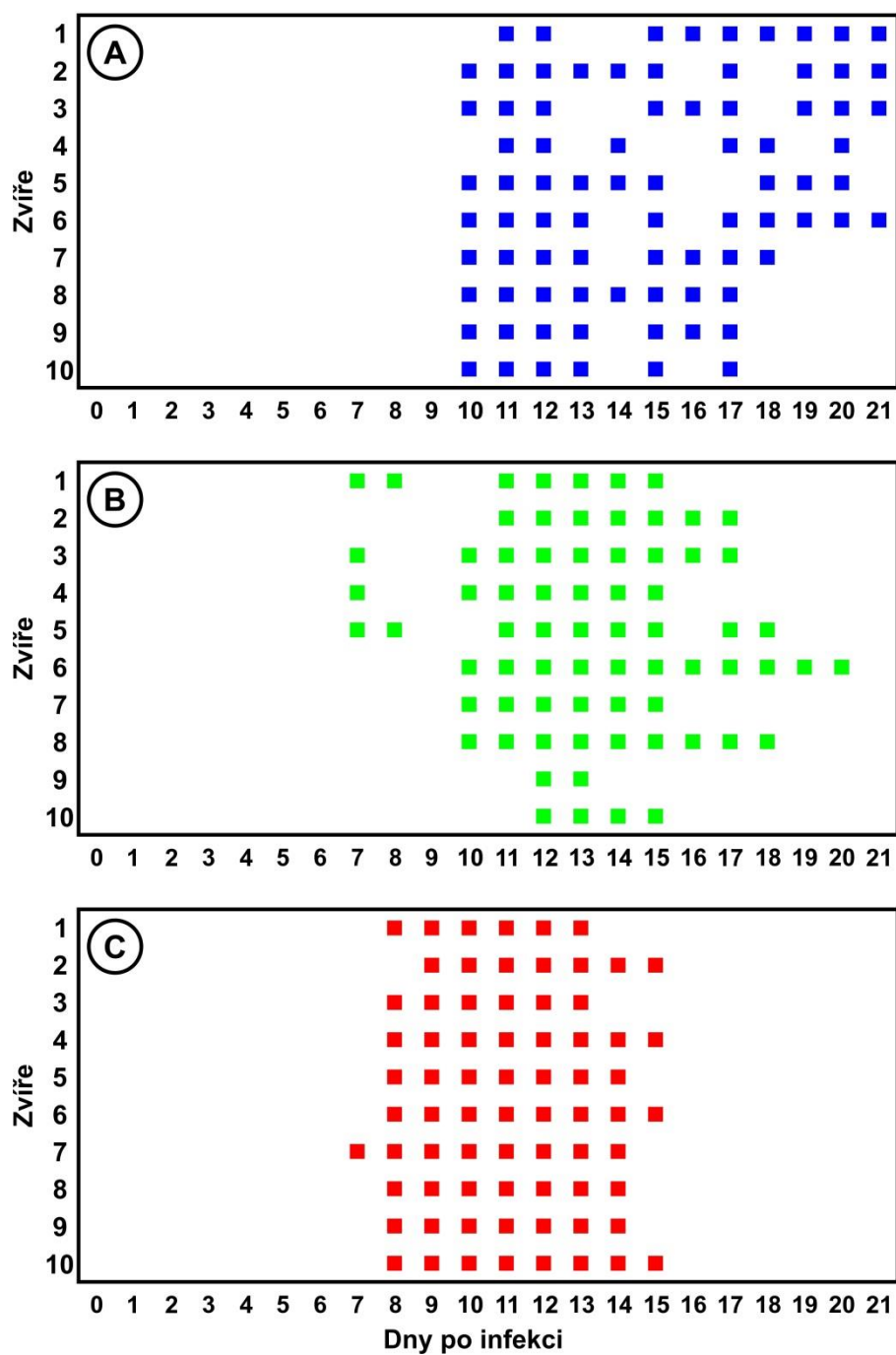
5.1.2 Průběh infekce u *Cryptosporidium proliferans*

Vyšetření trusu BALB/c myši infikovaných *C. proliferans* prokázalo přítomnost oocyst použitých k infekci u všech experimentálních zvířat od 10 DPI u myši infikovaných ve stáří 7 dní, zatímco myši infikované ve stáří 14 dní a 8 týdnů začaly vylučovat detekovatelné množství oocyst dříve a to od 7 DPI. Byly zjištěny rozdíly v délce patentní periody. Zatímco myši infikované ve stáří 8 týdnů přestaly vylučovat oocysty mezi 13–15 DPI, myši infikované ve stáří 14 a 7 dnů přestaly vylučovat mezi 13–21 DPI (Graf 2). Nebyly zjištěny významné rozdíly v intenzitě infekce mezi jednotlivými věkovými skupinami. Intenzita infekce se u všech skupin

pohybovala v rozmezí 4 000 až 60 000 OPG. Žádná z inokulovaných myší nevykazovala klinické příznaky kryptosporidiózy.



Graf 1. Průběh infekce u *C. parvum*. **(A)** 7 dní staré BALB/c myši; **(B)** 14 dní staré BALB/c myši; **(C)** 8 týdnů staré BALB/c myši. Vybarvený čtvereček znázorňuje mikroskopickou detekci oocyst. Prázdné místo v grafu znamená, že nebyly mikroskopicky detekovány žádné oocysty.



Graf 2. Průběh infekce u *C. proliferans*. **(A)** 7 dní staré BALB/c myši; **(B)** 14 dní staré BALB/c myši; **(C)** 8 týdnů staré BALB/c myši. Vybarvený čtvereček znázorňuje mikroskopickou detekci oocyst. Prázdné místo v grafu znamená, že nebyly mikroskopicky detekovány žádné oocysty.

5.1.3 Průběh infekce u *Cryptosporidium baileyi* a *Cryptosporidium andersoni*

U žádné z BALB/c myši inokulovaných suspenzí oocyst *C. baileyi* nebo *C. andersoni* nebyly v trusu detekovány oocysty kryptosporidií během celého experimentu. Žádná z inokulovaných myši nevykazovala klinické příznaky kryptosporidiózy.

5.2 Vývoj protilátkové odpovědi

V odebraných sérech všech myši se v různém čase po infekci stanovovaly hladiny specifických protilátek IgG (Graf 3). Hladiny imunoglobulinů určují protilátkovou odpověď na přítomnost kryptosporidiové infekce. Pro stanovení protilátek byla použita metoda ELISA (viz 4.6.2). Všechny kontrolní myši byly sérologicky negativní. Byla zaznamenána zkřížená pozitivní reaktivita myši infikovaných *C. parvum* na korpuskulární antigen *C. proliferans*, ale tato reaktivita nebyla nijak výrazná. U jiných druhů kryptosporidií nebyla zkřížená reaktivita detekována.

5.2.1 Vývoj protilátkové odpovědi u *Cryptosporidium parvum*

Při testování sér myši infikovaných *C. parvum* došlo k rozvoji protilátkové imunity u všech věkových skupin. První záchyt přítomnosti IgG protilátek byl zaznamenán 14 DPI. Maximální hodnoty, index positivity 2,0–2,2, byly pozorovány 28 DPI. Od tohoto dne došlo u všech věkových skupin k poklesu IgG protilátek. U 14 dní starých myši a u 8 týdnů starých myši protilátková odpověď klesla velmi prudce, kdy u 14 denních myši klesala na hranici indexu positivity. Naopak u 7 dní starých myši imunitní odpověď klesala velmi pozvolna a k hraničnímu indexu positivity se přiblížila až 70 DPI (Graf 3). Jak je také z grafu 3 patrné, hladiny specifických protilátek IgG byly zvýšené u všech myši, ačkoli u některých nebyly mikroskopicky detekovány oocysty. U žádného ze zvířat nebyly detekovány IgM protilátky.

5.2.2 Vývoj protilátkové odpovědi u *Cryptosporidium proliferans*

Hladina protilátek u myši infikovaných *C. proliferans* nebyla tak výrazná jako u myši infikovaných *C. parvum*. Hodnoty se pohybovaly v hraničním indexu positivity. Přestože u většiny myši byly mikroskopicky detekovány oocysty a intenzita infekce byla u všech věkových skupin výrazná, protilátková odpověď nebyla detekována vyjma hraničního záchytu IgG protilátek 14 DPI u myši infikovaných ve stáří 14 dnů (Graf 3).

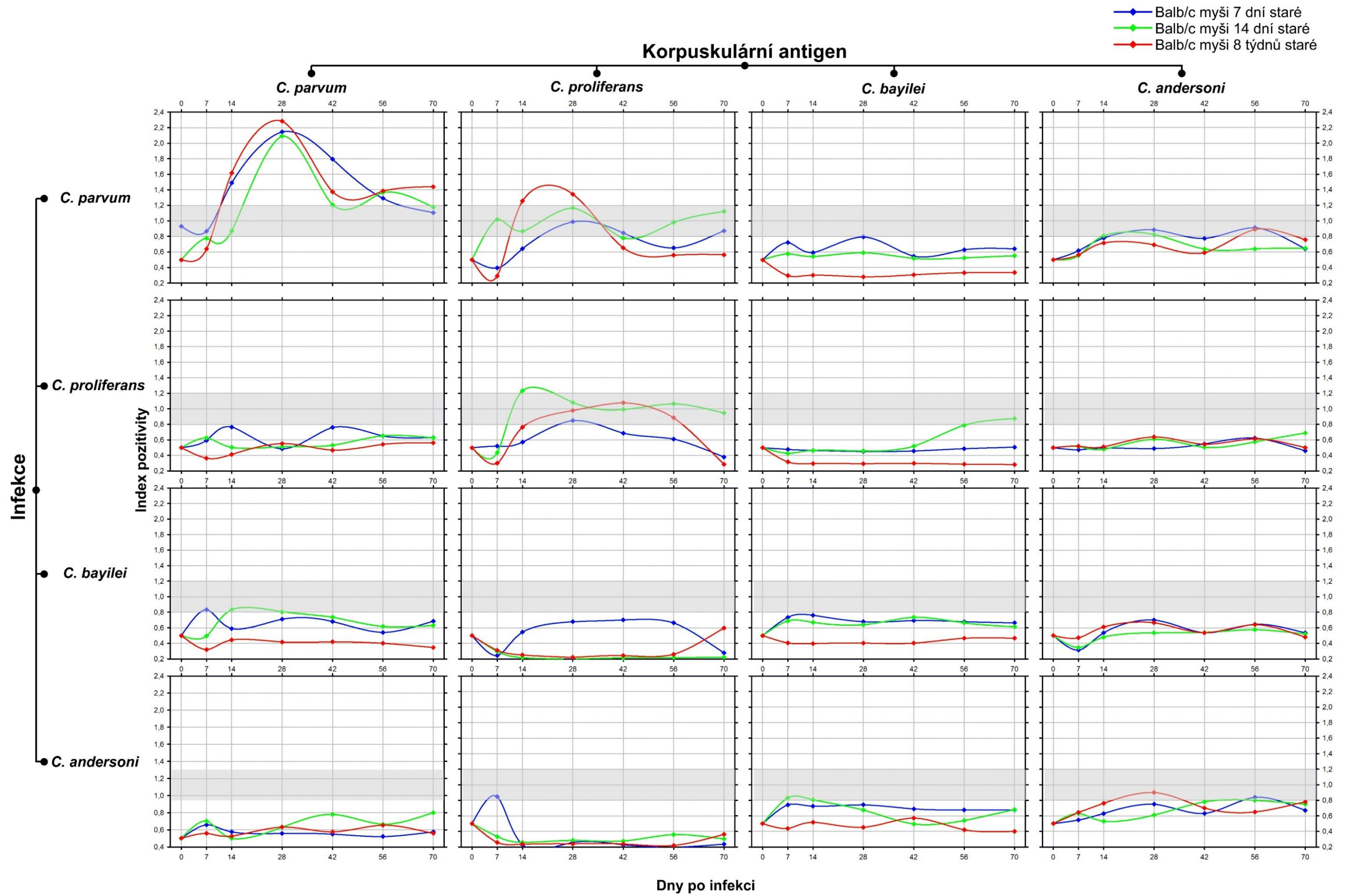
5.2.3 Vývoj protilátkové odpovědi u *Cryptosporidium baileyi* a *Cryptosporidium andersoni*

U myši inokulovaných druhů *C. baileyi* a *C. andersoni* nebyl zaznamenán žádný vývoj protilátkové imunitní odpovědi, který by se projevil přítomností IgM a IgG protilátek v séru inokulovaných myši (Graf 3).

5.3 Zkřížená reakce protilátek na různé korpuskulární antigeny

Z výsledků naší práce je patrné, že IgG protilátky vytvořené proti infekci vyvolané druhem *C. parvum* zkříženě nereagovaly na korpuskulární antigeny *C. andersoni* a *C. baileyi*. U skupiny myši infikovaných druhem *C. parvum* ve stáří 8 týdnů byla 14 a 28 DPI zjištěna zkřížená reakce protilátek s korpuskulárním antigenem *C. proliferans* (Graf 3). Zatímco při použití *C. parvum* jako korpuskulárního antigenu jsme naměřili index pozitivity v hodnotách 1,6 a 2,3, při použití *C. proliferans* jako korpuskulárního antigenu byly hodnoty 1,25 a 1,33.

U zvířat infikovaných *C. proliferans* byla 14 DPI zaznamenána ojedinělá zkřížená reakce na korpuskulární antigenem *C. parvum*, přestože ani IgG ani IgM protilátky nebyly detekovány při použití *C. proliferans* korpuskulárního antigenu.



Graf 3. Přítomnost specifických IgG protilátek u různých věkových kategorií BALB/c myši infikovaných druhy *C. parvum*, *C. proliferans*, *C. andersoni* a *C. baileyi* v závislosti na použitém korpuskulárním antigenu. Šedý pruh znázorňuje hraniční hodnoty (0,8–1,2) indexu positivity. Hodnoty vypočteny jako průměr hodnot získaných ze tří zvířat v každý časový interval.

6 Diskuse

Kryptosporidiové infekce a kryptosporidióza jsou častým onemocněním volně žijících, hospodářsky a zájmově chovaných zvířat a člověka (Cacciò a Widmer 2014). Člověk, stejně jako většina dosud popsanych hostitelů kryptosporidií, může být parazitován celou řadou druhů a genotypů kryptosporidií (Cama et al. 2007; 2008; Gatei et al. 2006; Leoni et al. 2006; Muthusamy et al. 2006; Pedraza-Díaz et al. 2001; Tumwine et al. 2003). S ohledem na častý výskyt oocyst kryptosporidií v kontaminované vodě a potravě (Cacciò a Widmer 2014; Fayer a Xiao 2008), se hostitel během svého života setkává nejen s druhy a genotypy kryptosporidií, které jsou pro něho infekční, ale i s kryptosporidii, které jsou adaptovány na jiné hostitele (Fayer a Xiao 2008). Tato práce je zaměřena na vývoj zkřížené protilátkové imunitní odpovědi hostitele, inbredních myší BALB/c, na infekci druhu s odlišným hostitelským spektrem a lokalizací v trávicím traktu hostitele.

Cryptosporidium parvum je druh se širokou hostitelskou specifitou (Fayer a Xiao 2008). Infekce tímto druhem byly popsány u více než stovky živočišných druhů. Zatímco u typického hostitele, kterým je skot, se tento druh vyznačuje věkovou specifitou, u volně žijících druhů zvířat a u člověka nebyla tato věková preference pozorována (Cama et al. 2008; Li et al. 2020; Mosier et al. 1992; Wagnerová et al. 2016). Průběh infekce u BALBL/c myší v této studii odpovídá dříve uvedeným výsledkům Ahmadian et al. (2016) a vnímavost různých věkových skupin BALB/c myší je obdobná jako je tomu u skotu. Telata do dvou měsíců stáří a myšata do 14 dnů stáří jsou vnímavá k infekci *C. parvum*, zatímco u starších zvířat, skotu i myší, se infekce objevuje jen ojediněle (Mosier et al. 1992). Naopak v případě lidských infekcí vyvolaných druhem *C. parvum* se s věkovou specifitou jako takovou nesetkáváme (Cama et al. 2008). Je pravdou, že děti jsou k infekci vnímavější, ale infekce u dospělých osob není výjimkou (Cox et al. 2005; Priest et al. 2006). Cama et al. (2008) detekovali opakované infekce lidí kryptosporidii, přičemž opakovaná infekce byla způsobena stejným nebo jiným druhem kryptosporidie.

Obdobně je tomu i u infekcí způsobených žaludečními kryptosporidii jako jsou druhy *C. proliferans* a *C. andersoni*. V této práci ani v předchozích studiích nebyla zaznamenána věková specifita (Kváč et al. 2007; 2009; Nguyen et al. 2007). Průběh infekce vyvolaný druhem *C. proliferans* u myší odpovídá dříve publikovaný

údajům (Kváč et al. 2016). Zatímco *C. proliferans* je druh adaptovaný na hlodavce, druh *C. andersoni* je hostitelsky specifický pro skot (Lindsay et al. 2000). Přestože *C. andersoni* bylo experimentálně přeneseno na některé hlodavce (Kváč et al. 2007; 2007; Wang et al. 2008), BALB/c myši jsou v souladu s výsledky Jalovecké (2009) k infekci tímto druhem nevnímavé.

Cryptosporidium baileyi je druh adaptovaný na ptáky (Current et al. 1986). Ve shodě s dřívějšími publikacemi jsme prokázali, že tento druh nedokončuje svůj vývojový cyklus v savcích, respektive v našem případě v BALB/c myších (Current et al. 1986).

Přítomnost protilátek zejména třídy IgG proti kryptosporidiím v séru jedince nemusí nutně znamenat probíhající infekci, ale spíše ukazuje, že se jedinec během života s kryptosporidii setkal a byl jimi infikován (Fayer a Xiao 2008). Předchozí studie ukázaly značnou variabilitu séroprevalence v populaci lidí i zvířat v závislosti na věku, opakované expozici a prostředí, ve kterém jedinec žije (Groves et al. 1994). Procento sérologicky pozitivních jedinců v populaci se obecně zvyšuje s rostoucím věkem (Frost et al. 1998; 2004; Kutsyna 2020; Painter et al. 2016; Zu et al. 1994). Současně s tím bylo zjištěno, že vyšší hladiny protilátek jsou detekovány u starších osob a jedinců, kteří kryptosporidiové infekce prodělali (Priest et al. 2006).

IgM protilátky jsou tvořeny na počátku infekce. Při experimentálních infekcích u lidských dobrovolníků a telat druhem *C. parvum* došlo ke zvýšení IgM protilátek v prvním týdnu po infekci (Okhuysen et al. 1998; Peeters et al. 1992). Zatímco u lidí došlo k rychlému vymizení IgM protilátek ze séra, u telat byly detekované IgM protilátky od 5 DPI a dosáhly vrcholu 14 DPI. Obdobné výsledky byly zjištěny i v dalších pracích (Hill et al. 1990; Ungar et al. 1986). V rozporu s výše uvedenými studiemi, jsme v naší práci nedetekovali přítomnost IgM protilátek u žádné z experimentálních skupin. Absence IgM protilátek v naší studii může být způsobena zvolenými intervaly vyšetření. Je možné, že došlo k vymizení IgM protilátek během prvního týdne po infekci, tedy před námi stanoveným prvním vyšetřením.

Ve shodě s dříve publikovanými výsledky jsme u myší infikovaných *C. parvum* pozorovali postupný nárůst IgG protilátek v průběhu infekce. Během infekce se hladiny IgG protilátek s rostoucí intenzitou infekce zvyšují a po vyléčení opět klesají (Ungar et al. 1986). Na rozdíl od předchozích studií popisujících vývoj

produkce IgG protilátek v závislosti na věku hostitele (Cama et al. 2008; Cox et al. 2005; Priest et al. 2006), naše studie neukázala žádný rozdíl v titru IgG protilátek mezi věkovými skupinami BALB/c myši infikovaných druhem *C. parvum*. Tento rozdíl lze vysvětlit tím, že v naší studii byly všechny věkové skupiny infikovány, zatímco v přírodě nebo v lidské populaci dochází k postupnému promořování populace. Také jsme u těchto skupin zvířat nezaznamenali rozdíl v protilátkové imunitní odpovědi v závislosti na intenzitě infekce a klinických projevech onemocnění, což je v souladu se zjištěním Okhuysen et al. (1998). Všechny myši experimentálně infikované druhem *C. parvum* byly séropozitivní na přítomnost IgG protilátek. Tyto výsledky odpovídají zjištěním Masatani et al. (2018), kdy tito autoři detekovali 95,2% séropozitivitu u telat ve stáří 3–5 měsíců a 98,4% u skotu staršího 12 měsíců. Tuto shodu lze vysvětlit vysokou promořeností jedinců. V rámci naší studie byli infikováni všichni jedinci a u skotu je obecně známá 90–100 % kumulativní prevalence (Masatani et al. 2018). Obdobně vysoká séropozitivita (74–85%) byla detekována i u domácích a zdivočelých koček, přestože počet koprologicky pozitivních zvířat byl výrazně nižší (Mtambo et al. 1995; Tzipori a Campbell 1981). Je třeba zmínit, že přítomnost IgG specifických protilátek u myši infikovaných druhem *C. parvum* byla prokázána při použití antigenu pocházejícího z oocyst *C. parvum*. V případě, že jsme v této práci jako antigen použili oocysty jiných druhů kryptosporidií, vyjma ojedinělého mírného zvýšení při použití antigenu *C. proliferans*, nebyly IgG protilátky proti *C. parvum* detekovány. Tyto výsledky jsou ve shodě s prací Naciri et al. (1994). V práci těchto autorů byla testována zkřížená reaktivita mezi antigeny *C. parvum* a *C. baileyi* u kuřat infikovaných oběma druhy. Studie prokázala přítomnost IgG protilátek proti *C. baileyi* při použití *C. baileyi* antigenu od 7–8 dne po infekci, zatímco při použití *C. parvum* antigenu nedošlo k signifikantnímu prokázání přítomnosti protilátek. Také výsledky studie, při které byl použit 17-a 27-kDa antigen *C. parvum* k detekci IgG protilátek u osob přirozeně infikovaných druhy *C. parvum*, *C. felis*, *C. meleagridis* a *C. hominis*, ukázaly, že procento séropozitivně testovaných osob s prokázanou infekcí se lišilo (Priest et al. 2006). Například IgG protilátky byly detekovány pouze u ~ 60 % jedinců infikovaných různými subtypy *C. hominis*. Výsledky naší a předchozích studií naznačují, že zkřížená reakce se může vyskytovat u fylogeneticky příbuzných druhů kryptosporidií. Zatímco druhy *C. parvum*, *C. meleagridis* nebo *C. hominis* jsou si blízce příbuzné (Morgan-Ryan

et al. 2002; Peng et al. 1997; Pieniazek et al. 1999; Xiao et al. 2001) a protilátky vytvořené proti nim spolu zkříženě reagují, u druhů fylogeneticky vzdálených jako je *C. parvum* a *C. baileyi* nebo *C. parvum* a *C. proliferans* zkříženou reakci nevytváří.

Nepřítomnost specifických protilátek proti inokulu však nemusí nutně znamenat, že k infekci nebo pokusu o infekci hostitele nedošlo. Výsledky naší práce ukazují, že všechna zvířata všech věkových kategorií infikovaných druhem *C. proliferans* prodělala infekci. Přesto jsme až na výjimky nezaznamenali zvýšenou přítomnost specifických IgG protilátek v séru. Také studie na dobrovolnících infikovaných druhem *C. muris* ukázala, že většina dobrovolníků si nevytvořila specifické IgM ani IgG protilátky, přestože infekce u nich prokazatelně proběhla (Chappell et al. 2015). Jalovecká (2009) prokázala, že oocysty *C. andersoni* excystují v žaludku myši a uvolnění sporozoiti se pokusí hostitele nakazit. Přestože nedojde k dokončení vývojového cyklu, proběhlá fáze internalizace sporozoitů na hostitelskou buňku, která je dostatečná k aktivaci buněčné imunity, je identická s odpovědí myši infikovaných druhem *C. proliferans*, který v myši dokončuje svůj vývoj.

Ve studii Hornok et al. (1998) bylo prokázáno, že u slepic kura domácího infikovaných druhem *C. baileyi* dojde k vytvoření specifické protilátkové odpovědi s první detekcí IgG protilátek 12 DPI. V našem experimentu jsme nezaznamenali přítomnost IgG a IgM protilátek u myši inokulovaných *C. baileyi*. Jejich absence je pravděpodobně zapůsobena tím, že *C. baileyi* je druh hostitelsky adaptovaný na ptáky a nedochází k infekci epitelu savčího hostitele a k následné odpovědi imunitního systému. Do úvahy by bylo možné vzít i předpoklad, že stejně jako v případě *C. proliferans* a *C. andersoni* nedošlo k vývoji protilátkové imunitní odpovědi. Nicméně vzhledem k tomu, že *C. baileyi* u svých přirozených hostitelů aktivuje protilátkovou imunitní odpověď (Hornok et al. 1998; Naciri et al. 1994), zatímco *C. proliferans* ne (tato studie), je pravděpodobnější, že u myši nedošlo k infekci epitelu nespecifického hostitele a tím nebyla aktivována protilátková imunitní odpověď. Pro ověření této hypotézy je třeba provést další experimentální studie.

7 Závěr

Výsledky této práce ukázaly, že nedochází ke zkřížené protilátkové imunitní odpovědi mezi jednotlivými druhy kryptosporidií – *C. parvum*, *C. proliferans*, *C. andersoni* a *C. baileyi*. Při vyšetření hostitele na přítomnost specifických protilátek proti kryptosporidiím je tedy třeba brát do úvahy druh a genotyp kryptosporidií, kterým může být hostitel parazitován. V případě použití antigenu, který nereaguje s příslušnými protilátkami může dojít k falešně negativním výsledkům.

Dále jsme zjistili, že v případě infekce naivního hostitele druhem *C. parvum* není průběh protilátkové imunitní odpovědi a množství produkovaných IgG protilátek ovlivněn věkem a průběhem infekce.

Zajímavým zjištěním také je, že žaludeční kryptosporidie savců nestimulují protilátkovou imunitní odpověď, ačkoliv byl hostitel parazitován, což bylo prokázáno mikroskopickou detekcí oocyst v trusu.

8 Seznam zkratek

Ab – Antibody, protilátka

AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome, syndrom získaného selhání imunity

APC – Antigen presenting cells, antigen prezentující buňky

BALB/c – kmen imunokompetentních imbredních myší

BCR – B-cell receptor, B-buněčný receptor

BOFES – Bovine fetal serum, hovězí fetální sérum

CD – cluster of differentiation, označení povrchových znaků buněk

dH₂O – deionizovaná voda

DPI – days post-infection, dny po infekci

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay, enzymově vázaná imunosorbční esej

GIT – gastrointestinální trakt

IEL – intraepiteliární lymfocyty

IFN – Interferon

IgA – Imunoglobulin A

IgD – Imunoglobulin D

IgE – Imunoglobulin E

IgG – Imunoglobulin G

IgM – Imunoglobulin M

IL – Interleukin

kDa – Kilodalton

MHC – Major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex

NK – Natural killer cell

OPD – O-fenylendiamin

OPG – oocysts per gram, počet oocyst v gramu trusu

PBS – Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr

SCID – severe combined immunodeficiency, těžká kombinovaná imunodeficiencie

TCR – T-cell receptor, T-buněčný receptor

T-PBS – Phosphate Buffered Saline + Tween

9 Seznam použité literatury

- ABRAHAMSEN M. S., LANCTO C. A., WALCHECK B., LAYTON W. a JUTILA M. A., 1997. Localization of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes in *Cryptosporidium parvum*-infected tissues in naive and immune calves. *Infection and Immunity*. 65(6), 2428–2433.
- AGUIRRE S. A., MASON P. H. a PERRYMAN L. E., 1994. Susceptibility of major histocompatibility complex (MHC) class I – and MHC class II-deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*. 62(2), 697–699.
- AHMADIAN N., PASHAEI-ASL R., AHMADIAN M., RAHMATI-YAMCHI M., SHAHABI S. a VAZINI H., 2016. Immune response of newborn BALB/c mice to *Cryptosporidium* infection. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*. 40(3), 1066–1070.
- ALDEYARBI H. M. a KARANIS P., 2016. The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology*. 143(6), 749–761.
- ALVAREZ-PELLITERO P., QUIROGA M. I., SITJÀ-BOBADILLA A., REDONDO M. J., PALENZUELA O., PADRÓS F., VÁZQUEZ S. a NIETO J. M., 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms*. 62(1–2), 133–145.
- ALVAREZ-PELLITERO P. a SITJÀ-BOBADILLA A., 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*. 32(8), 1007–1021.
- ARROWOOD M. J. a STERLING C. R., 1987. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *The Journal of Parasitology*. 73(2), 314–319.
- BOHER Y., PEREZ-SCHAEEL I., CACERES-DITTMAR G., URBINA G., GONZALEZ R., KRAAL G. a TAPIA F. J., 1994. Enumeration of selected leukocytes in the small intestine of BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 50(2), 145–151.

- BOLLAND S. J., ZAHEDI A., OSKAM C., MURPHY B. a RYAN U., 2020. *Cryptosporidium bollandi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiales) from angelfish (*Pterophyllum scalare*) and Oscar fish (*Astronotus ocellatus*). *Experimental Parasitology*. 217, 107956.
- BORN W. K., REARDON C. L. a O'BRIEN R. L., 2006. The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 18(1), 31–38.
- BOUZID M., HUNTER P. R., CHALMERS R. M. a TYLER K. M., 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(1), 115–134.
- CACCIÒ S. M. a WIDMER G., 2014. *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer Science & Business Media. ISBN 978-3-7091-1562-6.
- CAMA V. A., BERN C., ROBERTS J., CABRERA L., STERLING C. R., ORTEGA Y., GILMAN R. H. a XIAO L., 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerging Infectious Diseases*. 14(10), 1567–1574.
- CAMA V. A., ROSS J. M., CRAWFORD S., KAWAI V., CHAVEZ-VALDEZ R., VARGAS D., VIVAR A., TICONA E., ÑAVINCOPA M., WILLIAMSON J., ORTEGA Y., GILMAN R. H., BERN C. a XIAO L., 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *Journal of Infectious Diseases*. 196(5), 684–691.
- CARRENO R. A., MARTIN D. S. a BARTA J. R., 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*. 85(11), 899–904.
- CLARK D. P. a SEARS C. L., 1996. The pathogenesis of cryptosporidiosis. *Parasitology Today*. 12(6), 221–225.
- CLODE P. L., KOH W. H. a THOMPSON R. C. A., 2015. Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*? *Trends in Parasitology*. 31(12), 614–624.
- COX M. J., ELWIN K., MASSAD E. a AZEVEDO R. S., 2005. Age-specific seroprevalence to an immunodominant *Cryptosporidium* sporozoite antigen in a Brazilian population. *Epidemiology and Infection*. 133(5), 951–956.

- CURRENT W. L., UPTON S. J. a HAYNES T. B., 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology*. 33(2), 289–296.
- ČONDLOVÁ Š., HORČIČKOVÁ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., HLÁSKOVÁ L., KONEČNÝ R., STANKO M., MCEVOY J. a KVÁČ M., 2018. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. *European Journal of Protistology*. 63, 1–12.
- DANN S. M., OKHUYSEN P. C., SALAMEH B. M., DUPONT H. L. a CHAPPELL C. L., 2000. Fecal Antibodies to *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. *Infection and Immunity*. 68(9), 5068.
- DOYLE P. S., CRABB J. a PETERSEN C., 1993. Anti-*Cryptosporidium parvum* antibodies inhibit infectivity *in vitro* and *in vivo*. *Infection and Immunity*. 61(10), 4079–4084.
- DUPONT H. L., CHAPPELL C. L., STERLING C. R., OKHUYSEN P. C., ROSE J. B. a JAKUBOWSKI W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *The New England Journal of Medicine*. 332(13), 855–859.
- EHIGIATOR H. N., ROMAGNOLI P., BORGELT K., FERNANDEZ M., MCNAIR N., SECOR W. E. a MEAD J. R., 2005. Mucosal cytokine and antigen-specific responses to *Cryptosporidium parvum* in IL-12p40 KO mice. *Parasite Immunology*. 27(1–2), 17–28.
- EICHELBERGER M. C., SURESH P. a REHG J. E., 2000. Protection from *Cryptosporidium parvum* infection by gammadelta T cells in mice that lack alphabeta T cells. *Comparative Medicine*. 50(3), 270–276.
- ELWIN K., HADFIELD S. J., ROBINSON G., CROUCH N. D. a CHALMERS R. M., 2012. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. *International Journal for Parasitology*. 42(7), 675–682.
- ENRIQUEZ F. J. a STERLING C. R., 1993. Role of CD4+ TH1- and TH2-cell-secreted cytokines in cryptosporidiosis. *Folia Parasitologica*. 40(4), 307–311.

- FAYER R., GASBARRE L., PASQUALI P., CANALS A., ALMERIA S. a ZARLENGA D., 1998. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology*. 28(1), 49–56.
- FAYER R., TROUT J. M., XIAO L., MORGAN U. M., LAI A. A. a DUBEY J. P., 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *The Journal of Parasitology*. 87(6), 1415–1422.
- FAYER R., 2000. Global change and emerging infectious diseases. *Journal of Parasitology*. 86(6), 1174–1181.
- FAYER R. a SANTÍN M., 2009. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*. 164(2–4), 192–200.
- FAYER R., SANTÍN M. a MACARISIN D., 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*. 172(1–2), 23–32.
- FAYER R., SANTÍN M. a TROUT J. M., 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*. 156(3–4), 191–198.
- FAYER R., SANTÍN M. a XIAO L., 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Parasitology*. 91(3), 624–629.
- FAYER R. a XIAO L., 2008. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press. ISBN 978-1-4200-5227-5.
- FROST F. J., CALDERON R. L., MULLER T. B., CURRY M., RODMAN J. S., MOSS D. M. a DE LA CRUZ A. A., 1998. A two-year follow-up survey of antibody to *Cryptosporidium* in Jackson County, Oregon following an outbreak of waterborne disease. *Epidemiology and Infection*. 121(1), 213–217.
- FROST F. J., MULLER T. B., CALDERON R. L. a CRAUN G. F., 2004. Analysis of serological responses to *Cryptosporidium* antigen among NHANES III participants. *Annals of Epidemiology*. 14(7), 473–478.

- GAO G. F., RAO Z. a BELL J. I., 2002. Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends in Immunology*. 23(8), 408–413.
- GATEI W., WAMAE C. N., MBAE C., WARURU A., MULINGE E., WAITHERA T., GATIKA S. M., Stanely KAMWATI K., REVATHI G. a 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.
- GROVES V. J., LEHMANN D. a GILBERT G. L., 1994. Seroepidemiology of cryptosporidiosis in children in Papua New Guinea and Australia. *Epidemiology and Infection*. 113(3), 491–499.
- HARP J. A., WHITMIRE W. M. a SACCO R., 1994. *In vitro* proliferation and production of gamma interferon by murine CD4+ cells in response to *Cryptosporidium parvum* antigen. *The Journal of Parasitology*. 80(1), 67–72.
- HAYDAY A. a TIGELAAR R., 2003. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nature Reviews. Immunology*. 3(3), 233–242.
- HAYWARD A. R., CHMURA K. a COSYNS M., 2000. Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. *The Journal of Infectious Diseases*. 182(3), 1001–1004.
- HEINE J., MOON H. W. a WOODMANSEE D. B., 1984. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infection and Immunity*. 43(3), 856–859.
- HILL B. D., BLEWETT D. A., DAWSON A. M. a WRIGHT S., 1990. Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. *Research in Veterinary Science*. 48(1), 76–81.
- HNASKO R., ed., 2015. ELISA: Methods and Protocols. Humana Press. Methods in Molecular Biology. 420 s. ISBN 978-1-4939-2741-8.
- HOLUBOVÁ N., SAK B., HORČIČKOVÁ M., HLÁSKOVÁ L., KVĚTOŇOVÁ D., MENCHACA S., MCEVOY J. a KVÁČ M., 2016. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitology Research*. 115(6), 2243–2251.

- HOLUBOVÁ N., TŮMOVÁ L., SAK B., HEJZLAROVÁ A., KONEČNÝ R., MCEVOY J. a KVÁČ M., 2020. Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. *Parasites & Vectors*. 13(1), 340.
- HOLUBOVÁ N., ZIKMUNDOVÁ V., LIMPOUCHOVÁ Z., SAK B., KONEČNÝ R., HLÁSKOVÁ L., RAJSKÝ D., KOPACZ Z., MCEVOY J. a KVÁČ M., 2019. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *European Journal of Protistology*. 69, 70–87.
- HOMMER V., EICHHOLZ J. a PETRY F., 2003. Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52(3), 359–364.
- HOOVER D. M., HOERR F. J., CARLTON W. W., HINSMAN E. J. a FERGUSON H. W., 1981. Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus* Bloch and Schneider. *Journal of Fish Diseases*. 4(5), 425–428.
- HORČIČKOVÁ M., ČONDLOVÁ Š., HOLUBOVÁ N., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., HLÁSKOVÁ L., KONEČNÝ R., SEDLÁČEK F., CLARK M., GIDDINGS C., MCEVOY J. a 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.
- HORNOK S., BITAY Z., SZÉLL Z. a VARGA I., 1998. Assessment of maternal immunity to *Cryptosporidium baileyi* in chickens. *Veterinary Parasitology*. 79(3), 203–212.
- HOŘEJŠÍ V., BARTŮŇKOVÁ J., BRDIČKA T. a ŠPÍŠEK R., 2017. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. Triton, Praha. 304 s. ISBN 978-80-7553-250-3.
- CHAPPELL C. L., OKHUYSEN P. C., LANGER-CURRY R. C., LUPO P. J., WIDMER G. a TZIPORI S., 2015. *Cryptosporidium muris*: infectivity and illness in healthy adult volunteers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 92(1), 50–55.

- CHECKLEY W., WHITEA. C., JAGANATH D., ARROWOOD M. J., CHALMERS R. M., CHEN X., FAYER R., GRIFFITHS J. K., GUERRANT R. L., HEDSTROM L., HUSTON C. D., L KOTLOFF K., KANG G., MEAD J. R., MILLER M., PETRI W. A., PRIEST J. W., ROOS D. S., STRIEPEN B., THOMPSON R. C. A., WARD H. D., VAN VOORHIS W. A., XIAO L., ZHU G. a HOUPPT 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.
- CHEN W., HARP J. A. a HARMSSEN A. G., 1993. Requirements for CD4+ cells and gamma interferon in resolution of established *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Infection and Immunity*. 61(9), 3928–3932.
- CHEN X. a LARUSSO N. F., 2002. Cryptosporidiosis and the pathogenesis of AIDS-cholangiopathy. *Seminars in Liver Disease*. 22(3), 277–289.
- INMAN L. R. a TAKEUCHI A., 1979. Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Veterinary Pathology*. 16(1), 89–95.
- ISEKI M., 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Japanese journal of parasitology*. *Japanese journal of parasitology*. 28 (5), 285–307.
- JALOVECKÁ M., 2009. Imunitní odpověď myši na infekci žaludečními kryptosporidiiemi. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.
- JANEWAY C. A. Jr., TRAVERS P., WALPORT M., SHLOMCHIK M. J., Paul TRAVERS, Mark WALPORT a Mark J. SHLOMCHIK, 2001. *Immunobiology*. 5th vyd. Garland Science. 823 s. ISBN 978-0-8153-3642-6.
- JEŽKOVÁ J., HORČIČKOVÁ M., HLÁSKOVÁ L., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., NOVÁK J., HOFMANNOVÁ L., MCEVOY J. a KVAČ M., 2016. *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium tortoise* genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitologica*. 63.

- JEŽKOVÁ J., PREDIGER J., HOLUBOVÁ N., SAK B., KONEČNÝ R., FENG Y., XIAO L., ROST M., MCEVOY J. a KVÁČ M., 2021. *Cryptosporidium ratti* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in the Czech Republic. *Parasitology*. 148(1), 84–97.
- JÍLEK P., 2014. Imunologie: stručně, jasně, přehledně. Grada Publishing, a.s. 96 s. ISBN 978-80-247-4822-1.
- JÍRA J., 2009. Lékařská protozoologie: protozoální nemoci. 1. vyd. Praha: Galén. 567 s. ISBN 978-80-7262-381-5.
- JIRKŮ M., VALIGUROVÁ A., KOUDELA B., KŘÍŽEK J., MODRÝ D. a ŠLAPETA J., 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*. 55(2), 81–94.
- KALIA V., SARKAR S., GOURLEY T. S., ROUSE B. T. a AHMED R., 2006. Differentiation of memory B and T cells. *Current Opinion in Immunology*. 18(3), 255–264.
- KOHL T. O. a ASCOLI C. A., 2017. Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2017(5), ISSN 1940-3402, 1559-6095.
- KREJSEK J., ANDRÝS C. a KRČMOVÁ I., 2016. Imunologie člověka. 1. vydání. Hradec Králové: Garamon s.r.o., 496 s. ISBN 978-80-86472-74-4.
- KUTSYNA V., 2020. Séroprevalence *Cryptosporidium* spp. v lidské populaci. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
- KVÁČ M., KODÁDKOVÁ A., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., JALOVECKÁ M., ROST M. a SALÁT J., 2011. Activated CD8+ T cells contribute to clearance of gastric *Cryptosporidium muris* infections. *Parasite Immunology*. 33(4), 210–216.
- KVÁČ M., HANZLÍKOVÁ D., SAK B. a KVĚTOŇOVÁ D., 2009. Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*. 160(3–4), 319–322.

- KVÁČ M., HAVRDOVÁ N., HLÁSKOVÁ L., DAŇKOVÁ T., KANDĚRA J., JEŽKOVÁ J., VÍTOVEC J., SAK B., ORTEGA Y., XIAO L., MODRÝ D., CHELLADURAI J. R. J. J., PRANTLOVÁ V. a MCEVOY J., 2016. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and Biological Evidence of Cryptic Species within Gastric *Cryptosporidium* of Mammals. *PLOS ONE*. 11(1).
- KVÁČ M., HOFMANNOVÁ L., HLÁSKOVÁ L., KVĚTOŇOVÁ D., VÍTOVEC J., MCEVOY J. a SAK B., 2014. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology*. 201(1–2), 9–17.
- KVÁČ M., KESTŘÁNOVÁ M., PINKOVÁ M., KVĚTOŇOVÁ D., KALINOVÁ J., WAGNEROVÁ P., KOTKOVÁ M., VÍTOVEC J., DITRICH O., MCEVOY J., STENGER B. a SAK B., 2013. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology*. 191(3–4), 218–227.
- KVÁČ M., ONDRÁČKOVÁ Z., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B. a VÍTOVEC J., 2007. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology*. 143(3), 229–233.
- KVÁČ M., VLNATÁ G., JEŽKOVÁ J., HORČIČKOVÁ M., KONEČNÝ R., HLÁSKOVÁ L., MCEVOY J. a SAK B., 2018. *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *European Journal of Protistology*. 63, 96–104.
- LARDEUX F., TORRICO G. a ALIAGA C., 2016. Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 111(8), 501–504.
- LASSER K. H., LEWIN K. J. a RYNING F. W., 1979. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Human Pathology*. 10(2), 234–240.

- LEAV B. A., YOSHIDA M., ROGERS K., COHEN S., GODIWALA N., BLUMBERG R. S. a WARD H., 2005. An early intestinal mucosal source of gamma interferon is associated with resistance to and control of *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Infection and Immunity*. 73(12), 8425–8428.
- LEONI F., AMAR C., NICHOLS G., PEDRAZA-DÍAZ S. a MCLAUCHLIN J., 2006. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology*. 55(6), 703–707.
- LEVINE N. D., 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *The Journal of Parasitology*. 66(5), 830–834.
- LI F., ZHANG Z., HU S., ZHAO W., ZHAO J., KVÁČ M., GUO Y., LI N., FENG Y. a XIAO L., 2020. Common occurrence of divergent *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* subtypes in farmed bamboo rats (*Rhizomys sinensis*). *Parasites & Vectors*. 13(1), 149.
- LI X., PEREIRA M. G. C., LARSEN R., XIAO C., PHILLIPS R., STRIBY K., MCCOWAN B. a ATWILL E. R., 2015. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 4(3), 343–350.
- LINDSAY D. S., UPTON S. J., OWENS D. S., MORGAN U. M., MEAD J. R. a BLAGBURN B. L., 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47(1), 91–95.
- LINDSAY D. S. a BLAGBURN B.L., 1990. *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. CRC Press. 209 s. ISBN 978-1-351-08816-9.
- MAC KENZIE W. R., HOXIE N. J., PROCTOR M. E., GRADUS M. S., BLAIR K. A., PETERSON D. E., KAZMIERCZAK J. J., ADDISS D. G., FOX K. R. a ROSE J. B., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*. 331(3), 161–167.
- MACDONALD T. T. a SPENCER J., 1992. Cell-mediated immune injury in the intestine. *Gastroenterology Clinics of North America*. 21(2), 367–386.

- MASATANIT., FERREIG R. M., OTOMARU K., ISHIKAWA S., KOJIMA I., HOBOS. a NISHIKAWA Y., 2018. Seroprevalence of *Cryptosporidium parvum* and *Neospora caninum* in cattle in the southern Kyushu region of Japan. *Parasitology International*. 67(6), 763–767.
- MCDONALD S. A. C., O'GRADY J. E., BAJAJ-ELLIOTT M., NOTLEY C. A., ALEXANDER J., BROMBACHER F. a MCDONALD V., 2004. Protection against the early acute phase of *Cryptosporidium parvum* infection conferred by interleukin-4-induced expression of T helper 1 cytokines. *The Journal of Infectious Diseases*. 190(5), 1019–1025.
- MCDONALD V., DEER R., UNI S., ISEKI M. a BANCROFT G. J., 1992. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infection and Immunity*. 60(8), 3325–3331.
- MCDONALD V., KORBEL D. S., BARAKAT F. M., CHOUDHRY N. a PETRY F., 2013. Innate immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *Parasite Immunology*. 35(2), 55–64.
- MCDONALD V., ROBINSON H. A., KELLY J. P. a BANCROFT G. J., 1994. *Cryptosporidium muris* in adult mice: adoptive transfer of immunity and protective roles of CD4 versus CD8 cells. *Infection and Immunity*. 62(6), 2289–2294.
- MCDONALD V., SMITH R., ROBINSON H. a BANCROFT G., 2000. Host immune responses against *Cryptosporidium*. *Contributions to Microbiology*. 6, 75–91.
- MEAD J. R., ARROWOOD M. J., HEALEY M. C. a SIDWELL R. W., 1991. Cryptosporidial infections in SCID mice reconstituted with human or murine lymphocytes. *The Journal of Protozoology*. 38(6), 59S–61S.
- MEISEL J. L., PERERA D. R., MELIGRO C. a RUBIN C. E., 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*. 70(6), 1156–1160.
- MELICHEROVÁ J., ILGOVÁ J., KVÁČ M., SAK B., KOUDELA B. a VALIGUROVÁ A., 2014. Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology*. 141(2), 287–303.

- MILÁČEK P. a VÍTOVEC J., 1985. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica*. 32(1), 50.
- MORGAN-RYAN U. M., FALL A., WARD L. A., HIJJAWI N., SULAIMAN I., FAYER R., THOMPSON R. C. A., OLSON M., LAL A. a XIAO L., 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 49(6), 433–440.
- MOSIER D. A., KUHLS T. L., SIMONS K. R. a OBERST R. D., 1992. Bovine humoral immune response to *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(12), 3277–3279.
- MTAMBO M. M., NASH A. S., WRIGHT S. E., SMITH H. V., BLEWETT D. A. a JARRETT O., 1995. Prevalence of specific anti-*Cryptosporidium* IgG, IgM and IgA antibodies in cat sera using an indirect immunofluorescence antibody test. *Veterinary Parasitology*. 60(1–2), 37–43.
- MUTHUSAMY D., RAO S. S., RAMANI S., MONICA B., BANERJEE I., ABRAHAM O. C., MATHAI D. C., PRIMROSE B., MULIYIL J., WANKE C. A., WARD H. D. a KANG G., 2006. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(2), 632–634.
- NACIRI M., MANCASSOLA R., RÉPÉRANT J. M. a YVORÉ P., 1994. Analysis of humoral immune response in chickens after inoculation with *Cryptosporidium baileyi* or *Cryptosporidium parvum*. *Avian Diseases*. 38(4), 832–838.
- NGUYEN S. T., NGUYEN D. T., LE D. Q., LE HUA L. N., VAN NGUYEN T., HONMA H. a NAKAI Y., 2007. Prevalence and first genetic identification of *Cryptosporidium* spp. in cattle in central Viet Nam. *Veterinary Parasitology*. 150(4), 357–361.
- NIME F. A., BUREK J. D., PAGE D. L., HOLSCHER M. A. a YARDLEY J. H., 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 70(4), 592–598.

- OKHUYSEN P. C., CHAPPELL C. L., STERLING C. R., JAKUBOWSKI W. a DUPONT H. L., 1998. Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. *Infection and Immunity*. 66(2), 441–443.
- PAINTER J. E., GARGANO J. W., YODER J. S., COLLIER S. A. a HLAVSA M. C., 2016. Evolving epidemiology of reported cryptosporidiosis cases in the United States, 1995-2012. *Epidemiology and Infection*. 144(8), 1792–1802.
- PANCIERA R. J., THOMASSEN R. W. a GARNER F. M., 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*. 8(5–6), 479–484.
- PAPERNA I. a VILENKIN M., 1996. Cryptosporidiosis in the gourami *Trichogaster leeri*: description of a new species and a proposal for a new genus, *Piscicryptosporidium*, for species infecting fish. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27, 95-101.
- PAVLÁSEK I. a RYAN U., 2008. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. *Experimental Parasitology*. 118(3), 434–437.
- PEDRAZA-DÍAZ S., AMAR C. F. L., MCLAUCHLIN J., NICHOLS G. L., COTTON K. M., GODWIN P., IVERSEN A. M., MILNE L., MULLA J. R., NYE K., PANIGRAHL H., VENN S. R., WIGGINS R., WILLIAMS M. a YOUNGS E. R., 2001. *Cryptosporidium meleagridis* from Humans: Molecular Analysis and Description of Affected Patients. *Journal of Infection*. 42(4), 243–250.
- PEETERS J. E., VILLACORTA I., VANOPDENBOSCH E., VANDERGHEYNST D., NACIRI M., ARES-MAZÁS E. a YVORÉ P., 1992. *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infections. *Infection and Immunity*. 60(6), 2309–2316.
- PENG M. M., XIAO L., FREEMAN A. R., ARROWOOD M. J., ESCALANTE A. A., WELTMAN A. C., ONG C. S., MAC KENZIE W. R., LAL A. A. a BEARD C. B., 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases*. 3(4), 567–573.

- PERRYMAN L. E., MASON P. H. a CHRISP C. E., 1994. Effect of spleen cell populations on resolution of *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice. *Infection and Immunity*. 62(4), 1474–1477.
- PIENIAZEK N. J., BORNAY-LLINARES F. J., SLEMENDA S. B., da SILVA A. J., MOURA I. N. S., ARROWOOD M. J., DITRICH O. a ADDISS D. G., 1999. New *Cryptosporidium* Genotypes in HIV-Infected Persons. *Emerg Infect Dis*.5(3), 444-9.
- POWER M. L. a RYAN U., 2008. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *The Journal of Parasitology*. 94(5), 1114–1117.
- PRIEST J. W., BERN C., XIAO L., M. ROBERTS J., KWON J. P., LESCANO A. G., CHECKLEY W., CABRERA L., MOSS D. M., ARROWOOD M. J., STERLING C. R., GILMAN R. H. a LAMMIE P. J., 2006. Longitudinal analysis of *Cryptosporidium* species-specific smmunoglobulin G antibody aesponses in Peruvian children. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13(1), 123–131.
- REN X., ZHAO J., ZHANG L., NING C., JIAN F., WANG R., LV C., WANG Q., ARROWOOD M. J. a XIAO L., 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*. 130(3), 274–281.
- RIDGE S. E. a VIZARD A. L., 1993. Determination of the optimal cutoff value for a serological assay: an example using the Johne’s Absorbed EIA. *Journal of Clinical Microbiology*. 31(5), 1256–1261.
- ROBINSON G., WRIGHT S., ELWIN K., HADFIELD S. J., KATZER F., BARTLEY P. M., HUNTER P. R., NATH M., INNES E. A. a CHALMERS R. M., 2010. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*. 40(13), 1539–1548.
- RYAN U., MONIS P., ENEMARK H. L., SULAIMAN I., SAMARASINGHE B., READ C., BUDDLE R., ROBERTSON I., ZHOU L., THOMPSON R. C. A.a XIAO L., 2004. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *The Journal of Parasitology*. 90(4), 769–773.

- RYAN U., XIAO L., READ C., SULAIMAN I. M., MONIS P., LAL A. A., FAYER R. a PAVLÁSEK I., 2003. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *The Journal of Parasitology*. 89(4), 809–813.
- RYAN U., POWER M. a XIAO L., 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 55(1), 22–26.
- RYAN U., PAPARINI A., TONG K., YANG R., GIBSON-KUEH S., O'HARA A., LYMBERY A. a XIAO L., 2015. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*. 150, 31–35.
- SLAVIN D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*. 65(3), 262–266.
- SLIFKO T., FRIEDMAN D., ROSE J. a JAKUBOWSKI W., 1997. An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Applied and environmental microbiology*. 63, 3669–75.
- SVOBODOVÁ V., SVOBODA M. a VERNEROVÁ E., 2013. Klinická parazitologie psa a kočky. 2. vydání. Medicus Veterinarius. 256 s. ISBN 80-905468-1-1.
- TILLEY M., MCDONALD V. a BANCROFT G. J., 1995. Resolution of cryptosporidial infection in mice correlates with parasite-specific lymphocyte proliferation associated with both Th1 and Th2 cytokine secretion. *Parasite Immunology*. 17(9), 459–464.
- TOMAN M., BÁRTA O., DOSTÁL J., FALDYNA M., HOLÁŇ V., HRUBAN V., JEKLOVÁ E., KNOTEK Z., KOPECKÝ J. a KOUDERA B., 2009. Veterinární imunologie, 2. vydání. Grada Publishing, Praha. 413 s. ISBN 80-7169-727-3.
- TUMWINE J. K., KEKITIINWA A., NABUKEERA N., AKIYOSHI D. E., RICH S. M., WIDMER G., FENG X. a TZIPORI S., 2003. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 68(6), 710–715.
- TYZZER E. E., 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 5(1), 12–13.

- TYZZER E. E., 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium Muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of Medical Research*. 23(3), 487-510.3. ISSN 0097-3599.
- TYZZER E. E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26, 394–412.
- TZIPORI S., 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiological Reviews*. 47(1), 84–96.
- TZIPORI S. a CAMPBELL I., 1981. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 14(4), 455–456. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.14.4.455-456.1981
- UNGAR B. L., BURRIS J. A., QUINN C. A. a FINKELMAN F. D., 1990. New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. *Infection and Immunity*. 58(4), 961–969.
- UNGAR B. L., KAO T. C., BURRIS J. A. a FINKELMAN F. D., 1991. *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN-gamma and CD4+ T lymphocytes in protective immunity. *The Journal of Immunology*. 147(3), 1014–1022.
- UNGAR B. L., SOAVE R., FAYER R. a NASH T. E., 1986. Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *The Journal of Infectious Diseases*. 153(3), 570–578.
- UPTON S. J. a CURRENT W. L., 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *The Journal of Parasitology*. 71(5), 625–629.
- URBAN J. F., FAYER R., CHEN S. J., GAUSE W. C., GATELY M. K. a FINKELMAN F. D., 1996. IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Immunology*. 156(1), 263–268.

- VAN ZEELAND Y. R. A., SCHOEMAKER N. J., KIK M. J. L. a VAN DER GIESSEND J. W. B., 2008. Upper respiratory tract infection caused by *Cryptosporidium baileyi* in three mixed-bred falcons (*Falco rusticolus* × *Falco cherrug*). *Avian Diseases*. 52(2), 357–363.
- VETTERLING J. M., JERVIS H. R., MERRILL T. G. a SPRINZ H., 1971. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *The Journal of Protozoology*. 18(2), 243–247.
- WAGNEROVÁ P., SAK B., MCEVOY J., ROST M., SHERWOOD D., HOLCOMB K. a KVÁČ M., 2016. *Cryptosporidium parvum* and *Enterocytozoon bienersi* in American Mustangs and Chincoteague ponies. *Experimental Parasitology*. 162, 24–27.
- WALLER R. F. a MCFADDEN G.I., 2005. The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Current Issues in Molecular Biology*. 7(1), 57–79.
- WANG R., MA G., ZHAO J., LU Q., WANG H., ZHANG L., JIAN F., NING C. a XIAO L., 2011. *Cryptosporidium andersoni* is the predominant species in post-weaned and adult dairy cattle in China. *Parasitology International*. 60(1), 1–4.
- WANG R., ZHANG L., NING C., FENG Y., JIAN F., XIAO L., LU B., AI W. a DONG H., 2008. Multilocus phylogenetic analysis of *Cryptosporidium andersoni* (Apicomplexa) isolated from a bactrian camel (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasitology Research*. 102(5), 915–920.
- WATERS W. R. a HARP J. A., 1996. *Cryptosporidium parvum* infection in T-cell receptor (TCR)-alpha- and TCR-delta-deficient mice. *Infection and Immunity*. 64(5), 1854–1857.
- WYAT C. R., BRACKETT E. J. a BARRETT W. J., 1999. Accumulation of mucosal T lymphocytes around epithelial cells after in vitro infection with *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Parasitology*. 85(4), 765–768.
- XIAO L., BERN C., LIMOR J., SULAIMAN I., ROBERTS J., CHECKLEY W., CABRERA L., GILMAN R. H. a LAL A. A., 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases*. 183(3), 492–497.

- ZAHEDI A., BOLLAND S. J., OSKAM C. L. a RYAN U., 2021. *Cryptosporidium abrahamseni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidii) from red-eye tetra (*Moenkhausia sanctaefilomenae*). *Experimental Parasitology*. 223, 108089.
- ZAHEDI A., DURMIC Z., GOFTON A.W., KUEH S., AUSTEN J., LAWSON M., CALLAHAN L., JARDINE J. a RYAN U., 2017. *Cryptosporidium homai* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidii) from the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Veterinary Parasitology*. 245, 92–101.
- ZHU G., MARCHEWKA M. J. a KEITHLY J. S., 2000. *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology (Reading, England)*. 146 (2), 315–321.
- ZU S. X., LI J. F., BARRETT L. J., FAYER R., SHU S. Y., MCAULIFFE J. F., ROCHE J. K. a GUERRANT R. L., 1994. Seroepidemiologic study of *Cryptosporidium* infection in children from rural communities of Anhui, China and Fortaleza, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 51(1), 1–10.