



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ FAKULTA

Katedra zootechnických věd

Bakalářská práce

**Faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií
přežvýkavců**

Autorka práce: Hana Dudáková
Vedoucí práce: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
Konzultant práce: Mgr. Lenka Tůmová

České Budějovice
2022

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne 11. 4. 2022

Podpis

Abstrakt

V této práci jsme zkoumali vliv teploty a pH na excystaci žaludečních kryptosporidií u savců. Pro účely dosažení cílů práce byly použity oocysty *Cryptosporidium andersoni* izolát MV získaný z přirozeně infikované krávy bez tržní produkce mléka. Životaschopnost oocyst byla stanovena barvením pomocí propidium jodidu (PI). Prvním zkoumaným faktorem byla teplota. Oocysty skladované v dH₂O byly zahřívány ve vodní lázni na teploty od 32 do 44 °C po dobu 5, 15 a 30 minut. Se vzrůstající teplotou a prodlužujícím se časem jsme pozorovali vyšší procento excystovaných oocyst. Nejvíce oocyst excystovalo při teplotě 40 °C zahřívání po dobu 30 minut. Dále se schopnost excystace oocyst zkoumala v roztocích o různém pH (2–9), které byly zahřívány ve vodní lázni na 40 °C. Optimální pH pro excystaci se pohybuje v rozmezí 6 až 7. Nicméně i při nižších hodnotách excystuje dostatečné množství oocyst, které jsou potřebné pro vyvolání infekce.

Klíčová slova: *Cryptosporidium andersoni*, pH, teplota, čas, přežvýkavci, excystace

Abstract

In this study, we investigated the effects of temperature and pH on the excystation of gastric *Cryptosporidium* of mammals. Oocysts of *Cryptosporidium andersoni*, obtained from a naturally infected cow, were used in this study. Oocyst viability was determined by propidium iodide staining (PI). The first factor studied was temperature. Oocysts stored in dH₂O were incubated in water bath preheated to temperatures between 32 and 44 °C for 5, 15, and 30 min. With increasing temperature and time, we observed a higher percentage of excysted oocysts. Most oocysts excysted at 40 °C and heating for 30 minutes. In addition, excystation of oocysts was also examined in solutions with different pH values (in a range of 2–9) heated in a water bath at 40 °C. The optimal pH for excysting is between 6 and 7; however, even at lower values, enough oocysts excyst to cause infection.

Keywords: *Cryptosporidium andersoni*, pH, temperature, time, ruminants, excystation

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Ing. Martinu Kváči, Ph.D. za vedení, věcné rady, připomínky a pomoc při psaní bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Lence Tůmové za její ochotu, pomoc a trpělivost s celou mou prací v laboratoři během celého výzkumu.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GACR 21-23773S.

Obsah

Úvod.....	8
1 Literární přehled.....	9
1.1 Kryptosporidie.....	9
1.2 Kryptosporidióza	10
1.3 Hostitelská a tkáňová specifita	11
1.4 Vývojový cyklus.....	13
1.4.1 Excystace.....	14
1.4.2 Merogonie	15
1.4.3 Gametogonie a oplodnění	15
1.4.4 Tvorba stěny oocyst	16
1.4.5 Sporogonie	16
1.5 Žaludeční kryptosporidie savců.....	16
1.6 <i>Cryptosporidium andersoni</i>	17
1.6.1 Lokalizace	17
1.6.2 Velikost oocyst.....	17
1.6.3 Hostitelé	17
1.6.4 Průběh infekce.....	18
1.6.5 Patogenita.....	18
1.7 <i>Cryptosporidium muris</i>	18
1.7.1 Lokalizace	18
1.7.2 Velikost oocyst.....	18
1.7.3 Hostitelé	19
1.7.4 Průběh infekce.....	19
1.7.5 Patogenita.....	19
1.8 <i>Cryptosporidium proliferans</i>	19
1.8.1 Lokalizace	19

1.8.2	Velikost oocyst.....	19
1.8.3	Hostitelé	20
1.8.4	Průběh infekce.....	20
1.8.5	Patogenita.....	20
2	Cíl práce	21
3	Materiál a metodika.....	22
3.1	Materiál	22
3.1.1	Oocysty kryptosporidií pro experiment	22
3.1.2	Příprava roztoků o různém pH	22
3.2	Metody.....	22
3.2.1	Flotační metoda.....	22
3.2.2	Čištění oocyst na cukerném gradientu (Arrowood a Stearling 1987)..	23
3.2.3	Čištění oocyst na césium chloridovém gradientu (Arrowood a Donaldson 1996)	24
3.2.4	Průtoková cytometrie	24
3.2.5	Ověření identity používaného izolátu	27
3.2.6	Statistické zhodnocení.....	30
4	Výsledky	31
4.1	Vitalita kryptosporidií	31
4.2	Faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií.....	31
4.2.1	Vliv teploty na excystaci.....	31
4.2.2	Vliv pH na excystaci	32
5	Diskuse.....	34
	Závěr	37
	Seznam použité literatury.....	38
	Seznam tabulek	52
	Seznam obrázků	53

Úvod

Kryptosporidie jsou jednobuněčné eukaryotní organismy spadající do kmene Apicomplexa (Volf a Horák, 2007). Zástupci tohoto kmene patří do skupiny veterinárně velmi závažných parazitů, způsobujících celosvětové nákazy, kryptosporidiózy, u zvířat i lidí (Current a Garcia, 1991). Závažnost, průběh a konečná fáze infekce závisí na druhu parazita a na hostitelských faktorech, kam můžeme zařadit např. imunitní systém jedince nebo frekvenci expozice infikovaného jedince (Bouzid et al., 2013). Lokalizace vývojového cyklu kryptosporidií v hostiteli se může lišit. Na základě lokalizace rozdělujeme kryptosporidie na dvě hlavní skupiny: početnější skupina střevních kryptosporidií a méně početná skupina kryptosporidií žaludečních, které mají afinitu ke žlázám žaludeční sliznice (Tyzzer, 1907).

Excystace je první fází vývojového cyklu, při které je parazit vystaven podmínkám v žaludku a v případě střevních druhů poté působení pankreatických enzymů a žlučových solí. Vystavení parazita těmto podmínkám ovlivňuje jeho excystaci (Fayer et al., 1990). Dalšími, velmi významnými faktory ovlivňujícími excystaci jsou pH a teplota. Teplota a pH mají kromě vlivu na excystaci také významný vliv na životaschopnost oocyst a sporozoitů. Do současné doby se těmito vlivy zabývalo velmi málo studií, přičemž většina prací byla zaměřena na studium střevních druhů a druhy parazitující v žaludku zůstávají dlouhodobě mimo zájem výzkumných týmů (Fayer a Leek, 1984; Curtiss et al., 2015).

Z tohoto důvodu byla tato práce zaměřena na faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií přežvýkavců.

1 Literární přehled

1.1 Kryptosporidie

Kryptosporidie jsou jednobuněčné eukaryotní organismy spadající do kmene Apicomplexa (Volf a Horák, 2007). Jsou označovány jako obligátní gastrointestinální apikomplexní paraziti, kteří mohou infikovat většinu vodních živočichů a všechny suchozemské obratlovce včetně člověka (Bouzid et al., 2013). Zástupci tohoto kmene patří mezi veterinárně velmi závažné parazity. Většina z nich jsou intracelulární paraziti, adaptovaní na život uvnitř buňky (Volf a Horák, 2007).

První záznam o parazitech rodu *Cryptosporidium* se datuje na začátek 20. století. Za popisem rodu stojí lékař Ernest Edward Tyzzer (1875-1965), který v roce 1907 popsal parazita přichyceného na žaludeční epitel laboratorních myší a nazval jej *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1907). O tři roky později popsal Tyzzer parazita podrobněji. Názvem *Cryptosporidium* byl označen nový rod a *Cryptosporidium muris* jako typový druh tohoto rodu (Tyzzer, 1910).

Několik desítek let po první Tyzzerově publikaci nebyl rod *Cryptosporidium* uznán za důležitý, ať už po veterinární, lékařské či ekonomické stránce, a tudíž neprobíhaly žádné další intenzivní studie. Ze strany veterinární problematiky začal stoupat zájem o kryptosporidie až v 50. letech 20. století, kdy byla popsána nákaza *C. meleagridis* u krůt (Slavin, 1995). Dále byly hlášeny nákazy kryptosporidii v souvislosti s průjmy u telat v 70. letech 20. století (Panciera et al., 1971; Meutin et al., 1974).

V dalších letech byly zaznamenány kryptosporidie u lidí. V roce 1976 byly popsány první případy kryptosporidiových infekcí u dvou pacientů. U obou osob byly popsány těžké vodnaté průjmy a gastroenteritidy. Nemoc byla diagnostikována střevní biopsií a mikroskopickým vyšetřením. Další dva případy nákazy byly popsány v roce 1979 (Lasser et al., 1979 a Weisburger et al., 1979). Dále se začaly objevovat publikace o kryptosporidii v chovech dobytka, ovcí, prasat, krůt, ale i u hadů, opic, morčat nebo králíků (Fayer et al., 2008).

Historicky byly kryptosporidie popsány a rozděleny na základě místa infekce, morfologie oocyst a podle druhu hostitele. Lidské infekce byly původně definovány jako *C. parvum*. To se však změnilo v 90. letech 20. století, kdy byly definovány dva genotypy. Genotyp 1 (neboli genotyp H), přizpůsobený člověku a genotyp 2 (neboli C) definovaný pro skot. Díky pokroku v oblasti molekulárních metod byly popsány nové druhy a v roce 2002 byl genotyp 1 popsán jako *C. hominnis* (Nader et al., 2019).

Následné molekulární studie rozšířily množství platných druhů na současných 49 (Ryan et al., 2021; Kváč et al., 2016; Prediger et al., 2021) a desítky genotypů, které kvůli absenci biologických charakteristik nemohou být za platné druhy popsány, přestože je velmi pravděpodobné, že většina z nich už samostatné druhy představuje.

1.2 Kryptosporidióza

Kryptosporidie jsou schopné způsobit jak sporadická onemocnění, tak i rozsáhlé epidemie, které se mohou přenášet vodou nebo potravinami (Zahedi a Ryan, 2020). K nákaze kryptosporidii může dojít přímou i nepřímou cestou. K přímému přenosu nákazy dochází fekálně-orální cestou od infikovaného hostitele. Může dojít k přenosu ze zvířete na zvíře, ze zvířete na člověka (zoonotická nákaza), ale stejně tak z člověka na zvíře nebo z člověka na člověka (antroponotická nákaza). Nákazy přenášené z člověka na člověka byly popsány v případech styku osob v ohniscích, např. v rodinách (Glberman et al., 2002).

Zoonotické nákazy byly popsány v případech styku člověka s nakaženým zvířetem. Důkazy o zoonotickém přenosu kryptosporidií zahrnují výzkumníky a veterinární studenty, kteří byli v kontaktu nejčastěji s nakaženými telaty, ale i s dalšími zvířaty (Bouزيد et al., 2013). Bylo zjištěno, že kmeny způsobující onemocnění byly shodné jak u zvířat, tak i u lidí (Bouزيد et al., 2013). Při nepřímém přenosu nákazy dochází ke kontaktu s materiálem, který je kontaminovaný kryptosporidii, jako např. jídlo nebo oděvy (Bouزيد et al., 2013). Dalším šířením nákazy může být kontaminace životního prostředí fekáliemi nebo kejdou, většinou po silných deštích (Hayes et al., 1989).

Mechanickým vektorem pro přenos oocyst může být i hmyz. Prokázalo se, že synantropní mouchy a brouci jsou schopni transportovat oocysty kryptosporidií (Conn et al., 2007). Četné studie dále prokázaly, že zdrojem kryptosporidií mohou být různé sladkovodní a mořští plži, kteří jsou schopni požírat a přenášet oocysty (Robertson, 2007). Na tuto studii navázal experiment, jehož výsledkem bylo, že atlantští mořští krabi mohou být také zdrojem nákazy (Xiao, 2010).

V lidské populaci je kryptosporidióza způsobena převážně antroponickým druhem *C. hominis* nebo zoonotickým druhem *C. parvum*. V závislosti na kombinaci mnoha variant onemocnění může být závažnost symptomů různá (Morris et al., 2019). U imunokompetentních jedinců může probíhat bezpříznakově (asi 30 % jedinců), ale

ve většině případů se objevují typické klinické příznaky s charakteristickými vodnatými průjmy, které jsou doprovázené bolestmi břicha. Dalšími příznaky jsou zvýšená teplota, nevolnost, zvracení nebo onemocnění může být doprovázeno nespecifickými příznaky jako je bolest svalů, hlavy, malátnost, slabost a anorexie (Current et al., 1991). Závažnost, průběh a konečná fáze infekce závisí na druhu parazita a na hostitelských faktorech, kam můžeme zařadit např. imunitní systém jedince nebo frekvenci expozice infikovaného jedince (Bouzid et al., 2013). Imunodeficitní jedinci jsou ohroženi na životě a v důsledku silných a dlouhotrvajících průjmů může být průběh kryptosporidie letální (Kváč et al., 2016).

V současné době neexistuje žádná účinná terapie či vakcína proti kryptosporidii (Ryan et al., 2016). Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválil nitazoxanid jako lék pro léčbu kryptosporidie. Tento lék zmírnil průjem a snížil úmrtnost nakažených pacientů ve vážném stavu (Davies a Chlamers, 2009; Gargala, 2008). Ukázalo se ovšem, že tento lék není účinný u pacientů s oslabenou imunitou nebo u ohrožených podvyživených dětí (Amadi et al., 2009).

1.3 Hostitelská a tkáňová specifita

Kryptosporidie jsou obligátní gastrointestinální paraziti, avšak v laboratorních podmínkách byla hlášena i volně žijící stádia. Většinu živin zachycují z těla hostitele a energii, pro fungování svého metabolismu, si vyrábí především glykolýzou. Jejich oocysty jsou schopné přežít až měsíce ve vlhkém prostředí a odolávají dezinfekci chlórem. Z druhů, které jsou infekční pro lidskou populaci, převládají *C. parvum* a *C. hominis* (Chalmers et al., 2019). Mezi druhy kryptosporidií, které byly jen zřídka nalezeny u člověka řadíme *C. baileyi*, *C. muris*, *C. andersoni* a další (Nader et al., 2019).

Nejčastější infekce jsou diagnostikovány u novorozených zvířat. Mláďata se mohou nakazit oocystami krátce po narození a začnou je vylučovat (Thomson et al., 2019). Nejvyšší míra infekce byla zaznamenána u zvířat starých 1–3 týdny (Santín et al., 2004; 2007; 2008).

V poslední době značně narostl počet zpráv o kryptosporidiových infekcích u volně žijících ptáků, zejména u býložravého vodního ptactva a nastávají tak obavy z infekcí domácích zvířat/lidí, kteří se vyskytují v blízkosti ptačích biotopů (Wang et al., 2021). Specifické ptačí druhy jsou čtyři: *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. galli*

a *C. ornithophilus* (dříve identifikovaný jako ptačí genotyp II) (Current et al. 1986; Holubová et al. 2020; Wang et al., 2017; Xiao et al., 2004). Zajímavé je, že *C. meleagridis* bylo nalezeno u lidí v tlustém a tenkém střevě. V souvislosti s enteritidou a následnou mortalitou je považováno za třetí nejběžnější druh způsobující lidskou kryptosporidíózu (Pagès-Manté et al., 2007; Slavin 1955; Xiao a Fayer, 2008). Ačkoli je *C. parvum* specifické pro savce, bylo zřídka detekováno u volně žijících labutí zpěvných a stěhovavých hus kanadských (Graczyk et al., 1998; Wang et al., 2019).

Kryptosporidie infekční pro skot jsou *C. andersoni*, *C. parvum*, *C. ryanae* a *C. bovis* (Fayer a Xiao., 2008). Onemocnění spojené s těmito druhy probíhají většinou asymptomaticky (Santín, 2020). Řada zveřejněných publikací také uvádí, že celosvětový výskyt těchto druhů je ovlivněný i věkem skotu. *C. andersoni* se nejčastěji popisuje u ročních telat a dospělého skotu, *C. bovis* a *C. ryanae* se vyskytuje nejčastěji u telat po odstavu a *C. parvum* převládá u sajících telat (Santín, 2020; Santín et al., 2008; Fayer et al., 2006; Feltus et al., 2008; Smith et al., 2014; Wang et al., 2020). Ovšem španělská studie uvádí, že *C. parvum* je nejrozšířenější u všech věkových kategorií, *C. andersoni* převažuje u jalovic a dospělého skotu a druhy *C. bovis* a *C. ryanae* nebyly definovány (Castro-Hermida et al., 2006; 2007; 2011). Tyto rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny rozdílnou geografickou oblastí, odlišnými zvířecími praktikami a metodologií (Feng et al., 2007; Qi et al., 2015). Mezi nimi bylo stanoveno *C. andersoni* jako převládající druh u dobytka zejména v Číně (Wang et al., 2011). Onemocnění je spojeno se sníženou doživostí, nižší využitelností krmiva, tím pádem i se sníženým přírůstkem a s gastritidami (Wang et al., 2011). Oocysty *C. andersoni* byly mezitím objeveny i u lidí (Checkley et al., 2015; Wang et al., 2017).

Hostitelská specifita je odlišná v závislosti na druhu a kmeni kryptosporidie. Jednotlivé kmeny *C. muris* a *C. andersoni* byly popsány podle polymorfismů malé ribozomální podjednotky (SSU) a rozdílů v patogenitě, průběhu infekce a hostitelské specifitě. Například *C. muris* RN66 (referenční kmen) se liší od japonského genotypu *C. muris* Kawatabi (Hikosaka a Makai., 2005; Murakoshi et al., 2013). Podobně je tomu u kmene *C. andersoni*, kdy pouze *C. andersoni* Kawatabi je infekční pro myš domácí (Kvác et al., 2016).

Primární místa infekce jsou rozdílná, v závislosti na druhu kryptosporidií. Většina druhů kryptosporidií je lokalizována ve střevech svých hostitelů. Tenké střevo je jednou z nejčastěji parazitovaných částí zažívací soustavy a je osidlováno například

druhy *C. parvum* a *C. hominis*. Slepé střevo nebývá častým místem výskytu kryptosporidií. Tato část střeva je primárně osidlována *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I. Taktéž tlusté střevo není častým místem, kde by se kryptosporidie hojně vyskytovaly. Ze známých druhů osidluje tlusté střevo jen několik z nich, např. *C. occultus*, nebo *C. scrofarum* (Ryan et al., 2021). Menší skupina kryptosporidií je přizpůsobena vývoji ve žlázách žláznatého žaludku. Typickými zástupci této skupiny je *C. andersoni*, *C. muris* nebo *C. proliferans* (Fayer a Xiao, 2008; Kváč et al., 2016). V některých případech u zvířat nebo u lidí s oslabeným imunitním systémem byly popsány případy, kdy byly kryptosporidie nalezeny extraintestinálně (Fleta et al., 1995). *Cryptosporidium baileyi* je druh parazitující primárně v tenkém střevě, ale parazituje i v dalších částech střeva, kloace a může přirozeně infikovat i dýchací cesty.

1.4 Vývojový cyklus

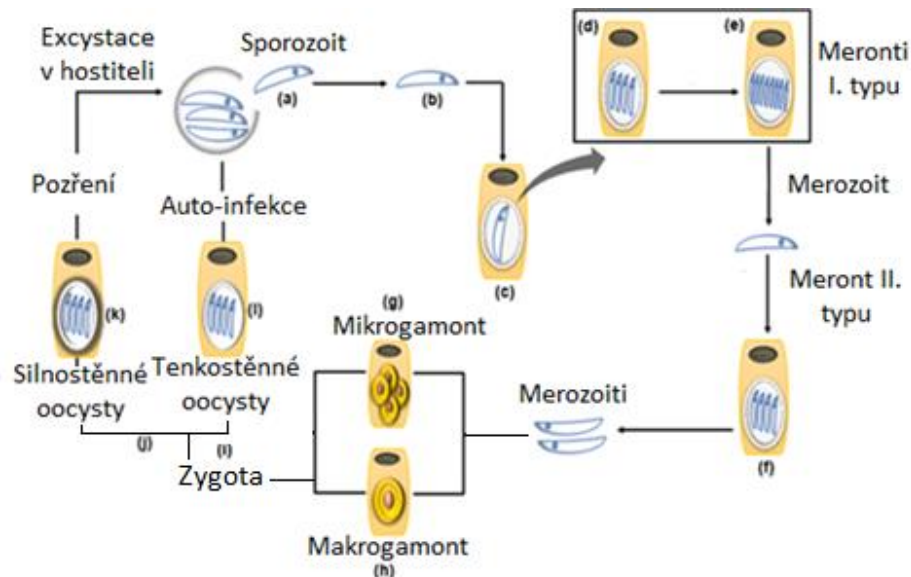
Organismy rodu *Cryptosporidium* řadíme mezi typické parazity gastrointestinálního traktu. Příležitostně mohou postihovat i jiné orgány, jako např. plíce nebo žlučové cesty (Chen et al., 2002). Na základě podobnosti vývojového cyklu mezi kryptosporidiemi a kokcidiemi byly kryptosporidie dlouhou dobu zařazovány mezi kokcidie (Fayer et al., 2008). Až za pomoci molekulárních metod byla tato podobnost vyvrácena. Naopak byla molekulární analýzou prokázána podobnost mezi kryptosporidiemi a gregarinami (Carreno et al., 1999).

Životní cyklus kryptosporidií obsahuje pohlavní i nepohlavní stádia a vrcholí vylučováním oocyst se stolicí z těla hostitele ven. Každá oocysta obsahuje čtyři infekční sporozoity (Nader et al., 2019). Prepatentní období, tedy doba od pozření infekčních oocyst po vyloučení nové generace oocyst závisí na hostiteli, druhu/genotypu kryptosporidie a na infekční dávce (Hijawi et al., 2002). Prepatentní období se pohybuje v rozmezí 3–24 dní a inkubační doba trvá zhruba 5–7 dní (Fayer et al., 2005). Vlastní doba vylučování oocyst do vnějšího prostředí (patentní perioda) nejčastěji trvá 1–20 dní, což také závisí na vlivu různých faktorů (hostitel, druh aj.) (Hijawi et al., 2002).

Vývojový cyklus kryptosporidií můžeme rozdělit do šesti hlavních fází:

1. Excystace (uvolnění infekčních sporozoitů)
2. Merogonie (nepohlavní množení v hostitelských buňkách)
3. Gametogonie (tvorba makro- a mikrogamet)

4. Oplození (splnutí mikro- a makrogamety)
5. Tvorba stěny oocyst (slouží k odolnosti parazita vůči životnímu prostředí a díky tomu je schopen přenosu infekce mezi jedinci)
6. Sporogonie (tvorba infekčních sporozoitů) (Current et al., 1991)



Obrázek 1 - Vývojový cyklus *Cryptosporidium* spp. (Bouzid 2013, upraveno Hassan 2021) - upraveno

1.4.1 Excystace

Životní cyklus začíná požitím oocysty vhodným hostitelem. Po průniku do těla nastává excystace, která je klíčová k zahájení infekce. Na jednom pólu dojde k otevření tzv. sutury a oocystu mohou opustit čtyři infekční sporozoiti (obrázek 1a) (Fayer et al., 1990). Sporozoiti mají tvar půlměsíce. V jejich apikálním komplexu se nachází rhoptrie, mikronemy a denzní granula (O'Hara a Chen, 2011). Mikronemy produkují protein, který hraje roli v přilnutí k hostitelské buňce a rhoptrie se pravděpodobně podílí na tvorbě PVM (parasitophorous vacuole membrane = membrány parazitoformní vakuoly), ve které je parazit uzavřen a hrají roli při invazi hostitelské buňky (obrázek 1c) (Spano et al., 1998; Soldati et al., 2001). V případě žaludečních kryptosporidií je parazit v PVM chráněn před nehostinným prostředím žaludku. Z hostitelské buňky je mu dodávána energie a živiny prostřednictvím vyživovací organely, která je vytvořena mezi parazitem a cytoplazmou hostitele (Tzipori a Ward, 2002). Denzní granula, která

jsou uložena po celé buňce, uvolňují po vytvoření PVM svůj obsah a následně pravděpodobně modifikují tuto strukturu, aby dopomohly napadnout buňku hostitele (Tetley et al., 1998).

Pro průběh excystace je parazit vystaven působení vnějších podmínek v žaludku a v případě střevních druhů poté působení pankreatických enzymů a žlučových solí. Vystavení parazita těmto podmínkám stimuluje jeho excystaci (Fayer et al., 1990). Kromě reakce na faktory, které spouští excystaci, musí být oocysty schopné rozlišovat mezi gastrointestinálním traktem původního a nově infikovaného hostitele. Na rozdíl od kokidií, které sporulují po uvolnění, se kryptosporidie uvolňují už plně vysporulované (Lindsay et al., 2000).

Ovšem ukázalo se, že sporozoiti mohou excystovat v teplých vodných roztocích, což vysvětluje extraintestinální infekce v místech, jako např. dýchací cesty, spojivka oka aj. (Fayer et al., 1990). Uvnitř struktury PVM se sporozoiti vyvíjí do dalšího stádia – trofozoitů (obrázek 1d). Ten se následně rozmnožuje nepohlavním procesem zvaným merogonie (Hassan et al., 2021).

1.4.2 Merogonie

V PVM se vyvinou trofozoiti, kteří podstupují nepohlavní rozmnožování, tzv. merogonii za vzniku merontů. Asexuální replikace trofozoitů vede ke vzniku merontů I. typu, ve kterých je obsaženo osm merozoitů (obrázek 1e). Tito merozoiti napadají v přilehlé blízkosti další hostitelské buňky. Jednou z možností jejich vývojového cyklu je přeměna v další meronty I. typu, což zvyšuje závažnost infekce nebo druhou možností je vývin v meronty II. typu, ve kterých jsou uloženy čtyři merozoiti (obrázek 1f) (Bouzid et al., 2013). Místo toho, aby bylo vytvořeno více merontů, iniciují merozoiti II. typu proces gametogonie, aby mohla být dokončena sexuální fáze vývoje (Göebel a Braendler, 1982).

1.4.3 Gametogonie a oplodnění

Každý merozoit produkuje samčí sexuální reprodukční stádia (tzv. mikrogamonti) (obrázek 1g) nebo samičí sexuální reprodukční stádia (tzv. makrogamonti; obrázek 1h) (Göebel et al., 1982). Z makrogamontu vzniká jednobuněčný makrogametocyt. Jaderným dělením mikrogamontů vznikne až 16 mikrogamet, které se uvolní z PVM a dále lokalizují a oplodní tento makrogametocyt, což vede ke vzniku zygoty (obrázek 1i).

Diploidní zygota podstupuje proces podobný meióze, tzv. sporogonii (obrázek 1j) (Current et al., 1986).

1.4.4 Tvorba stěny oocyst

Jako výsledek oplození mezi mikro-a makrogametou vzniká zygota (tzn. buňka s kompletní sadou chromozomů, která vznikla oplozením). Poté nastává nepohlavní dělení zygoty, tzv. sporogonie, při které vznikají tenkostěnné (obrázek 1l) nebo silnostěnné oocysty (obrázek 1k). Úkolem tenkostěnných oocyst je udržovat infekci v těle hostitele formou autoinfekce (Bouzid et al., 2013). K autoinfekci dochází v případě, že se sporozoiti uvolní z tenkostěnných oocyst a jejich cyklus začíná od začátku (Smith a Rose, 1998). Silnostěnné oocysty jsou vylučovány společně s výkaly z těla infikovaného jedince, aby je mohl pozřít jiný hostitel (Bouzid et al., 2013).

1.4.5 Sporogonie

Při procesu zvaném sporogonie, kterým prochází diploidní zygota, jsou výsledkem čtyři haploidní sporozoiti uloženi ve sporulované oocystě, která je buď silnostěnná nebo tenkostěnná (Current et al., 1986).

Oocysty jsou meiotické spory, které jsou odolné vůči životnímu prostředí. Proto je pohlavní produkce oocyst velmi zásadní pro další přenos infekce, ale může také hrát důležitou roli v pokračující infekci svého hostitele. Vzniklé oocysty jsou unikátní v tom, že dospívají v hostitelské tkáni a jsou schopné autoinfekce (Tandel et al., 2019).

1.5 Žaludeční kryptosporidie savců

Do roku 2000 byl u savců uznáván pouze jeden platný druh žaludeční kryptosporidie, a to *C. muris*, který Tyzzer popsal v roce 1907 (tabulka 1). Na základě řady experimentálních studií bylo prokázáno, že všechna vývojová stadia parazita jsou lokalizována výhradně v žaludečních žlázách myší. V dalších experimentech byl popsán úspěšný přenos *C. muris* na králíky, psy, kočky a morčata a k vývoji docházelo v žaludku, nikoliv v tenkém střevě (Iseki et al., 1989). Iseki v roce 1989 izoloval kmen *C. muris* RN66 z potkana a tento izolát je dodnes používán jako referenční kmen. Na základě morfologické podobnosti byly oocysty *C. muris* nalezeny u skotu v různých státech (USA, Skotsko, Brazílie, Japonsko) a u skotu a velbloudů v Íránu, ale i u dal-

ších hostitelů (Xiao et al., 2004). Abomasální kryptosporidie byly popsány v abomasálních peptických žlázách u skotu už v roce 1987 (Anderson, 1987) a pozdější genotypizace prokázala, že izoláty ze skotu představují samostatný druh, který byl pojmenován jako *C. andersoni* (Lindsay et al., 2000). V roce 2016 popsali Kváč et al. třetí druh žaludeční kryptosporidie u savců – *C. proliferans*. Dále stejní autoři konstatovali, že v rámci druhu *C. muris* jsou pravděpodobně další skryté druhy, které jsou mylně považovány za *C. muris* (Kváč et al., 2016).

Tabulka 1 - Žaludeční kryptosporidie u savců

Druh	Typický hostitel	Autor
<i>C. andersoni</i>	Skot	Lindsay et al., 2000
<i>C. muris</i>	Hlodavci	Tyzzer, 1907
<i>C. proliferans</i>	Hlodavci	Kváč et al., 2016

1.6 *Cryptosporidium andersoni*

1.6.1 Lokalizace

Cryptosporidium andersoni bylo poprvé popsáno a objeveno u skotu a vyvíjí se výhradně v žaludeční sliznici (Kaneta a Nakai, 1998; Koyama et al., 2005). Původně byly oocysty *C. andersoni* označeny jako *C. muris* nebo *C. muris-like*, a to na základě jejich morfologické a biologické podobnosti. Teprve nedávno bylo *C. andersoni* stanoveno jako samostatný druh (Lindsay et al., 2000; Xiao et al., 1999).

1.6.2 Velikost oocyst

Oocysty *C. andersoni* jsou větší než oocysty *C. muris* (Lindsay et al., 2000). Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 7,5×5,7 μm (rozsah 6,8–8,0×5,4–6,1 μm). Poměr délky k šířce je 1,30 (rozsah 1,10–1,45) (Matsubayashi et al., 2004). Oocysty mají elipsoidní tvar, jsou bez mikropyla. Síla stěny se uvádí <1 μm a je složena z jedné bezbarvé vrstvy (Lindsay et al., 2000; Kváč a Vítovec, 2003).

1.6.3 Hostitelé

Cryptosporidium andersoni parazituje především u skotu. Příležitostně byl nalezen u velbloudů, dalších přežvýkavců a u různých druhů hlodavců (Kváč et al., 2016). Byly

zaznamenány i případy infekce *C. andersoni* u lidí, a proto je tento druh považován za zoonotický (Feng et al., 2011).

1.6.4 Průběh infekce

Skot infikovaný *C. andersoni* většinou nevykazuje žádné klinické příznaky. Závažné infekce můžeme mikroskopicky identifikovat v abomasu (Masuno et al., 2006). Příležitostně se mohou objevit doprovodné klinické příznaky, jako např. gastritida, snížený váhový přírůstek nebo snížená produkce mléka (Wang et al., 2011).

1.6.5 Patogenita

Kromě doprovodných klinických příznaků jsou s infekcí *C. andersoni* spojeny zvýšené plazmatické hladiny pepsinogenu. Byly pozorované změny na sliznici, která byla bledá a ztlustělá. Slizniční vazivo nebylo překrvené, pouze mírně endematózní. Ve slizničním vazivu infikovaného abomasa byl výrazně snížený počet eozinofilů. Také bylo popsáno, že infikované žlázy jsou značně dilatované, naplněné hlenem, nekrotickým materiálem a četným počtem kryptosporidií, dále byly zaznamenány atrofované epiteliární buňky s výskytem kuboidních/skvamózních metaplazií. Infekce byla nalezena pouze ve slezu, nebyly pozorovány jiné patologické změny na ostatních orgánech nebo v jiných oblastech trávicího traktu (Kváč a Vítovec, 2003; Esteban a Anderson, 1998; Ralston et al., 2010; Anderson, 1998).

1.7 *Cryptosporidium muris*

1.7.1 Lokalizace

Všechna vývojová stádia *C. muris* prodělávají svůj vývoj v buňkách žaludeční sliznice, obdobně jako *C. andersoni* a neinfikují nežláznatou oblast žaludku u hlodavců nebo žaludky přežvýkavců (Fayer et al., 1990; Fayer et al., 1991). *Cryptosporidium muris* bylo poprvé objeveno a popsáno Tyzzerem v roce 1907 (Tyzzer, 1907).

1.7.2 Velikost oocyst

Rozměry oocyst jsou $5,5\text{--}7\text{ }\mu\text{m}$ ($6,3\text{ }\mu\text{m}$) $\times$ $7,5\text{--}9,8\text{ }\mu\text{m}$ ($8,4\text{ }\mu\text{m}$) (Iseki et al., 1989).

1.7.3 Hostitelé

Cryptosporidium muris bylo popsáno u laboratorní myši (Tyzzer, 1907). Přestože primárním hostitelem *C. muris* jsou hlodavci, byl tento druh experimentálně přenesen a detekován i u lidí a jiných druhů savců. Vhodným hostitelem mohou být i psi, morčata, králíci, jehňata nebo kočky (Aydin a Ozkul, 1996; Iseki et al., 1989; Rhee et al., 1998). *Cryptosporidium muris* bylo také nalezeno v trusu dravých ptáků, žab, hadů a ještěrek. V těchto případech šlo nejspíš o nákazu pozřením infikovaného hlodavce, nikoli o aktivní cestu infekce (Kváč et al., 2016). Podobným způsobem mohla být způsobena nákaza prasat z prasečí farmy, protože za experimentálních podmínek prasata nejsou k *C. muris* vnímavá (Kváč et al., 2012).

1.7.4 Průběh infekce

Ve většině případů probíhá infekce bez příznaků. U laboratorních myši je délka prepatentní periody 7–12 dní (Kváč et al., 2009).

1.7.5 Patogenita

U žaludečních žláz je popisována dilatace, hypertrofie a naplnění četnými vývojovými stádii (Taylor et al., 1999). *Cryptosporidium muris* se replikuje ve žláznaté části žaludku. Produkuje histopatologické změny, ale žádné klinické příznaky ani žádné velké patologické změny nebyly zaznamenány (Özkul a Aydin, 1994).

1.8 *Cryptosporidium proliferans*

Tento druh byl nejprve známý jako *C. muris*, kmen TS03. V roce 2016 byl na základě experimentální studie popsán jako *C. proliferans* (Kváč et al., 2016).

1.8.1 Lokalizace

Stejně jako u předešlých druhů, i *C. proliferans* se vyvíjí výhradně v buňkách žaludeční sliznice a je potvrzené, že stejně tak neinfikuje nežláznatou oblast žaludku (Kváč et al., 2016).

1.8.2 Velikost oocyst

Velikost oocyst se pohybuje v rozmezí 6,8–8,8 μm (7,7 μm) $\times$ 4,8–6,2 μm (5,3 μm) a morfologicky jsou tyto oocysty velmi odlišné od střevních kryptosporidií (Kváč et

al., 2016). Dále ve své publikaci Kváč et al. (2016) popisují, že oocysty *C. proliferans* jsou výrazně užší a delší než *C. muris* a *C. andersoni*, a také zaznamenali podobnost oocyst získaných z experimentálně infikovaných myši s oocystami použitých pro jejich infekci.

1.8.3 Hostitelé

Tento druh byl popsán u experimentálně infikovaných myši (Kváč et al., 2016). Charakteristickým hostitelem tohoto druhu jsou hlodavci – hlodoun východoafrický. Dále byl druh popsán u oslů, veverek, buvola afrického a koně (Laatamna et al., 2015; Feng et al., 2007; Sak et al., 2013; Kváč et al., 2016).

1.8.4 Průběh infekce

Vývojová stádia byla nalezena ve žláznaté části žaludku infikované myši. Vysoký obsah vývojových stádií souvisí s vysokým počtem vylučovaných oocyst (Kváč et al., 2016). Prepatentní perioda se pohybuje v rozmezí 6–21 dnů a patentní perioda může trvat v řádech dnů až měsíců. To vše je ovlivněno různými faktory, zejména hostitelem (Kváč et al., 2016).

1.8.5 Patogenita

V *C. proliferans* infikované myši byly popsány splývající léze na napadené sliznici. Infikované žlázy byly značně dilatované a naplněné hlenem, nekrotickou hmotou a obsahovaly vývojová stádia. Epitel vytvořil papilární struktury, které proliferují do lumen žaludku. Buňky napadených žláz byly atrofované a byla popsána skvamózní nebo krychlová metaplazie (Kváč et al., 2016).

2 Cíl práce

Cílem práce bylo studovat vliv teploty a pH prostředí na excystaci oocyst žaludečních kryptosporidií přežvýkavců – *C. andersoni* pomocí *in vitro* experimentů.

3 Materiál a metodika

3.1 Materiál

3.1.1 Oocysty kryptosporidií pro experiment

Pro účely dosažení cílů práce byly použity oocysty *Cryptosporidium andersoni*, izolát MV získaný z přirozeně infikované krávy bez tržní produkce mléka. Kryptosporidie pro experimenty byly skladovány při teplotě 4 °C v dH₂O.

3.1.2 Příprava roztoků o různém pH

Chemikálie: PBS 10×, 1N NaOH, 1N HCl

Byly připraveny roztoky o pH 2–9. Roztoky byly připraveny z pracovního PBS roztoku. Jednotlivé hodnoty pH byly upravovány za pomoci roztoků 1N HCl a 1N NaOH.

3.2 Metody

Kvůli nízké koncentraci oocyst *C. andersoni* ve vzorku a z důvodu přítomnosti drobných zbytků potravy v trusu, byl trus nejprve předčištěn pomocí flotační metody. Oocysty byly poté purifikovány pomocí sacharózového a cesium chloridového gradientu.

3.2.1 Flotační metoda

Roztoky:

Sheaterův roztok:

Cukr	405 g
Deionizovaná voda	259 ml

Pracovní postup:

- Trus se rozmíchá v malém množství dH₂O a následně se zhomogenizuje ve třecí misce.
- Suspenze se přefiltruje přes 3 síta o různé velikosti ok (500µm, 300µm a 200 µm).
- Následuje centrifugace a poté se slijí supernatant.
- Sediment se naředí pomocí dH₂O do požadované konzistence.

- Do zkumavek (50 ml) se přidá 5–7,5 ml sedimentu.
- Poté se zkumavka doplní zhruba 1 cm pod okraj Sheaterovým roztokem a centrifuguje se (20 minut/1370 g).
- Supernatant, ve kterém se nachází vyflotované oocysty, se slije do čisté zkumavky, doplní se pomocí dH₂O a následuje centrifugace (20 minut/1370 g).
- Opatrně se odsaje supernatant nad sedimentem a znovu se doplní dH₂O a centrifuguje se (20 minut / 1370 g), tento promývací krok se 3× opakuje.
- Získaný sediment s oocystami se naředí pomocí dH₂O do požadované konzistence a následuje vrstvení na sacharózový gradient.

3.2.2 Čištění oocyst na cukerném gradientu (Arrowood a Stearling 1987)

Roztoky:

1. Sheaterův roztok:

Cukr	405 g
Deionizovaná voda	259 ml
2. 1% PBS Tween: přidání 0,5 ml Tween 20 do 1 l PBS
3. Pracovní Sheaterův roztok:

1 + 2	1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween
1 + 4	1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween

Pracovní postup:

- Gradient se navrství do čtyř skleněných zkumavek o objemu 100 ml.
- Vrstvy:
 1. Vrstva 30 ml Sheater 1 + 2
 2. Vrstva 30 ml Sheater 1 + 4
 3. Vrstva 15 ml vodného roztoku vzorku
- Sheaterovy roztoky se před vrstvením řádně promíchají.
- Vzorek se vrství plastovou pasterkou.
- Centrifuguje se 20 minut/1370 g.

- Pomocí vodní vývěvy se odsaje horní zabarvená vrstva a zbylý obsah se přenesse do čistých zkumavek.
- Deionizovanou vodou se doplní obsah zkumavek a centrifuguje se (20 minut/1370 g).
- Poté se pomocí vodní vývěvy odsají zkumavky na 1/2, opět se doplní do plného objemu deionizovanou vodou, a centrifugují (opět 20 minut/1370 g).
- Tento krok se opakuje znovu tak, aby se promývací proces provedl celkem 3×.
- Zbylé sedimenty se přenesou do jedné zkumavky (uchovávání v lednici při 4 °C).

3.2.3 Čištění oocyst na césium chloridovém gradientu (Arrowood a Donaldson 1996)

Roztoky:

1. Cesium chlorid (CsCl; 1,15 g/ml)
2. PBS (0,025 M; pH 7,2)

Pracovní postup:

- Do mikrozkušavky se napipetuje 1 ml CsCl.
- Do zkumavky s CsCl se navrství 500 µl oocyst (uchovaných v PBS).
- Centrifuguje se (16000 g/3 minuty při teplotě 20 °C).
- Supernatant se přepipetuje do 50 ml zkumavek (sediment se vyhodí).
- Zkušavka se doplní dH₂O a centrifuguje se (1370 g/20 minut při teplotě 4 °C).
- Supernatant se odsaje na objem 5 ml.
- Zkušavka se doplní dH₂O, zvortexuje a centrifuguje 1370 g/20 minut při teplotě 4 °C (tento krok se 3× opakuje).
- Oocysty se uchovávají v dH₂O při 4 °C.

3.2.4 Průtoková cytometrie

Pro stanovení jednotlivých faktorů, které ovlivňují excystaci žaludečních kryptosporidií u přežvýkavců byl použitý průtokový cytometr BD FACSCanto™ II v laboratoři Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

Vliv teploty na excystaci oocyst

Prvním faktorem, který ovlivňuje excystaci žaludečních kryptosporidií u přežvýkavců je teplota. Jednotlivá měření na průtokovém cytometru probíhala následujícím způsobem:

Pracovní postup:

Kontrola:

- Do zkumavky se napipetuje 450 μ l přečištěných oocyst (o koncentraci 500 000 oocyst/450 μ l v dH₂O) a 50 μ l referenčních fluorescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA).
- Vzorek se vortexuje a změří se průtokovým cytometrem.
- Do předpřipravené tabulky jsou zapsány hodnoty: počet referenčních fluorescenčních kuliček (10 000) a počet oocyst (na 10 000 kuliček).
- Měření se 5× opakuje, jednotlivé hodnoty se následně zprůměrují.

Měření vlivu teploty na excystaci:

- Do zkumavky se napipetuje 450 μ l přečištěných oocyst (o koncentraci 500 000 oocyst/450 μ l dH₂O).
- Zkumavka se vloží do vodní lázně na stanovenou teplotu (32–44 °C).
- Při dané teplotě (např. 32 °C) se měří 15 vzorků, rozdělených po pěti do 3 časových intervalů (5 vzorků se zahřívá na 5 minut, 5 vzorků na 15 minut a 5 vzorků na 30 minut).
- Po vyjmutí z vodní lázně se přidá 50 μ l kuliček.
- Vzorek se lehce promíchá.
- Měření průtokovým cytometrem.
- Zapsání hodnot do tabulky.

Životaschopnost oocyst

Barvením pomocí propidium jodidu (PI) byla stanovena životaschopnost oocyst. Barvivo PI proniká přes narušenou cytoplazmatickou membránu. Tato metoda se používá k vizualizaci mrtvých oocyst, které svítí jasně červenou barvou. Vlnová délka excitace pro propidium jodid je 536 nm. Pro emisi je vlnová délka 617 nm.

Pracovní roztok: propidium jodid (PI) – 1 mg PI rozpustit v 50 ml PBS

Pracovní postup:

- V 435 μ l dH₂O resuspendovat $0,5 \times 10^6$ oocyst.
- Napipetuje se 15 μ l pracovního roztoku (PI).
- Nechá se inkubovat minimálně 15 minut v temnu při laboratorní teplotě.
- Do doby, než proběhne měření průtokovým cytometrem, se uchovává v temnu a na ledu.
- Kontrolou při měření byly devitalizované oocysty, které byly získány povařením po dobu minimálně 10 minut.

Vliv pH na excystaci oocyst

Dalším zkoumaným faktorem, který má vliv na excystaci oocyst je pH. Z předešlého experimentu, vlivu teploty na excystaci (výše), se prokázalo, že oocysty nejlépe excystují při teplotě 40 °C. Proto byly použity roztoky PBS o pH 2–9, které byly následně zahřáté na 40 °C ve vodní lázni na 5, 15 a 30 minut.

Pracovní postup:

Kontrola:

- Do zkumavky se napipetuje 450 μ l přečištěných oocyst (o koncentraci 500 000 oocyst/450 μ l v PBS o určitém pH) a 50 μ l referenčních fluorescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA).
- Vzorek se vortexuje a změří se průtokovým cytometrem.
- Do předpřipravené tabulky jsou zapsány hodnoty: počet referenčních fluorescenčních kuliček (10 000) a počet oocyst (na 10 000 kuliček).
- Měření se 5× opakuje, jednotlivé hodnoty se následně zprůměrují.

Měření vlivu pH na excystaci:

- Do zkumavky se napipetuje 450 μ l přečištěných oocyst (o koncentraci 500 000 oocyst/450 μ l v PBS; pH 2–9).
- Zkumavka se vloží do vodní lázně o teplotě 40 °C.

- Při teplotě 40 °C se měří 15 vzorků, rozdělených po pěti do 3 časových intervalů (5 vzorků se zahřívá na 5 minut, 5 vzorků na 15 minut a 5 vzorků na 30 minut).
- Po vyjmutí z vodní lázně se přidá 50 µl kuliček.
- Vzorek se lehce promíchá, změří se průtokovým cytometrem a jednotlivé hodnoty se zapíší do tabulky.

3.2.5 Ověření identity používaného izolátu

Izolace DNA z trusu

Izolace DNA byla provedena komerčně vyrobeným kitem Exgene™ Stool DNA mini (GeneAll®).

Pracovní postup:

- Vzorek trusu (200 mg) se dá do Safe-Lock Tube, přidají skleněné a zirkonové kuličky a napipetuje se 1–1,3 ml FL pufru, homogenizuje se vortexováním a rozbitím v přístroji FastPrep®24 (MP Biomedicals, CA, USA) 1 minutu při 5,5 m/s.
- Nechá se inkubovat (5 minut při pokojové teplotě), následuje centrifugace (16000 g/5 minut).
- Supernatant se přenese na EzPass™ kolonku (bílá).
- Centrifugace (16000 g/1 minuta), odpad ze sběrné zkumavky se vylije.
- EzPass™ kolonka se přenese do nové mikrocentrifugační zkumavky (1,5 ml), přidá se 100 µl EB pufru, 1 minutu se inkubuje při laboratorní teplotě, poté se vloží do centrifugy (16000 g/1 minuta).
- Bílá kolonka se vyhodí a přidá se PB pufr (500 µl) do sběrné zkumavky a pipetováním se dobře promíchá.
- Směs se přenese do Column Type G (zelená kolona), centrifuguje se (16000 g/1 minuta) a vylije se odpad ze sběrné zkumavky.
- Napipetuje se NW pufr (500 µl) na střed kolony, centrifuguje se (16000 g/1 minuta) a vylije se odpad ze sběrné zkumavky.
- Opět se centrifuguje (16000 g/1 minuta), odstraní se tak zbytky pufru, kolona se přendá do nové mikrocentrifugační zkumavky (1,5 ml).

- Na střed kolony se přidá EB pufr (200 µl), inkubuje se 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifuguje se (16000 g/1 minuta).
- Vyizolovaná DNA se uchovává při -20 °C do použití PCR metody.

Pro ověření identity použitého izolátu byla použita amplifikace genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU) pomocí nested PCR (Xiao et al. 1999). Jako negativní kontrola byla použita PCR voda a jako pozitivní kontrola byla použita gDNA *Cryptosporidium tyzzeri*. PCR reakce byla provedena v celkovém objemu 20 µl. K10 µl komerčně dodávaného HS-Taq premix (GenAll, Korea), který obsahoval 2U HS-TaqDNA polymerázy, 200 µM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, loading dye a stabilizátor bylo přidáno 7 µl PCR vody, 0,5 µl forward primeru (200 mM), 0,5 µl reverse primeru (200 mM) a 2 µl gDNA nebo 2 µl produktu primární reakce v případě sekundární reakce. Amplifikační program se skládal z primární denaturace po dobu 3 minut při 95 °C, 35 opakujících se cyklů denaturace po dobu 45 sekund při 95 °C, nasedání primerů po dobu 45 sekund při teplotě 55 °C a extenze řetězců po dobu 1 minuty při 72 °C. Na závěr byla provedena konečná extenze řetězců po dobu 10 minut při 72 °C.

Primery

Primery pro primární reakci (forward a reverse primer):

F1: 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'

R1: 5'-CCC ATT TCC TTC AAA CAG GA-3'

Primery pro sekundární reakci (forward a reverse primer):

F2: 5'-CGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'

R2: 5'-AAG GAG CAA CAC ACA CAC-3'

Gelová elektroforéza

Chemikálie:

- Ethidium-bromid, agaróza, TAE pufr, DNA Ladder (100 bp)

Pracovní postup:

- V baňce se smíchá navážená agaróza s TAE pufrem (podle velikosti nosiče) a zahřívá se v mikrovlnné troubě, dokud nevznikne homogenní směs (tabulka 2).

Tabulka 2 - Gelová elektroforéza - množství agarózy a TAE pufru pro určitý typ nosiče

Typ nosiče	Agaróza (g)	TAE pufr (ml)
Velký	1,2	120
Střední	0,8	80
Malý	0,4	40

- Po zahřátí se baňka ochladí pod tekoucí vodou a přidá se ethidium-bromid (1 μ l).
- Směs se vlije do připraveného nosiče s vhodným hřebenem a nechá se ztuhnout (cca 15–20 minut).
- Po ztuhnutí se gel vloží do elektroforetické vany s TAE pufrem.
- Do prvního slotu se nanese ladder (10 μ l), do ostatních se nanese PCR produkt (20 μ l).
- Elektroforéza se spustí (na 20–30 minut), aby došlo k oddělení jednotlivých DNA fragmentů.
- Po skončení se gel vyjme a prohlíží se prosvícením UV světlem (použití UV transiluminátoru).

Izolace z gelu

Jednotlivé fragmenty DNA byly vyizolovány pomocí komerčně vyráběného kitu Gen EluteTM.

Pracovní postup:

- Pomocí skalpelu se vyříznou jednotlivé fragmenty DNA a vloží se do 1,5ml zkumavek.
- Do zkumavky s vyříznutým fragmentem se napipetuje Gel Solubilization Solution (300 μ l/100 mg gelu).
- Inkubuje se (50 °C/10 minut) – kontroluje se rozpuštění fragmentu, každé 2–3 minuty promíchat.

- Nechá se inkubovat PCR voda pro eluci (65 °C).
- Do Binding Column G se napipetuje Column Preparation Solution (500 µl) a nechá se centrifugovat (16000 g/1 minut).
- Do zkumavky se připipetuje isopropanol (150 µl) a promíchá se.
- Veškerý vzorek se přepipetuje na kolonu (Binding Column G), centrifuguje se (16000 g/1 minutu).
- Obsah sběrné zkumavky se vylije, přidá se Wash Solution G (700 µl), centrifugace (16000 g/1 minutu).
- Obsah sběrné zkumavky se vylije a opět se centrifuguje (16000 g/1 minutu), poté se zkumavka v centrifuze otočí o 180° a nechá se znovu centrifugovat (16000 g/3 minuty).
- Kolona se vloží do nové zkumavky (1,5 ml) a provede se eluce – na střed kolony se napipetuje 30 µl PCR vody zahřáté na 65 °C.
- Nechá se inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a následně se nechá centrifugovat (16000 g/1 minutu).

Genotypizace

PCR produkty ze sekundární PCR reakce byly sekvenovány za použití sekundárních primerů a ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitu v komerčních laboratořích. Vzorky byly sekvenovány z obou konců. Nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí programu ChromasProa BioEdita porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank.

3.2.6 Statistické zhodnocení

K ověření hypotézy byl použit Hotellingův T2 test. Rozdíly v počtu excystovaných oocyst mezi skupinami byly testovány neparametrickým Mann–Whitney U testem. Výpočty byly provedeny v softwaru R 4.1.0. Testovaná hypotéza zněla, že dvourozměrné střední vektory měření jsou v obou srovnávaných populacích stejné.

4 Výsledky

Molekulární genotypizace na genu kódujícím malou podjednotku rRNA (SSU) prokázala, že sekvence SSU námi používaného izolátu *C. andersoni* MV je identická se sekvencí *C. andersoni* (EU245042) uloženou v GenBank (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.1 Vitalita kryptosporidií

Vzhledem ke spotřebě velkého množství oocyst, které bylo třeba opakovaně získávat z přirozeně infikovaného hostitele, bylo před započítáním *in vitro* experimentů nutné stanovit životaschopnost oocyst, která byla ověřována pomocí průtokové cytometrie a barvení PI. Vitalita kontrolních oocyst (5 opakování) byla měřena před každým experimentem. V průběhu práce se životaschopnost oocyst odděleně čištěných frakcí pohybovala v rozmezí 98,4–99,1 %.

4.2 Faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií

Během měření vlivů na excystaci se ukázalo, že zásadní vliv na měření excystace má stáří oocyst (výsledky nejsou součástí práce). Proto byly pro výzkum použity oocysty, které nebyly starší než jeden měsíc.

4.2.1 Vliv teploty na excystaci

Výsledky našich experimentů ukázaly, že purifikované oocysty skladované v deionizované vodě při teplotě 4 °C samovolně neexcystují, nicméně s prodlužující se dobou skladování se postupně snižuje procento živých oocyst. Při měření vlivu teploty na excystaci byly vzorky vystaveny teplotám v rozmezí 32–44 °C. Při teplotě 32 °C excystuje jen velmi malé procento oocyst (5 %, tabulka 3). Při zvýšení teploty o 1–2 stupně celsia dochází již k výraznější excystaci a excystuje až 36 % oocyst. Doba vystavení zvýšené teplotě se ukázala jako velmi důležitá. S prodlužující se dobou bylo pozorováno vyšší procento excystovaných oocyst ($P < 0,05$). Větší rozdíl nastal při teplotě 35 °C, kdy vyexcystovalo kolem 50 % oocyst. Od teploty 36 °C se naměřené hodnoty začaly zvyšovat až do 40 °C, kde excystovalo nejvíce oocyst. Teplota 40 °C se ukázala jako optimální, při které excystovalo až 92 % oocyst. Další zvyšování teploty nad 40 °C mělo negativní vliv na procento excystovaných oocyst (tabulka 3; $P < 0,05$).

Tabulka 3 - Vliv teploty na excystaci oocyst *Cryptosporidium andersoni*. Výsledky ukazují procento excystovaných oocyst po odečtení mrtvých oocyst (2,9 %). Výsledná hodnota vyjadřuje průměr z pěti na sobě nezávislých měření.

Teplota	Čas expozice (minuty)		
	5	15	30
Kontrola 4 °C	0	0	0
32 °C	3	1	5
33 °C	9	19	32
34 °C	6	26	36
35 °C	36	53	55
36 °C	39	61	66
37 °C	69	76	80
38 °C	80	81	84
39 °C	87	86	92
40 °C	83	91	92
41 °C	75	78	81
42 °C	72	75	77
43 °C	67	73	73
44 °C	71	72	74

4.2.2 Vliv pH na excystaci

Z experimentu sledujícího vliv teploty na excystaci oocyst se prokázalo, že nejvíce oocyst (83–92 %) excystuje při teplotě 40 °C. Proto při studiu vlivu pH na excystaci byly vzorky zahřívány ve vodní lázni v roztoku o pH v rozmezí 2–9 na 40 °C. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že při pH 2 excystuje maximálně 80 % oocyst *C. andersoni*. Zvyšováním pH prostředí došlo ke zvyšování počtu excystovaných oocyst. Tento nárůst byl pozorován až do pH 6–7, kdy bylo pozorováno nejvíce excystovaných oocyst (91–95 %, $P < 0,05$; tabulka 4). Další zvyšování pH na hodnotu pH 8–9 nemělo pozitivní vliv na procento excystovaných oocyst a naopak procento excystovaných oocyst opět kleslo (tabulka 4).

Tabulka 4 - Vliv pH na excystaci oocyst *Cryptosporidium andersoni* při teplotě 40 °C. Výsledná hodnota je procentuální hodnota vyexcystovaných oocyst po odečtení mrtvých oocyst. Hodnota je daná průměrem z pěti měření při stanoveném pH a časové expozici.

Teplotní a pH podmínky	Čas expozice (minuty)		
	5	15	30
Kontrola pH 7 / 4 °C	0	0	0
pH 2 / 40 °C	74	78	80
pH 3 / 40 °C	80	83	83
pH 4 / 40 °C	81	84	88
pH 5 / 40 °C	83	87	91
pH 6 / 40 °C	86	93	95
pH 7 / 40 °C	83	90	91
pH 8 / 40 °C	85	86	86
pH 9 / 40 °C	76	80	82

5 Diskuse

V rámci gastrointestinálních kryptosporidií rozpoznáváme dvě hlavní skupiny – kryptosporidie infikující střevní epitel a druhy parazitující v žaludku (Pavlásek a Ryan, 2007). Pokud se oocysty nachází v přijatelném hostitelském prostředí, uvolní čtyři infekční sporozoity a ty jsou schopny aktivní infekce hostitelských buněk. Excystace oocyst *in vitro* byla zkoumána různými metodami převážně u střevních druhů kryptosporidií (Kato et al., 2001; Robertson et al., 1993; Smith et al., 2005). Excystace střevních druhů může být stimulována např. působením žlučových solí nebo kyselými složkami a zdá se, že druhy infikující žaludek potřebují pouze zvýšenou teplotu (Gold et al., 2001; Widmer et al., 2007). Studie, které dosud byly provedeny na žaludečních kryptosporidiích savců ukazují, že vystavení oocyst těchto kryptosporidií účinkům žlučových solí nebo enzymů aktivních ve střevech nemá vliv na excystaci (Melicharová et al. 2016; Widmer et al., 2007).

Widmer et al. (2007) prokázali, že zahřátí oocyst žaludečních kryptosporidií je dostatečné k excystaci, nicméně nezkoumali vliv různých teplot. Ve své studii použili izolát *C. andersoni* JS6 získaný z trusu chovaných býků a jalovic z farmy ve Waianae na Havaji. Dalšími izoláty byl *C. andersoni* VUZV-A z šesti měsíčního býka plemene Gascone a *C. andersoni* VUZV-N z telete holštýnského skotu. Obě zvířata byla chovaná v Ústavu živočišné výroby v Praze. Dalšími zkoumanými druhy kryptosporidií ve výše zmíněné studii byly *C. parvum*, *C. hominis* a *C. muris*. Pro měření excystace Widmer suspendoval oocysty v 0,8% kyselině taurochlorové (TA), v PBS (pH 7,4) nebo v 0,1 M HCl (inkubace po dobu 1 hodiny při 37 °C). Všechny žaludeční vzorky oocyst byly v průměru staré 29 dní, aby se vyloučila možnost vlivu stáří oocyst na excystaci. Excystace oocyst obou izolátů *C. andersoni* VUZV-N (purifikované Sheaterovým roztokem) a JS6 (purifikace oocyst – histodenz/IMS) a izolátu *C. muris* RN66 probíhala velmi dobře. Z výsledků je zřejmé, že *C. muris* a *C. andersoni* excystovaly lépe v HCl než oocysty *C. parvum* a *C. hominis*. Při zkoumání vlivu teploty na excystaci Widmer zjistil, že excystační poměr pro *C. muris* při 37 °C byl 38,3 % (u oocyst *C. muris* na ledu pouze 15,3 %). Pro *C. parvum* byl provedený stejný experiment. Výsledkem bylo, že u žaludečních druhů je teplota významným spouštěčem excystace, u *C. parvum* nikoliv (Widmer et al., 2007). Na rozdíl od Widmera et al. (2007), který pro své experimenty použil teplotu 37 °C, jsme ukázali, že optimální teplota pro excystaci oocyst *C. andersoni* je 40 °C. Nicméně i při nižších nebo vyšších

teplotách dochází k excystaci relativně vysokého procenta oocyst, které by bezpochyby stačily na úspěšnou infekci hostitele. Chako et al. (2010) popsali, že minimální infekční dávka se pohybuje okolo 50 oocyst. Zjištěná optimální teplota 40 °C pro excystaci *C. andersoni* patrně souvisí s evolučním přizpůsobením parazita na svého hostitele, kterým je skot s fyziologickou rektální teplotou 37,5–39,5 °C u dospělců a 38,0–40,5 °C u mláďat (Kou et al., 2017; Lees et al., 2019). Dále jsme ukázali, že počet excystovaných oocyst se zvyšuje s časem inkubace. Nicméně mezi množstvím excystovaných oocyst za 15 a 30 minut nebyl při optimální teplotě zjištěn výrazný rozdíl. Inkubace 1 hodinu tak, jak ji uvádějí Widmer et al. (2007) je nadbytečná. Výsledky naší práce ukázaly, že expozice 15 minut je dostatečná k excystaci většiny excystace schopných oocyst.

Nízké pH v žaludku je přirozenou bariérou a ochranou zažívacího traktu hostitele před různými patogeny. Kyselé prostředí ničí choroboplodné zárodky a vytváří z žaludku velmi nehostinné prostředí, ve kterém přežívá jen málo patogenů. Z velkého počtu druhů a genotypů kryptosporidií se tomuto prostředí přizpůsobilo jen velmi malé procento zástupců rodu *Cryptosporidium* (Moran, 2005). Na rozdíl od žaludečních kryptosporidií, jsou sporozoiti střevních kryptosporidií rychle devitalizováni v obsahu žaludku (Moran, 2005; Kváč et al., 2009). Matsubayashi et al. (2011) vystavili sporozoity *C. andersoni* nízkému pH. Stejně jako ve slezu skotu, tak v žaludku myši je pH přibližně 2,0 (Moran, 2005). Takto nízké pH usnadňuje počáteční rozklad bílkovin a je smrtelné pro většinu patogenů. Tím pádem zde dochází ke snižování životaschopnosti s poklesem pH. Dalším zjištěním bylo, že sporozoiti *C. muris* jsou také usmrceni při pH 2,0 (životaschopnost 23,2 %) (Brown et al., 1996). Matsubayashi et al. (2011) uvádí, že sporozoiti žaludečních kryptosporidií než napadnou buňky svého hostitele tolerují nízké pH, ale dlouhodobě nedokážou přežít v žaludečním obsahu. Dále Matsubayashi et al. (2011) zkoumali v rámci svého experimentu variabilitu morfologie sporozoitů *C. andersoni* po excystaci v RPMI médiu. Výsledkem bylo postupné zkrácení sporozoitů. Stejný jev byl pozorován i u *C. parvum* (Matsubayashi et al., 2010). Po třech hodinách inkubace tak zůstala životaschopnost na 90,6 % (ve srovnání s *C. parvum* - 56 %) (Matsubayashi et al., 2010). Tyto získané výsledky dokazují, že *C. andersoni* je odolnější vůči kyselému prostředí než *C. parvum* v tenkém střevě. Tím pádem může přežít déle po *in vitro* excystaci (Matsubayashi et al., 2011).

Také Melicherová et al. (2016) se ve své práci zaměřili na studium životaschopnosti oocyst *C. proliferans* (dříve známo jako *C. muris* TS03). Za účelem zkoumání faktorů, které ovlivňují excystaci, byly ve výše zmíněné studii provedeny *in vitro* inkubace oocyst v různých médiích. Hodnotil se proces excystace a zároveň vliv média na motilitu sporozoitů. Nejvyšší množství excystovaných oocyst (50 %) byl u média RPMI 1640 s 5% obsahem BSA a současně byla sledována nejvyšší motilita sporozoitů. V souladu s výsledky Melicharové et al. (2016) a Matsubayashi et al. (2011) jsou výsledky této práce, ve které jsme prokázali, že vyšší hodnoty pH jsou vhodnější pro excystaci oocyst *C. andersoni*, přičemž optimální pH pro excystaci se pohybuje okolo pH 6–7. Toto odpovídá výsledkům Melicherové et al. (2016), kteří použili RPMI 1640 médium o pH od 6,9 do 7,2. V čistém RPMI 1640 se také zvyšovala excystace oocyst, ale vliv na motilitu byl zanedbatelný. Dále jsme v souladu s výsledky Melicherové et al. (2016), kteří ve své studii uvádějí, že snížením pH média (přidáním 0,6% HCl) se nijak výrazně nezvyšuje rychlost excystace, prokázali, že nízké pH prostředí má negativní vliv na excystaci oocyst žaludečních kryptosporidií. Tyto výsledky korelují se zjištěním Andersona (1998), který popsal vyšší pH ve slezu u krav infikovaných *C. andersoni* v porovnání se zvířaty bez infekce. Tyto výsledky naznačují, že kryptosporidie svou přítomností v žaludku hostitele ovlivňují fyziologické funkce hostitele. Vyšší pH prostředí je pro žaludeční kryptosporidie zcela jistě výhodnější.

Závěr

Byl prokázán vliv teploty a pH prostředí na excystaci žaludeční kryptosporidie *C. andersoni*. Optimální teplota pro excystaci oocyst *C. andersoni* je 40 °C. Teploty 41–44 °C mají negativní vliv na množství excystovaných oocyst. S rostoucím pH prostředí dochází k nárůstu počtu excystovaných oocyst až do hodnot pH 6–7, které představují optimální pH pro excystaci.

Seznam použité literatury

- AMADI, B., MWIYA, M., SIANONGO, S., PAYNE, L., WATUKA, A., KATUBULUSJI, M., KELLY, P., 2009. High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. *BMC Infectious Diseases* [online]. **9**(195) [cit. 16.3.2022]. DOI: 10.1186/1471-2334-9-195
- ANDERSON, B. C., 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Veterinary Pathology* [online]. **24**(3), 235–238 [cit. 16.3.2022]. DOI: 10.1177/030098588702400307
- ANDERSON, B. C., 1998. Cryptosporidiosis in bovine and human health. *Journal of Dairy Science* [online]. **81**(11), 3036–3041 [cit. 16.3.2022]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75868-0
- ARROWOOD, M. J., DONALDSON, K., 1966. Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **43**, 89.
- ARROWOOD, M. J., STERLING, C. R., 1987. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *Journal of Parasitology*. **73**(2), 314–319.
- AYDIN, Y., OZKUL, I. A., 1996. Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Veterinary Parasitology* [online]. **66**(3–4), 257–262 [cit. 3.4.2022]. DOI: 10.1016/s0304-4017(96)01007-2
- BOUZID, M., HUNTER, P. R., CHALMERS, R. M., TYLER, K. M., 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **26**(1), 115–134 [cit. 15.3.2022]. DOI: 10.1128/CMR.00076-12
- BROWN, S. M., McDONALD, V., DENTON, H., COOMBS, G. H., 1996. The use of a new viability assay to determine the susceptibility of *Cryptosporidium* and *Eimeria* sporozoites to respiratory inhibitors and extremes of pH. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **142**(2-3), 203–208 [cit. 15.3.2022]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08431.x
- CARRENO, R. A., MARTIN, D. S., BARTA, J. R., 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of

apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research* [online]. **85**(11), 899–904 [cit. 16.3.2022]. DOI: 10.1007/s004360050655

CASTRO-HERMIDA, J. A., ALMEIDA, A., GONZÁLEZ-WARLETA, M., Da COSTA, J. M. C., MEZO, M., 2006. Prevalence and preliminary genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from asymptomatic heifers in Galicia (NW, Spain). *Eucaryotic Microbiology* [online]. **53**(1), 22–23 [cit. 20.3.2022]. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2006.00161.x

CASTRO-HERMIDA, J. A., ALMEIDA, A., GONZÁLEZ-WARLETA, M., CORRIEA da COSTA, J. M., RUMBO-LORENZO, C., MEZO, M., 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitology Research* [online]. **101**(5), 1443–1448 [cit. 20.3.2022]. DOI: 10.1007/s00436-007-0624-6

CASTRO-HERMIDA, J. A., GARCÍA-PRESEDO, I., ALMEIDA, A., GONZÁLEZ-WARLETA, M., Da COSTA, J. M. C., MEZO, M., 2011. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). *Science of the Total Environment* [online]. **409**(13), 2451–2459 [cit. 20.3.2022]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.03.010

CONN, D. B., WEAVER, J., TAMANG, L., GRACZYK, T. K., 2007. Synanthropic flies as vectors of *Cryptosporidium* and *Giardia* among livestock and wildlife in a multi-species agricultural complex. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* [online]. **7**(4), 643–651 [cit. 22.3.2022]. DOI: 10.1089/vbz.2006.0652

CURRENT, W. L., REESE, N. C., 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of Protozoology* [online]. **33**(1), 98–108 [cit. 22.3.2022]. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1986.tb05567.x

CURRENT, W. L., UPTON, S. J., HAYNES, T. B., 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology* [online]. **33**(2), 289–296 [cit. 22.3.2022]. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1986.tb05608.x

CURRENT, W. L., GARCIA, L. S., 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **4**(3), 325–385 [cit. 15.3.2022]. DOI: 10.1128/CMR.4.3.325

-
- CURTISS, J. B., LEONE, A. M., WELLEHAN, J. F. X., EMERSON, J. A., HOWERTH E. W., FARINA, L. L., 2015. Renal and cloacal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* avian genotype V) in a major mitchell's cockatoo (*Lophochroa leadbeateri*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* [online]. **46**(4), 934–937 [cit. 16.3.2022]. DOI: 10.1638/2015-0025.1
- DAVIES, A. P., CHALMERS, R. M., 2009. Cryptosporidiosis. *BMJ* [online]. 399 [cit. 20.3.2022]. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.b4168>
- ESTEBAN, E., ANDERSON, B. C., 1995. *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *Journal of Dairy Science* [online]. **78**(5), 1068–1072 [cit. 23.3.2022]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(95)76723-6
- FAYER, R., LEEK, R. G., 1984. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. *The Journal of Protozoology* [online]. **31**(4), 567–569 [cit. 23.3.2022]. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1984.tb05504.x
- FAYER, R., GUIDRY, A., BLAGBURN, B. I., 1990. Immunotherapeutic efficacy of bovine colostral immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infection and Immunity* [online]. **58**(9), 2962–2965 [cit. 29.3.2022]. DOI: 10.1128/iai.58.9.2962-2965.1990
- FAYER, R., PHILLIPS, L., ANDERSON, B. C., BUSH, M., 1991. Chronic cryptosporidiosis in a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* [online]. **22**(2), 228–232 [cit. 29.3.2022]. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/20095144>
- FAYER, R., SANTÍN, M., XIAO, L., 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Parasitology* [online]. **91**(3), 624–629 [cit. 15.3.2022]. DOI: 10.1645/GE-3435
- FAYER, R., SANTÍN, M., TROUT, J. M., GREINER, E., 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1–2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology* [online]. **135**(2), 105–112 [cit. 15.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.08.003

-
- FAYER, R., SANTÍN, M., TROUT, J. M., 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology* [online]. **156**(3–4), 191–198 [cit. 15.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.05.024
- FAYER, R., XIAO, L., 2008. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Second edition. London: CRC Press. ISBN 978-1-4200-5226-8.
- FELTUS, D. C., GIDDINGS, C. W., KHAITSA, M. L.M McECOY, J. M., 2008. High prevalence of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in calves compared to mature cows in beef cow-calf operations. *Veterinary Parasitology* [online]. **151** (2–4), 191–195 [cit. 15.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.10.012
- FENG, Y., ORTEGA, Y., HE, G., DAS, P., XU, M., ZHANG, X., XIAO, L., 2007. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology* [online]. **144**(1–2), 1–9 [cit. 20.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.10.001
- FENG, Y., ALDERISIO, K. A., YANG, W., BLANCERO, L. A., KUHNE, W. G., NADARESKI, C. A., REIS, M., XIAO, L., 2007. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a new york watershed. *Applied and Environmental Mikrobiology* [online]. **73**(20), 6475–6483 [cit. 15.3.2022]. DOI: 10.1128/AEM.01034-07
- FENG, Y., YANG, W., RYAN, U., ZHANG, L., KVÁČ, M., KOUDELA, B., MODRY, D., LI, N., FAYER, R., XIAO, L., 2011. Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **49**(1), 34–41 [cit. 20.3.2022]. DOI: 10.1128/JCM.01329-10
- FLETA, J., SÁNCHEZ-ACEDO, C., CLAVEL, A., QUÍLEZ, J., 1995. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs. *Veterinary Parasitology* [online]. **59**(3–4), 201–205 [cit. 20.3.2022]. DOI: 10.1016/0304-4017(94)00758-5
- GARGALA, G., 2008. Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*. *Parasite* [online]. **15**(3), 275–281 [cit. 22.3.2022]. DOI: 10.1051/parasite/2008153275
- GLABERMAN, S., MOORE, J. E., LOWERY, C. J., CHALMERS, R. M., SULAIMAN, I., ELWIN, K., ROONEY, P. J., MILLAR, B. C., DOOLEY, J. S., LAL, A. A., XIAO, L.,

-
- L., 2002. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases* [online]. **8**(6), 631–633 [cit. 22.3.2022]. DOI: 10.3201/eid0806.010368
- GOLD, D., STEIN, B., TZIPORI, S., 2001. The utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium parvum* and infection of tissue culture. *The Journal of Parasitology* [online]. **87**(5), 997–1000 [cit. 25.3.2022].
- GÖBEL, E., BRAENDLER, U., 1982. Ultrastructure of microgametogenesis, microgametes and gametogamy of *Cryptosporidium* sp. in the small intestine of mice. *Protistologica*.
- GRACZYK, T. K., FAYER, R., TROUT, J. M., LEWIS, E. J., FARLEY, C. A., SULAIMAN, I., LAL, A. A., 1998. Giardia sp. cysts and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **64**(7), 2736–2738 [cit. 25.3.2022]. DOI: 10.1128/AEM.64.7.2736-2738.1998
- HASSAN, E. M., ÖRMECI, B., DeROSA, M. C., DIXON, B. R., SATTAR, S. A., IQBAL, A., 2021. A review of *Cryptosporidium* spp. and their detection in water. *Water science and technology: a Journal of the International Association on Water Pollution Research* [online]. **83**(1), 1–25 [cit. 27.3.2022]. DOI: 10.2166/wst.2020.515
- HAYES, E. B., MATTE, T. D., O'BRIEN, T. R., MCKINLEY, T. W., LOGSDON, G. S., ROSE, J. B., UNGAR, B. L., WORD, D. M., PINSKY, P. F., CUMMINGS, M. L., 1989. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *The New England Journal of Medicine* [online]. **320**(21), 1372–1376 [cit. 27.3.2022]. DOI: 10.1056/NEJM198905253202103
- HIJJAWI, N. S., MELONI, B. P., RYAN, U. M., OLSON, M. E., THOMPSON, R. C. A., 2002. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology* [online]. **32**(14), 1719–1726 [cit. 29.3.2022]. DOI: 10.1016/s0020-7519(02)00199-6
- HIKOSAKA, K., MAKAI, Y., 2005. A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Parasitology Research* [online]. **97**(5), 373–379 [cit. 15.3.2022]. DOI: 10.1007/s00436-005-1459-7
-

-
- HOLUBOVÁ, N., TŮMOVÁ, L., SAK, B., HEJZLAROVÁ, A., KONEČNÝ, R., McEVOY, J., KVÁČ, M., 2020. Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. *Parasites & Vectors* [online]. **13**(1), 340 [cit. 17.3.2022]. DOI: 10.1186/s13071-020-04191-2
- CHAKO, C. Z., TYLER, J. W., SCHULTZ, L. G., CHIGUMA, L., BEERNTSEN, B. T., 2010. Cryptosporidiosis in people: it's not just about the cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **24**(1), 37–43
- CHALMERS, R. M., DAVIES, A. P., TYLER, K., 2019. *Cryptosporidium*. *Microbiology (Reading, England)* [online]. **165**(5), 500–502 [cit. 17.3.2022]. DOI: 10.1099/mic.0.000764
- CHECKLEY, W., WHITE JR, A. C., JAGANATH, D., ARROWOOD, M. J., CHALMERS, R. M., CHEN, X. M., HOUP, E. R., 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. **15**(1), 85–94 [cit. 17.3.2022]. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70772-8
- CHEN, X. M., KEITHLY, J. S., PAYA, C. V., LaRUSSO, N. F., 2002. Cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine* [online]. **346**(22), 1723–1731 [cit. 17.3.2022]. DOI: 10.1056/NEJMra013170
- ISEKI, M., MAEKAWA, T., MORIYA, K., UNI, S., TAKADA, S., 1989. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitology Research* [online]. **75**(3), 218–222 [cit. 19.3.2022]. DOI: 10.1007/BF00931279
- KANETA, Y., NAKAI, Y., 1998. Survey of *Cryptosporidium* oocysts from adult cattle in a slaughter house. *The Journal of Veterinary Medical Science* [online]. **60**(5), 585–588 [cit. 17.3.2022]. DOI: 10.1292/jvms.60.585
- KATO, S., JENKINS, M. B., GHIORSE, W. C., BOWMAN, D. D., 2001. Chemical and physical factors affecting the excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *The Journal of Parasitology* [online]. **87**(3), 575–581 [cit. 19.3.2022]. DOI: 10.1645/0022-3395(2001)087[0575:CAPFAT]2.0.CO;2
- KHOU, H., ZHAO, Y., REN, K., CHEN, X., LU, Y., WANG, D., 2017. Automated measurement of cattle surface temperature and its correlation with rectal temperature. *PloS One* [online]. **12**(4) [cit. 3.4.2022]. DOI: 10.1371/journal.pone.0175377

-
- KOYAMA, Y., SATOH, M., MAEKAWA, K., HIKOSAKA, K., NAKAI, Y., 2005. Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan. *Veterinary Parasitology* [online]. **130**(3–4), 323–326 [cit. 16.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.03.014
- KVÁČ, M., VÍTOVEC, J., 2003. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Medicine* [online]. **50**(9), 451–457 [cit. 29.3.2022]. DOI: 10.1046/j.0931-1793.2003.00701.x
- KVÁČ, M., SAK, B., KVĚTOŇOVÁ, D., SECOR, W. E., 2009. Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Veterinary Parasitology* [online]. **163**(1–2), 33–38 [cit. 3.4.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.03.047
- KVÁČ, M., KESTŘANOVÁ, M., KVĚTOŇOVÁ, D., KOTKOVÁ, M., ORTEGA, Y., McEVOY, J., SAK, B., 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Experimental Parasitology* [online]. **131**(1), 107–110 [cit. 16.3.2022]. DOI: 10.1016/j.exppara.2012.03.016
- KVÁČ, M., HAVRDOVÁ, N., HLÁSKOVÁ, L., DAŇKOVÁ, T., KANDĚRA, J., JEŽKOVÁ, J., VÍTOVEC, J., SAK, B., ORTEGA, Y., XIAO, L., MODRÝ, D., CHELLADURAI, J. R., PRANTLOVÁ, V., McEVOY, J., 2016. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLoS One* [online]. **11**(1) [cit. 27.3.2022]. DOI: 10.1371/journal.pne.0147090
- LASSER, K. H., LEWIN, K. J., RYNING, F. W., 1979. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Human Pathology* [online]. **10**(2), 234–240 [cit. 18.3.2022]. DOI: 10.1016/S0046-8177(79)80012-X
- LAATAMNA, A. E., WAGNEROVÁ, P., SAK, B., KVĚTOŇOVÁ, D., XIAO, L., ROST, M., McEVOY, J., SAADI, A. R., AISSI, M., KVÁČ, M., 2015. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Veterinary Parasitology* [online]. **208**(3–4), 135–142 [cit. 19.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.01.007
-

-
- LEES, A. M., SEJIAN, V., LEES, J. C., SULLIVAN, M. L., LISLE, A. T., GAUGHAN, J. B., 2019. Evaluating rumen temperature as an estimate of core body temperature in Angus feedlot cattle during summer. *International Journal of Biometeorology* [online]. **63**(7), 939–947 [cit. 3.4.2022]. DOI: 10.1007/s00484-019-01706-0
- LINDSAY, D. S., UPTON, S. J., OWENS, D. S., MORGAN, U. M., MEAD, J. R., BLA-GBURN, B. L., 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* [online]. **47**(1), 91–95 [cit. 22.3.2022]. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2000.tb00016.x
- MASUNO, K., YANAI, T., HIRATA, A., YONEMARU, K., SAKAI, H., SATOH, M., MASEGI, T., NAKAI, Y., 2006. Morphological and immunohistochemical features of *Cryptosporidium andersoni* in cattle. *Veterinary Pathology* [online]. **43**(2), 202–207 [cit. 21.3.2022]. DOI: 10.1354/vp.43-2-202
- MATSUBAYASHI, M., KIMATA, I., ABE, N., TANI, H., SASAI, K., 2004. The detection of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* oocyst in cattle in Japan. *Parasitology Research* [online]. **93**(6), 504–506 [cit. 19.3.2022]. DOI: 10.1007/s00436-004-1153-1
- MATSUBAYASHI, M., ANDO, H., KIMATA, I., NAKAGAWA, H., FURUYA, M., TANI, H., SASAI, K., 2010. Morphological alteration and viability of *Cryptosporidium parvum* sporozoites after excystation in cell-free culture media. *Parasitology* [online]. **137**(13), 1861–1866 [cit. 19.3.2022]. DOI: 10.1017/S0031182010000685
- MATSUBAYASHI, M., ANDO, H., KIMATA, I., TAKASE, H., NAKAGAWA, H., FURUYA, M., SASAI, K., 2011. Effect of low pH on the morphology and viability of *Cryptosporidium andersoni* sporozoites and histopathology in the stomachs of infected mice. *International Journal for Parasitology* [online]. **41**(3–4), 287–292 [cit. 30.3.2022]. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.09.009
- MELICHEROVÁ, J., MAZOUROVÁ, V., VALIGUROVÁ, A., 2016. In vitro excystation of *Cryptosporidium muris* oocysts and viability of released sporozoites in different incubation media. *Parasitology Research* [online]. **115**(3), 1113–1121 [cit. 18.3.2022]. DOI: 10.1007/s00436-015-4841-0
- MEUTIN, D. J., VAN KRUININGEN, H. J., KEIN, D. H., 1974. Cryptosporidiosis in a calf. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 165, 914–917.
-

-
- MORAN, J., 2005. *Tropical dairy farming: feeding management for small holder dairy farmers in the humid tropics*. Australia: Landlinks Press. ISBN: 978-0-643-09313-3
- MORRIS, A., ROBINSON, G., SWAIN, M. T., CHALMERS, R. M., 2019. Direct sequencing of *Cryptosporidium* in stool samples for public health. *Frontiers in Public Health* [online]. **7**, 360 [cit. 16.3.2022]. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00360
- MURAKOSHI, F., FUKUDA, Y., MATSUBARA, R., KATO, Y., SATO, R., SASAKI, T., TADA, C., NAKAI, Y., 2013. Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Veterinary Parasitology* [online]. **196**(1–2), 184–188 [cit. 19.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.02.011
- NADER, J. L., MATHERS, T. C., WARD, B. J., PACHEBAT, J. A., SWAIN, M. T., ROBINSON, G., CHALMERS, R. M., HUNTER, P. R., OOSTERHOUT, C., TYLER, K. M., 2019. Evolutionary genomics of anthroponosis in *Cryptosporidium*. *Nature microbiology* [online]. **4**, 826–836 [cit. 22.3.2022]. DOI: 10.1038/s41564-019-0377-x
- O'HARA, S. P., CHEN, X. M., 2011. The cell biology of cryptosporidium infection. *Microbes and Infection* [online]. **13**(8–9), 721–730 [cit. 22.3.2022]. DOI:10.1016/j.micinf.2011.03.008
- ÖZKUL, I. A., AYDIN, Y., 1994. Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Veterinary Parasitology* [online]. **55**(1–2), 129–132 [cit. 20.3.2022]. DOI: 10.1016/0304-4017(94)90062-0
- PAGÉS-MANTÉ, A., PAGÉS-BOSH, M., MAJÓ-MASFERRER, N., GOMÉZ-COUSU, H., ARES-MAZÁS, E., 2007. An outbreak of disease associated with cryptosporidia on a red-legged partridge (*Alectoris rufa*) game farm. *Avian Pathology* [online]. **36**(4), 275–278 [cit. 24.3.2022]. DOI: 10.1080/03079450701439389
- PANCIERA, R. J., THOMASSEN, R. W., GARNER, F. M., 1971. Cryptosporidial Infection in Calf. *Veterinary Pathology* [online]. **8**, 479–484 [cit. 20.3.2022] DOI: 10.1177/0300985871008005-00610
- PAVLASEK, I., RYAN, U., 2007. The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Veterinary Parasitology* [online]. **144**(3–4), 349–352 [cit. 20.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.10.005

-
- PREDIGER, J., JEŽKOVÁ, J., HOLUBOVÁ, N., SAK, B., KONEČNÝ R., ROST, M., McEVOY, J., RAJSKÝ, D., KVÁČ, M., 2021. *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Eurasian Red Squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Microorganisms* [online]. **9**(10), 2050 [cit. 3.4.2022]. DOI: 10.3390/microorganisms9102050
- QI, M., WANG, H., JING, B., WANG, D., WANG, R., ZHANG, L., 2015. Occurrence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Xinjiang, Northwestern China. *Veterinary Parasitology* [online]. **212**(3–4), 404–407 [cit. 27.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.07.002
- RALSTON, B., THOMPSON, R. C., PETHICK, D., McALLISTER, T. A., OLSON, M. E., 2010. *Cryptosporidium andersoni* in Western Australian feedlot cattle. *Australian Veterinary Journal* [online]. **88**(11), 458–460 [cit. 1.4.2022]. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2010.00631.x
- RHEE, J. K., KIM, H. C., EUN, G. S., 1998. Infection kinetics and developmental biology of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in Korean native kids and Corriedale lambs. *The Korean Journal of Parasitology* [online]. **36**(3), 171–181 [cit. 1.4.2022]. DOI: 10.3347/kjp.1998.36.3.171
- ROBERTSON, L. J., CAMPBELL, A. T., SMITH, H. V., 1993. *In vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* [online]. **106**(1), 13–19 [cit. 17.3.2022]. DOI: 10.1017/S003118200007476X
- ROBERTSON L. J., 2007. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **120**(3), 201–216 [cit. 22.3.2022]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.058
- RYAN, U., ZAHEDI, A., PAPARINI, A., 2016. *Cryptosporidium* in humans and animals-a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunology* [online]. **38**(9), 535–547 [cit. 20.3.2022]. DOI: 10.1111/pim.12350
- RYAN, U., ZAHEDI, A., FENG, Y., XIAO, L., 2021. An update on zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes in humans. *Animals* [online]. **11**(11), 3307 [cit. 2.4.2022]. DOI: 10.3390/ani11113307
- SAK, B., PETRŽELKOVÁ, K. J., KVĚTOŇOVÁ, D., MYNAROVÁ, A., SHUTT, K. A., POMAJBIKOVÁ, K., KALOUSOVÁ, B., MODRÝ, D., BENAVIDES, J., TODD,
-

-
- A., KVÁČ, M., 2013. Long-term monitoring of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at different stages of habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *PloS One* [online]. **8**(8) [cit. 20.3.2022]. DOI: 10.1371/journal.pone.0071840
- SANTÍN, M., TROUT, J. M., XIAO, L., ZHOU, L., GREINER, E., FAYER, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology* [online]. **122**(2), 103–117 [cit. 24.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.03.020
- SANTÍN, M., TROUT, J. M., FAYER, R., 2007. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Veterinary Parasitology* [online]. **146**(1–2), 17–24 [cit. 24.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.01.010
- SANTÍN, M., TROUT, J. M., FAYER, R., 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology* [online]. **155**(1–2), 15–23 [cit. 24.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.04.018
- SANTÍN, M., 2020. *Cryptosporidium* and *Giardia* in ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* [online]. **36**(1), 223–238 [cit. 25.3.2022]. DOI: 10.1016/j.cvfa.2019.11.005
- SLAVIN, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology* [online]. **65**(3), 262–266 [cit. 25.3.2022]. DOI: 10.1016/s0368-1742(55)80025-2
- SMITH, H. V., ROSE, J. B., 1998. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitology Today* [online]. **14**(1), 14–22 [cit. 27.3.2022]. DOI: 10.1016/s0169-4758(97)01150-2
- SMITH, H. V., NICHOLS, R. A., GRIMASON, A. M., 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology* [online]. **21**(3), 133–142 [cit. 22.3.2022]. DOI: 10.1016/j.pt.2005.01.007
- SMITH, R. P., CLIFTON-HADLEY, F. A., CHENEY, T., GILES, M., 2014. Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. *Veterinary Parasitology* [online]. **204**(3–4), 111–119 [cit. 29.3.2022]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.05.022
-

-
- SOLDATI, D., DUBREMETZ, J. F., LEBRUN, M., 2001. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* [online]. **31**(12), 1293–1302 [cit. 17.3.2022]. DOI: 10.1016/s0020-7519(01)00257-0
- SPANO, F., PUTIGNANI, L., NAITZA, S., PURI, C., WRIGHT, S., CRISANTI, A., 1998. Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **92**(1), 147–162 [cit. 16.3.2022]. DOI: 10.1016/s0166-6851(97)00243-0
- TANDEL, J., ENGLISH, E. D., SATERIALE, A., GULLICKSRUD, J. A., BEITING, D. P., SULLIVAN, M. C., PINKSTON, B., STRIEPEN, B., 2019. Life cycle progression and sexual development of the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*. *Nature Microbiology* [online]. **4**(12), 2226–2236 [cit. 19.3.2022]. DOI: 10.1038/s41564-019-0539-x
- TAYLOR, M. A., MARSHALL, R. N., GREEN, J. A., CATCHPOLE, J., 1999. The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. *Veterinary Parasitology* [online]. **86**(1), 41–48 [cit. 19.3.2022]. DOI: 10.1016/s0304-4017(99)00114-4
- TETLEY, L., BROWN, S., McDONALD, V., COOMBS, G. H., 1998. Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology* [online]. **144**(12), 3249–3255 [cit. 19.3.2022]. DOI: 10.1099/00221287-144-12-3249
- THOMSON, S., INNES E. A., JONSSON, N. N., KATZER, F., 2019. Shedding of *Cryptosporidium* in calves and dams: evidence of re-infection and shedding of different gp60 subtypes. *Parasitology* [online]. **146**(11), 1404–1413 [cit. 21.3.2022]. DOI: 10.1017/S0031182019000829
- 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., 2010. 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.
-

-
- TZIPORI, S., WARD, H., 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection* [online]. **4**(10), 1047–058 [cit. 16.3.2022]. DOI: 10.1016/s1286-4579(02)01629-5
- VOLF, P., HORÁK P., 2007. *PARAZITI: a jejich biologie*. Praha/Kroměříž: TRITON. ISBN 978-80-7387-008-9.
- WANG, R., MA, G., ZHAO, J., LU, Q., WANG, H., ZHANG, L., JIAN, F., NING, C., XIAO, L., 2011. *Cryptosporidium andersoni* is the predominant species in post-weaned and adult dairy cattle in China. *Parasitology International* [online]. **60**(1), 1–4 [cit. 18.3.2022]. DOI: 10.1016/j.parint.2010.09.002
- WANG, R., ZHAO, G., GONG, Y., ZHAND, L., 2017. Advances and Perspectives on the Epidemiology of Bovine *Cryptosporidium* in China in the Past 30 Years. *Frontiers in Microbiology* [online]. **8**, 1823 [cit. 18.3.2022]. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01823
- WANG, K., GAZIZOVA, A., WANG, Y., ZHANG, K., ZHANG, Y., CHANG, Y., CUI, Y., ZHANG, Y., ZHANG, S., ZHANG, L., 2019. First detection of *Cryptosporidium* spp. in migratory Whooper Swans (*Cygnus cygnus*) in China. *Microorganisms* [online]. **8**(1) [cit. 17.3.2022]. DOI: 10.3390/microorganisms8010006
- WANG, Y., CAO, J., CHANG, Y., YU, F., ZHANG, S., WANG, R., ZHANG, L., 2020. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Gansu, northwest China. *Parasite* [online]. **27**(62), 9 [cit. 25.3.2022]. DOI: 10.1051/parasite/2020058
- WANG, Y., ZHANG, K., CHEN, Y., LI, X., ZHANG, L., 2021. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in wild birds: A One Health perspective. *Parasitology Research* [online]. **120**(9), 3035–3044 [cit. 25.3.2022]. DOI: 10.1007/s00436-021-07289-3
- WEISBURGER, W. R., HUTCHEON, D. F., YARDLEY, J. H., ROCHE, J. C., HILLIS, W. D., CHARACHE, P., 1979. Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. **72**(3), 473–478 [cit. 25.3.2022]. DOI: 10.1093/ajcp/72.3.473
- WIDMER, G., KLEIN, P., BONILLA, R., 2007. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology* [online]. **134**(11), 1583–1588 [cit. 29.3.2022]. DOI: 10.1017/S0031182007002922

-
- XIAO, L., ESCALANTE, L., YANG, C., SULAIMAN, I., ESCALANTE, A. A., MONTALI, R. J., FAYER, R., LAL, A. A., 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **65**(4), 1578–1583 [cit. 22.3.2022]. DOI: 10.1128/AEM.65.4.1578-1583.1999
- XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U., UPTON, S. J., 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **17**(1), 72–97 [cit. 17.3.2022]. DOI: 10.1128/CMR.17.1.72-97.2004
- XIAO, L., FAYER, R., 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology* [online]. **38**(11), 1239–1255 [cit. 17.3.2022]. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.03.006
- XIAO, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology* [online]. **124**(1), 80–89 [cit. 17.3.2022]. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.03.018
- ZAHEDI, A., RYAN, U., 2020. *Cryptosporidium*-An update with an emphasis on food-borne and waterborne transmission. *Research in Veterinary Science* [online]. **132**, 500–512 [cit. 20.3.2022]. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.08.002

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Žaludeční kryptosporidie u savců.....	17
Tabulka 2 - Gelová elektroforéza - množství agarozy a TAE pufru pro určitý typ nosiče	29
Tabulka 3 - Vliv teploty na excystaci oocyst <i>Cryptosporidium andersoni</i> . Výsledky ukazují procento excystovaných oocyst po odečtení mrtvých oocyst (2,9 %). Výsledná hodnota vyjadřuje průměr z pěti na sobě nezávislých měření.	32
Tabulka 4 - Vliv pH na excystaci oocyst <i>Cryptosporidium andersoni</i> při teplotě 40 °C. Výsledná hodnota je procentuální hodnota vyexcystovaných oocyst po odečtení mrtvých oocyst. Hodnota je daná průměrem z pěti měření při stanoveném pH a časové expozici.	33

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Vývojový cyklus <i>Cryptosporidium</i> spp. (Bouzid 2013, upraveno Hassan 2021) - upraveno	14
--	----