



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

FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra zootechnických věd

Diplomová práce

Faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií
hlodavců

Autorka práce: Bc. Tereza Schulzová

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 vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Cílem této práce bylo zjistit, jaký vliv má tělesná teplota hostitele a pH prostředí na excystaci a zachování infekce schopnosti oocyst žaludečních kryptosporidií hlodavců. Dále byla prozkoumána infektivita nevyexcystovaných oocyst. Imunodeficitní SCID myši (*Mus musculus*) byly infikovány oocystami *C. proliferans*, následně byl odebírán jejich trus a byly prováděny jednotlivé experimenty. Byl zkoumán vliv teploty na excystaci, kdy byly oocysty vkládány do vodní lázně vytemperované na příslušnou teplotu (32–44 °C) a dále vliv pH, kdy byly oocysty vystaveny roztokům o různé hodnotě pH (2–7). Za pomoci průtokového cytometru byla následně prováděna buněčná separace a zjištěné hodnoty byly zapisovány do tabulek. Nejvíce oocyst excystovalo při teplotě 40 °C a při pH 7. Dále byla provedena pitva nakažených myší, pro zjištění infekčnosti oocyst z různých částí trávicí soustavy. Všechny odebrané vzorky oocyst byly infekční pro následného hostitele. Dále byly provedeny infekční experimenty, kdy bylo zjištěno, že nevyexcystované oocysty vystavené účinkům SAVA a laboratorní teploty si zachovávají svou infekce schopnost. Oproti tomu sporozoiti oocyst, které excystovaly, byly náchylní jak k SAVU, tak k laboratorní teplotě a schopnost infekce následného hostitele tak ztratily.

Klíčová slova: *Cryptosporidium* spp.; kryptosporidióza; excystace; infekce; hlodavci

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of host body temperature and environmental pH on the excystation and preservation of the ability to infection of rodent gastric cryptosporidia oocysts. The infectivity of unexcysted oocysts was further examined. Immunodeficiency SCID mice (*Mus musculus*) were infected with *C. proliferans* oocysts, then their faeces were collected and individual experiments were performed. The effect of temperature on excystation, when oocysts were placed in water baths at the appropriate temperature (32–44 °C) and the effect of pH, when oocysts were exposed to solutions of different pH (2–7), was investigated. Cell separation was then performed using a flow cytometer and the values obtained were recorded in the tables. The most oocysts excysted at 40 °C and pH 7. An autopsy of infected mice was also performed to determine the infectivity of oocysts from various parts of the digestive system. All taken oocyst samples were infectious for the subsequent host. Infection experiments, which were further carried out revealed, that unexcysted oocysts exposed to hypochlorite and laboratory temperatures retain their ability to infect. In contrast, the oocyst sporozoites that excysted were susceptible to both hypochlorite and room temperature, thus losing the ability infect the subsequent host.

Keywords: *Cryptosporidium* spp.; cryptosporidiosis; excystation; infection; rodents

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu práce prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za jeho trpělivost, připomínky a ochotu mi pomoci kdykoli bylo potřeba. Dále bych ráda poděkovala školitelce Mgr. Lence Tůmové, která mi s celou prací pomáhala a dávala cenné rady. Děkuji všem pracovníkům Laboratoře veterinární a lékařské protistologie, Parazitického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za pomoc v laboratoři a příjemnou atmosféru. Velké díky patří i mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala a umožnila práci dokončit.

Tato práce byla finančně podpořena grantovými projekty GACR 21-23773S a GAJU 005/2022/Z.

Obsah

Úvod	8
1 Literární přehled.....	9
1.1 Historie kryptosporidií	9
1.2 Kryptosporidie a kryptosporidioza	9
1.3 Vývojový cyklus kryptosporidií	10
1.4 Hostitelská specifita kryptosporidií	10
1.5 Tkáňová specifita kryptosporidií	11
1.6 Lokalizace kryptosporidiových infekcí	11
1.6.1 Žaludeční kryptosporidie.....	12
1.6.2 Druhy žaludečních kryptosporidií hlodavců	12
<i>Cryptosporidium proliferans</i>	12
<i>Cryptosporidium muris</i>	13
1.7 Excystace kryptosporidií.....	13
1.8 Léčba kryptosporidiových infekcí	14
1.9 Prevence proti kryptosporidiovým infekcím	15
2 Cíle práce	16
3 Materiál a metodika.....	17
3.1 Materiál.....	17
3.1.1 Zvířata pro pokus.....	17
3.1.2 Zdroj oocyst.....	17
3.1.3 Příprava roztoků o různém pH	17
3.2 Metodika	17
3.2.1 Purifikace oocyst	17
3.2.2 Čištění oocyst na sacharózovém gradientu.....	17
3.2.3 Čištění oocyst na cesium chloridovém gradientu.....	18

3.2.4	Skladování oocyst.....	18
3.2.5	Testování životaschopnosti	19
3.2.6	Testování vlivu teploty	19
3.2.7	Testování vlivu pH	19
3.2.8	Infektivita nevyexcystovaných oocyst	20
3.2.9	Infektivita žaludečních kryptosporidií nevytloučených z hostitele ...	20
3.2.10	Ověření identity používaného izolátu	20
4	Výsledky	24
4.1	Testování vlivu teploty	24
4.2	Testování vlivu pH.....	25
4.3	Infektivita nevyexcystovaných oocyst.....	25
4.4	Infektivita žaludečních kryptosporidií nevytloučených z hostitele	26
5	Diskuse.....	27
	Závěr.....	31
	Seznam použité literatury	32
	Seznam tabulek.....	43

Úvod

Kryptosporidie jsou kosmopolitně rozšíření paraziti, kteří infikují převážně buňky gastrointestinálního a dýchacího traktu obratlových hostitelů. Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou nebezpeční jak pro hospodářská zvířata, tak i pro člověka (Current a Garcia, 1991). Doposud bylo popsáno 49 platných druhů a více než 100 genotypů, z nichž je přibližně 20 infekčních pro člověka – nejčastěji hlášené infekce u lidí jsou způsobeny druhy *C. parvum* a *C. hominis* (Holubová et al., 2019; Ježková et al., 2021; Xiao, 2010).

Jednotlivé druhy kryptosporidií se liší místem infekce. Některé parazitují ve střevě, zatímco jiné primárně v žaludku. Dále se od sebe tyto dvě skupiny kryptosporidií navzájem odlišují velikostí a tvarem oocyst, kdy oocysty žaludečních kryptosporidií jsou větší než ty, které se vyvíjejí ve střevě. Vzhledem k relativně nízké patogenitě jsou žaludeční kryptosporidie na okraji zájmu a doposud bylo provedeno málo studií. Místo infekce má zásadní vliv na podmínky, při kterých infekční oocysty excystují v těle hostitele a začíná proces infekce (Kváč et al., 2013; Neumayerová a Koudela, 2008; Xiao et al., 2004). Proces je ovlivněn řadou faktorů, jako je teplota, pH, koncentrace žlučových solí, oxidu uhličitého, či pankreatických a proteolytických enzymů, kdy právě teplota je považována za jeden z významných činitelů ovlivňujících životaschopnost oocyst. Do současné doby bylo provedeno jen omezené množství studií zabývajících se faktory ovlivňujících excystaci (Fayer a Leek, 1984; Curtiss et al., 2015).

Většina studií zabývajících se excystací kryptosporidií byla zaměřena na druhy infikující střevní epitel hostitelů. U žaludečních druhů se předpokládá, že pro excystaci je třeba pouze zvýšené teploty. Tento předpoklad má však řadu nedostatků a nevysvětluje fakt, že nově vytvořené oocysty žaludečních kryptosporidií neexcystují v těle hostitele při několika hodinovém průchodu zažívací soustavou hostitele (Smith et al., 2005).

Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na studium faktorů ovlivňujících excystaci žaludečních kryptosporidií infikujících hlodavce.

1 Literární přehled

1.1 Historie kryptosporidií

Tyto organismy byly poprvé popsány Ernestem Edwardem Tyzzerem již na počátku 20. století, kdy zjistil jejich přítomnost ve sliznici žaludku laboratorních myší a prokázal, že se oocysty vylučují společně s exkrementy. Tento druh pojmenoval *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1907). O několik let později popsal další druh, který detekoval v tenkém střevě laboratorních myší a nazval jej *Cryptosporidium parvum*. Určil, že oocysty *C. muris* jsou větší, než oocysty *C. parvum* (Tyzzer, 1912). Roku 1955 popsal Slavin druh *C. meleagridis* u krůt (Slavin, 1955). Zájem o tohoto parazita vzrostl roku 1970, kdy byly popsány první infekce kryptosporidií u telat a o šest let později u člověka (Panciera et al., 1971; Meisel et al., 1976; Nime et al., 1976).

V současné době je známo velké množství druhů a genotypů kryptosporidií, které je obtížné od sebe odlišit na základě morfologických znaků. Jedinou možností pro spolehlivou determinaci druhů a genotypů je použít molekulární metody (El-Alfy a Nishikawa, 2020).

1.2 Kryptosporidie a kryptosporidióza

Kryptosporidie jsou jednobuněční paraziti rodu *Cryptosporidium* infikující gastrointestinální trakt, případně další orgány, většiny obratlovců, včetně člověka (O'Donoghue, 1995). Dlouhou dobu byly řazeny mezi kokcidie, z důvodu podobnosti jejich vývojového cyklu, ale na základě molekulárních studií byla zjištěna podobnost s gregarinami z kmene Apicomplexa. Kryptosporidie mají, pro tento kmen charakteristický, apikální komplex, který slouží k průniku do hostitelské buňky. K nákaze dochází nejčastěji fekálně-orální cestou, přes kontaminovanou vodu, krmivo, nepasterizované mléčné výrobky, či přímým kontaktem s nakaženým člověkem/zvířetem (Levine, 1988; Gait et al., 2008; Cacció, 2005; Dillingham et al., 2002). Po vniknutí do organismu způsobují onemocnění zvané kryptosporidióza, které se nejčastěji projevuje průjmem, dehydratací a ztrátou tělesné hmotnosti (Xiao et al., 2004). Průběh však záleží na věku, imunitním systému, celkovém zdraví jedince a dalších faktorech. Roku 1986 byla popsána studie, kdy imunokompetentní pacienti trpěli symptomatickou kryptosporidiózou, někteří asymptomatictí však pouze vylučovali oocysty. Při dobrém zdravotním stavu hostitele je průběh většinou bez příznaků (Jokipii a Jokipii, 1986).

1.3 Vývojový cyklus kryptosporidií

Životní cyklus kryptosporidií je jednohostitelský a má čtyři fáze: excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie. V momentu, kdy se oocysta dostane do těla hostitele, dojde k otevření její stěny v místě nazývaném sutura a následně dochází k uvolnění čtyř infekčních sporozoitů (excystace), kteří se pohybují klouzavým pohybem (Okhuysen a Chapell, 2002). K nákaze stačí jen velmi malé množství oocyst (Tyzzer, 1910; Zambriski et al., 2013). Sporozoiti vyhledají povrch sliznice hostitele, ke kterému se připojí díky apikálnímu komplexu a infikují epiteliální buňky tenkého střeva, sliznice žaludku nebo dýchacího traktu. Lokalizace cyklu je ale druhově specifická, byly hlášeny případy i mimo gastrointestinální či dýchací trakt – oko, močový měchýř, lymfatické uzliny, děloha, pochva, vaječníky a varlata či játra (Wetzel et al., 2005; Sponseller et al., 2014; Baskin, 1996; Fleta et al., 1995; Kahn et al., 1987).

Další fází je merogonie (nepohlavní rozmnožování), která nastává po přeměně sporozoitů na jednojaderné trofozoity a po rozdělení jejich jádra dochází k nepohlavnímu rozmnožování za vzniku merontů dvou typů – z prvního typu vzniká šest až osm merozoitů, kteří infikují další hostitelské buňky. Druhý typ merontů spouští gametogonii – pohlavní rozmnožování (Current a Reese, 1986).

Z merontů druhého typu vznikají gamonti, kdy samčí jsou mikrogamonti a samičí makrogamonti. Z mikrogamontů vznikají mikrogametocyty se čtrnácti až šestnácti bičíkatými mikrogametami. Mikrogamety oplodňují makrogamety, které vznikají ze samičích makrogamontů, tím vzniká zygota, která se dále vyvíjí v oocystu (Current et al., 1987).

Poslední fází vývojového cyklu je sporogonie, při které dochází k endogenní sporulaci vzniklé zygoty. Dotváří se čtyři sporozoiti a výsledkem je zralá oocysta, která je infekční pro další hostitele ihned po vyloučení z toho původního (Fayer, 1997).

Bylo zjištěno, že infekce střevním druhem *C. parvum* vykazuje kratší prepatentní období a rychlejší výskyt zralých oocyst v hostitelském trusu než žaludeční druh *C. proliferans* (Melicherová et al., 2014; Tzipori, 1983).

1.4 Hostitelská specifita kryptosporidií

Jednotlivé druhy kryptosporidií se od sebe odlišují svou hostitelskou specifitou. Některé mají širokou specifitu, některé jsou typické pouze pro určitou skupinu obratlovců a jiné jen pro jeden konkrétní druh hostitele (Fayer et al., 2007). Například nejvíce se vyskytující druh *C. parvum* má široké spektrum hostitelů, mezi které patří většina

savců, včetně lidí a hospodářských zvířat. Oproti tomu se druh *C. hominis* vyskytuje pouze u člověka. Byly však hlášeny případy nákazy u prasat a jehňat či u dugonga (Bankier et al., 2003; Santoro et al., 2019; Feng et al., 2018; Giles et al., 2001; Ebeid et al., 2003; Morgan et al., 2000). Dalším druhem je *C. meleagridis*, který je hlášen u savců a ptáků (Xiao, 2010; Silverlås et al., 2012; Wang et al., 2014). Druh *C. ubiquitum*, který má nízkou hostitelskou specifitu, je kromě lidí běžně detekován u malých přežvýkavců (Fayer et al., 2010; Li et al., 2014; Xu et al., 2019). Druh *C. suis* je momentálně nejčastěji se vyskytující kryptosporidií u prasat, a to především u selat. Kromě prasat byla prokázána vnímavost i u telat (Kváč et al., 2009; Enemark et al., 2003). K druhu *C. erinacei* jsou vnímaví ježci, ale byl prokázán i u člověka (Kváč et al., 2014).

1.5 Tkáňová specifita kryptosporidií

Jednotlivé druhy a genotypy kryptosporidií mají různou tkáňovou specifitu. Organová specifita je pro kryptosporidie typická, lze je touto cestou od sebe lépe odlišit, ale nelze ji používat pro diagnostiku jednotlivých druhů. Mohou parazitovat v různých místech trávicí trubice. Některé druhy jsou primárně v tenkém střevě – *C. tyzzeri*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. ryanae* či *C. wrairi* (Ren et al., 2012; Fayer et al., 2005; Fayer et al., 2001; Fayer et al., 2008; Vetterling et al., 1971), jiné v tlustém střevě – *C. ratti*, *C. ornithophilus*, *C. microti*, *C. occultus* (Ježková et al., 2021; Holubová et al., 2020; Horčíčková et al., 2019; Kváč et al., 2018). Druhy *C. meleagridis* či *C. parvum* parazitují jak v tenkém, tak v tlustém střevě (Slavin, 1955; Upton a Current, 1985). Další druhy v žaludku – viz. Tabulka 1. Dále např. druh *C. baileyi*, který parazituje jak ve střevech, tak ve velké míře i v dýchacích či močových cestách (Current et al., 1986) nebo *C. avium*, který má kromě tenkého a tlustého střeva afinitu i k ledvinám, močovodu a kloace (Holubová et al., 2016).

1.6 Lokalizace kryptosporidiových infekcí

Dle lokalizace infekce rozeznáváme dva typy kryptosporidií: žaludeční a střevní. Infekce vyvolané žaludečními kryptosporidii mají většinou asymptomatický průběh, naopak infekce způsobené těmi střevními jsou často provázeny silnými průjmy, dehydratací, zvracením, horečkou a malátností. Oocysty žaludečních kryptosporidií jsou oproti střevním větší a oválné. Žaludeční druhy kryptosporidií jsou méně odolné vůči vnějším vlivům a jejich infekčnost ve srovnání se střevními kryptosporidii rychle

klesá (Taylor et al., 1999; Fayer ,2003; Thompson et al., 2005; Kváč et al., 2013; DuPont et al., 1995; Kváč et al., 2018).

1.6.1 Žaludeční kryptosporidie

Tabulka 1 – Seznam platných druhů žaludečních kryptosporidií

Druh	Hostitel	Autor
<i>C. muris</i>	hlodavci	Tyzzzer, 1907
<i>C. serpentis</i>	plazi	Levine, 1980
<i>C. reichenbachklinkei</i>	ryby	Paperna a Vilenkin, 1996
<i>C. galli</i>	ptáci	Pavlásek, 1999
<i>C. andersoni</i>	skot	Lindsay et al., 2000
<i>C. fragile</i>	obojživelníci	Jirků et al., 2008
<i>C. huwi</i>	ryby	Ryan et al., 2015
<i>C. proliferans</i>	hlodavci	Kváč et al., 2016
<i>C. proventriculi</i>	papoušci	Holubová et al., 2019
<i>C. bollandi</i>	ryby	Bolland et al., 2020

1.6.2 Druhy žaludečních kryptosporidií hlodavců

Cryptosporidium proliferans

Druh nejprve známý jako *C. muris*, kmen TS03, avšak po výsledcích studie Kváč et al. (2016) popsán jako samostatný druh *C. proliferans*. Charakteristickým hostitelem tohoto druhu jsou hlodavci a místem infekce je žaludek. Je ale známo, že neinfikuje nežláznatou část žaludku. Rozměry oocyst jsou 6,8–8,8 μm (7,7 μm) $\times$ 4,8–6,2 μm (5,3 μm), přičemž v každé oocystě jsou přítomni čtyři sporozoiti. Jsou delší a užší než oocysty druhu *C. muris* a také se velikostně významně liší od oocyst střevních druhů kryptosporidií (Fayer a Xiao, 2008; Melicherová et al., 2014; Ghazy et al., 2015). Pre-patentní perioda (tj. doba od pozření oocysty až po okamžik vylučování nově vzniklých oocyst) je 6–21 dní v závislosti na druhu hostitele, patentní perioda (doba vylučování oocyst) může trvat několik dní, měsíců či let (Kváč et al., 2016).

Cryptosporidium muris

Druh byl popsán již roku 1907 v žaludku laboratorních myší (Tyzzer, 1907). Typickým hostitelem jsou hlodavci (myši, potkani, hraboši, pískomilové), ale byly popsány přirozené nebo experimentální infekce u přežvýkavců (ovce, kozy, velbloudi). Stejně jako *C. proliferans* neinfikuje nežláznatou část žaludku hlodavců nebo předžaludky přežvýkavců. Dále byla popsána omezená vnímavost u psů, koček a u člověka (Fayer, 1990; Fayer et al., 1991; Anderson, 1991; Fayer et al., 1997; Lupo et al., 2008; Aydin a Özkul, 1996; Hůrková et al., 2003; Katsumata et al., 2000). Infekce probíhá ve většině případů bez příznaků a bez viditelných změn na orgánech. Rozměry oocyst jsou $5,5\text{--}7\text{ }\mu\text{m}$ ($6,3\text{ }\mu\text{m}$) $\times$ $7,5\text{--}9,8\text{ }\mu\text{m}$ ($8,4\text{ }\mu\text{m}$). Délka prepatentní periody je u laboratorních myší 7–12 dní (Iseki, 1986; Kváč et al., 2008).

1.7 Excystace kryptosporidií

Žaludeční kryptosporidie jsou přizpůsobené k životaschopnosti a excystaci vlivem kyselého prostředí žaludku, ve kterém by střevní kryptosporidie nepřežily – ty excystují až účinkem proteolytických enzymů, žluče a trypsinu ve střevě (Fayer a Ungar, 1986).

O podmínkách nezbytných pro excystaci žaludečních kryptosporidií toho není mnoho známo. Naopak proces excystace u střevních druhů, zejména u druhu *C. parvum*, byl velmi dobře prozkoumán. *In vitro* studie se snaží simulovat přirozený průchod oocysty hostitelem. Je známo, že oocysty *C. andersoni* jsou schopny v *in vitro* podmínkách excystovat pouze vlivem vyšší teploty ve vodním prostředí, přičemž byly použity teploty odpovídající teplotě těla hostitele $\sim 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fayer a Leek, 1984; Widmer et al., 2007; Li et al., 2021). Velmi často je jak u střevních, tak i žaludečních kryptosporidií používáno vystavení oocyst různým koncentracím chlornanu sodného, který simuluje průchod oocyst žaludkem (Fayer, 1995; Siripanth et al., 2004). Woodmanse (1987) a Reduker a Speer (1985) uvádějí, že pro excystaci bovinních kryptosporidií v *in vitro* podmínkách není zapotřebí trypsin ani jiné proteázy, stačí oocysty zahřát na tělesnou teplotu hostitele. Nezbytné je však oocysty před excystací vystavit účinkům chlornanu sodného a při excystaci taurocholátu sodnému (Woodmanse, 1987; Reduker a Speer, 1985; Gold et al., 2001). Nejvhodnějším médiem podporujícím vysokou rychlost excystace a motilitu sporozoitů *C. parvum* je RPMI 1640 a 5% bovinní sérový albumin (BSA) (Melicherová et al., 2016) a ideální pH pro úspěšnou excystaci a přežití sporozoitů je 6,8–7,4 (Woodmansee, 1987). Melicherová et al. (2016) experimentálně popsali, že při excystaci druhu *C. muris* byly často uvolněny jen tři

sporozoiti, čtvrtý buď opustil oocystu později, nebo zůstal uvězněn ve stěně oocysty. Výsledky studie tak naznačují, že úspěšná excystace oocyst není omezena životaschopností všech čtyř sporozoitů. Některé studie dále tvrdí, že ošetření oocyst chlornanem sodným může mít nežádoucí účinky jak na excystaci, tak na samotné oocysty, jelikož v důsledku inkubace v chlornanu sodném dochází ke ztenčení stěny oocysty (Smith et al., 1988). Výsledky studie od Modolo et al. (1994) uvádí, že po 30 minutách expozice oocyst v chlornanu sodném získaly načervenalý nádech, což znesnadnilo jejich identifikaci.

V současné době je pro excystaci střevních kryptosporidií používáno několik různých metodik, které se od sebe liší koncentrací použitých reagensů, časem excystace nebo teplotou při ošetření oocyst před excystací (Rasmussen et al., 1995; Harris a Petry, 1999; Korich et al., 1990; Black et al., 1996; Gut a Nelson, 1999; Rennecker et al., 1999), zatímco pro excystaci žaludečních kryptosporidií je využíváno pouze zahřátí oocyst na teplotu 38 °C (Melicherová et al., 2018).

1.8 Léčba kryptosporidiových infekcí

Proti kryptosporidioze dosud nebyla vyvinuta žádná účinná léčba, což staví do nebezpečí jak jedince se špatnou imunitou, tak imunodeficientní pacienty s AIDS (Flanigan a Soave, 1993; Maggi et al., 2000). V současné době je nitazoxanid jedinou prokázanou antiparazitární léčbou proti kryptosporidiovým infekcím, nicméně tento lék není účinný při léčbě imunodeficitních jedinců, u kterých dochází i přes léčbu k opakovaným relapsům infekce (Sparks et al., 2015; Checkley et al., 2015; Rossignol et al., 2001; Theodos et al., 1998). V řadě dalších studií bylo vyzkoušeno velké množství medikamentů, žádný z nich nebyl nijak zvlášť účinný, pouze v některých případech nepatrně snižoval množství vylučovaných oocyst, či zkracoval délku trvání infekce (Lindsay et al., 1987; White et al., 1994; Griffiths et al., 1998; Hornok et al., 1999). Halocur je v současné době jedním z nejčastěji používaných léčiv ve veterinární medicíně, jehož účinek výrazným způsobem omezuje množství produkovaných oocyst nakaženým jedincem. Nicméně bez aktivního zapojení imunitního systému hostitele by nedošlo ke zvládnutí infekce. Primárním řešením je nezbytná symptomatická léčba ve formě rehydratace a náhrady elektrolytů (Trotz et al., 2011; Thompson et al., 2005).

1.9 Prevence proti kryptosporidiovým infekcím

Preventivní opatření patří k základní ochraně zdraví zvířat a lidí před infekcí. Je nezbytné dodržovat základní hygienická opatření omezující kontakt jedince s kontaminovaným prostředím a infikovanými jedinci, např. výstavbou kanalizací a izolací pozitivních jedinců. Vzhledem k vysoké odolnosti oocyst vůči podmínkám vnějšího prostředí a dezinfekčním prostředkům je obtížné při výskytu tohoto parazita eliminovat (Barbee et al., 1999). Nedávné studie prokázaly, že oxid chloričitý (ClO_2) je účinnější dezinfekční prostředek než volný chlor (Chauret et al., 2001). Hlavní faktor, který ovlivňuje životaschopnost oocyst, je však teplota – jak extrémně vysoké, tak extrémně nízké teploty dokážou oocysty spolehlivě zničit (Fujino et al., 2002; Fayer, 2004; Fayer a Nerad, 1996).

2 Cíle práce

- Studovat vliv tělesné teploty hostitele a pH prostředí na excystaci oocyst žaludečních kryptosporidií infikujících hlodavce.
- Pomocí *in vitro* experimentů popsat efekt studovaných vlivů na excystaci oocyst a životaschopnost sporozoitů.
- Pro studie použít druh *Cryptosporidium proliferans*.
- Zpracovat výsledky příslušnými statistickými metodami a porovnat je s publikovanými údaji.

3 Materiál a metodika

3.1 Materiál

3.1.1 Zvířata pro pokus

Pro laboratorní pokus byly použity imunodeficitní SCID myši (*Mus musculus*), které jsou chovány v Parazitologickém ústavu v Českých Budějovicích, Biologické centrum Akademie věd, v.v.i. (PaU). Myším bylo pipetou orálně aplikováno inokulum o koncentraci 1 000 000 oocyst nebo ekvivalentně 4 000 000 sporozoitů. Z odebíraného trusu byly poté dělány nátěry, fixovány v plamenu a barveny pomocí metody Miláčka a Vítovce (1985) (3.2.10).

3.1.2 Zdroj oocyst

Pro experiment byly použity oocysty *C. proliferans* – izolát TS03, získaný původně z hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*). Izolát je dlouhodobě udržován v imunodeficitních SCID myších.

Získané oocysty z trusu SCID myší byly přečištěny na sacharózovém gradientu (Arrowood a Stearling, 1987) a následně na cesium chloridovém gradientu (Arrowood a Donaldson, 1996), poté byly použity pro experiment.

3.1.3 Příprava roztoků o různém pH

Pomocí pracovního 1× PBS, 1M HCl, 1M NaOH a pH metru byly připraveny roztoky o různém pH v rozmezí 2–7.

3.2 Metodika

3.2.1 Purifikace oocyst

Vzorek trusu pozitivní na kryptosporidie homogenizovat v třecí misce, přečistit na sacharózovém gradientu a dočistit za pomoci cesium chloridového gradientu. Uchovávat v deionizované vodě či v PBS, což je neutrální pufovaný fyziologický roztok používaný ke stabilizaci pH.

Níže uvedené metody již byly metodicky zvládnuty a použity v mé bakalářské práci, z tohoto důvodu používám částečně upravenou metodiku i ve své navazující diplomové práci (Schulzová, 2020).

3.2.2 Čištění oocyst na sacharózovém gradientu

Příprava roztoků:

- Sheaterův roztok: 259 ml deionizované vody + 405 g cukru + 7,29 g fenolu
- PBS Tween: do 1 litru PBS přidat 0,5 ml Tween 20

-
- Pracovní Sheaterův roztok: 1:2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween); 1:4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

Postup:

- Trus homogenizovat ve třecí misce a zbavit ho větších příměsí (přes sítko).
- Do skleněných zkumavek navrstvit gradient (plastovou pasterkou) – 1. vrstva 30 ml Sheater 1:2, 2. vrstva 30 ml Sheater 1:4, 3. vrstva 15 ml vzorku trusu.
- Centrifugovat 20 minut při 1370 *g*.
- Horní zbarvenou vrstvu odsát vodní vývěvou a obsah zkumavek přenést do čistých zkumavek.
- Objem zkumavek doplnit PBS (0,025 M; pH 7,2) a centrifugovat 20 minut při 1370 *g*.
- Vodní vývěvou odsát obsah zkumavek na ½ a poté doplnit PBS a centrifugovat 20 minut při 1370 *g* (tento krok provést 2×).
- Sedimenty přenést do jedné sběrné zkumavky a uchovávat při 4 °C s přidávkem antibiotik.

3.2.3 Čištění oocyst na cesium chloridovém gradientu

Chemikálie: roztok cesium chloridu (CsCl; 1,15 g/ml), PBS (0,025 M; pH 7,2)

Postup:

- Do mikrozkušavky napipetovat 1 ml CsCl.
- Na roztok CsCl navrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
- Centrifugovat při 20 °C po dobu 3 minuty při 14000 *g*.
- Přepipetovat supernatant do 50 ml zkumavek a zbylý sediment vyhodit.
- Zkušavku doplnit deionizovanou vodou, centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 *g*.
- Vodní vývěvou odsát supernatant na objem 5 ml.
- Doplnit zkušavku deionizovanou vodou, vortexovat, centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 *g* (tento proces opakovat 3×).
- Oocysty uchovávat v deionizované vodě při 4–8 °C.

3.2.4 Skladování oocyst

Použité oocysty byly skladovány v deionizované vodě při 4 °C, oocysty nebyly starší než 4 týdny.

3.2.5 Testování životaschopnosti

Životaschopnost oocyst byla stanovena barvením pomocí propidium jodidu (PI). Barvivo PI proniká přes narušenou cytoplazmatickou membránu, a proto se využívá pro vizualizaci mrtvých oocyst, které svítí jasně červeně. Vlnová délka excitace pro PI je 536 nm a vlnová délka emise je 617 nm.

Pracovní roztok: Propidium iodide (PI) – rozpustit 1 mg PI v 50 ml PBS

- $0,5 \times 10^6$ oocyst ve 435 μ l dH₂O
- Připipetovat 15 μ l pracovního roztoku PI.
- Nechat inkubovat v temnu minimálně 15 minut.
- Do měření na průtokovém cytometru uchovávat v temnu a na ledu.
- Jako kontrola byly použity devitalizované oocysty, čehož bylo dosaženo jejich poškozením po dobu alespoň 10 minut.

3.2.6 Testování vlivu teploty

Za pomoci vodní lázně a průtokového cytometru (BD FACSCanto II, BD Biosciences, USA) bylo zjišťováno, jaké množství oocyst excystuje při různých teplotách (32–44 °C). Na každou teplotu bylo provedeno 20 měření (5 vzorků po 5, 15 a 30 minutách inkubace ve vodní lázni + 5 vzorků jako kontrola). Každý měřený vzorek obsahoval 450 μ l roztoku s oocystami o koncentraci 500 000 oocyst a 50 μ l referenčních fluorescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, USA), jako medium byla použita dH₂O. Principem průtokové cytometrie je průchod buněk nebo částic v unášejícím médiu procházejícím měřícím přístrojem – průtokovým cytometrem. Bylo zjišťováno procento excystovaných oocyst v porovnání s kontrolou. Získané hodnoty byly zapisovány do tabulek.

3.2.7 Testování vlivu pH

Za pomoci roztoků o různém pH (pH 2 – pH 7) bylo zjišťováno, jaké množství oocyst excystuje při různém pH prostředí. Oocysty kryptosporidií byly nejprve vloženy ve zkumavkách do vodní lázně při 38 °C – teplota těla původního hostitele (na příslušnou hodnotu pH bylo vždy 20 měření – 5 vzorků po 5, 15 a 30 minutách inkubace ve vodní lázni + 5 vzorků jako kontrola). Každá zkumavka obsahovala 500 000 přečištěných oocyst ve 450 μ l roztoku o různém pH. Po inkubaci bylo do zkumavky přidáno 50 μ l referenčních fluorescenčních kuliček (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter,

USA) a vzorky byly změřeny průtokovým cytometrem. Bylo zjišťováno procento excystovaných oocyst v porovnání s kontrolou. Získané hodnoty byly zapisovány do tabulek.

3.2.8 Infektivita nevyexcystovaných oocyst

Jak v prvním (3.2.6), tak v druhém (3.2.7) experimentu jsme prokázali, že nedochází k excystaci určitého procenta oocyst. Na základě výše uvedených zjištění byly provedeny experimenty ověřující infektivitu oocyst, které nevyexcystovaly po vystavení optimální teplotě pro excystaci (38 °C). Nevyexcystované oocysty byly rozděleny do dvou skupin. Skupina 1 byla vystavena účinku koncentrovaného roztoku SAVA za účelem devitalizace vyexcystovaných sporozoitů, skupina 2 byla ponechána dva dny při laboratorní teplotě (samovolná devitalizace sporozoitů). Jako kontrolní skupiny sloužily skupina 3 – čisté infekční oocysty, skupina 4 – vyexcystovaní sporozoiti, skupina 5 – vyexcystovaní sporozoiti po devitalizaci SAVEM a skupina 6 – vyexcystovaní sporozoiti ponechání dva dny při laboratorní teplotě. Každou skupinou oocyst/sporozoitů byly infikovány vždy tři osmitýdenní SCID myši, a to v dávce 1 000 000 oocyst nebo ekvivalentem 4 000 000 sporozoitů na jedno zvíře.

3.2.9 Infektivita žaludečních kryptosporidií nevytloučených z hostitele

Dalším experimentem, který byl proveden, bylo ověření infektivy oocyst procházejících zažívacím traktem hostitele. Účelem bylo získat dostatečné množství oocyst z různých částí těla infikovaného jedince.

Z laboratorní SCID myši, která byla infikována *C. proliferans* a kontinuálně vylučovala oocysty, byly odebrány vzorky obsahu žaludku, tenkého, slepého a tlustého střeva a konečníku. Vzorky byly odebírány při teplotě 38 °C a bezprostředně po odebrání umístěny do dH₂O o teplotě 38 °C a použity k inokulaci myši pro ověření infektivy. Každá pokusná skupina byla složena ze tří osmitýdenních SCID myši.

3.2.10 Ověření identity používaného izolátu

Barvení oocyst dle Miláčka a Vítovce (Miláček a Vítovec, 1985)

Chemikálie: methanol, roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml alkoholu-ethanolu, 70 ml deionizované vody), 2% kyselina sírová, 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

Postup:

- Podložní sklíčko s nátěrem trusu ponořit do methanolu a ihned ho zafixovat v plameni.

-
- Sklíčko vložit do stojánku a vnořit do roztoku methylvioleti na 30 minut.
 - Opláchnout stojánek pod tekoucí vodou a vložit do 2% kyseliny sírové, diferencovat 2 minuty.
 - Opláchnout pod tekoucí vodou a vložit do roztoku tartrazinu na 3–5 minut.
 - Opláchnout pod tekoucí vodou a dát sušit.
 - Prohlížet nátěr světelným mikroskopem při 1000-násobném zvětšení, za použití imerzního oleje.

Izolace DNA z trusu

Extrakce DNA z trusu byla provedena pomocí komerčního kitu GeneAll® Exgene™ Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology, co., Ltd., Soul, Jižní Korea).

Postup:

- Vzorek trusu (200 mg) dát do Safe-Lock Tube, přidat skleněné a zirkonové kuličky a napipetovat 1–1,3 ml FL pufru, homogenizovat vortexováním a rozbít v přístroji FastPrep®24 (MP Biomedicals, CA, USA) 1 minutu při 5,5 m/s.
- Inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě, centrifugovat 5 minut při 16000 *g*.
- Přepipetovat veškerý supernatant na EzPass kolonku (bílá kolonka).
- Centrifugovat 1 minutu při 16000 *g*, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Na kolonku napipetovat 100 µl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 16000 *g*.
- Vyhodit bílou kolonku a připipetovat 500 µl PB pufru do sběrné zkumavky, promíchat pipetováním.
- Všechn obsah sběrné zkumavky přenést na mini spin column (zelená kolonka).
- Centrifugovat 1 minutu při 16000 *g*, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Napipetovat 500 µl NW pufru na střed kolony.
- Centrifugovat 1 minutu při 16000 *g*, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Opět centrifugovat 1 minutu při 16000 *g*, odstranit zbytky pufru, přenést kolonku na čistou eppendorfku.
- Napipetovat 200 µl EB pufru na kolonku, inkubovat 1 minutu, centrifugovat 1 minutu při 16000 *g*.
- Purifikovanou DNA uchovávat při -20 °C před použitím metody PCR.

Polymerázová řetězová reakce – PCR

Byl použit nested PCR protokol pro amplifikaci částečné oblasti genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU; Xiao et al., 1999).

Set primerů pro primární reakci:

F1 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'

R1 5'-CCCATTTCCTTCAAACAGGA-3'

Set primerů pro sekundární reakci:

F2 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

R2 5'-AAGGAGCAACACACACAC-3'

Gelová elektroforéza

Chemikálie: TAE pufr, agaróza, ethidium-bromid (EtBr), 100 bp DNA Ladder

Postup:

- V baňce smíchat TAE pufr s naváženou agarózou a vložit do mikrovlnné trouby, dokud nevznikne homogenní směs.
nosič malý: 0,4 g / 40 ml TAE pufr
nosič střední: 0,8 g / 80 ml TAE pufr
nosič velký: 1,2g / 120 ml TAE pufr
- Ochladit pod tekoucí vodou, přidat 1 µl EtBr a opatrně promíchat.
- Vylít obsah baňky do připraveného nosiče, použít vhodný hřeben a nechat ztuhnout (15–20 minut).
- Vyjmout hřeben a vložit gel do elektroforetické vany s TAE pufrem.
- Do první jamky nanést 10 µl ladderu, do dalších jamek 20 µl sekundárních PCR produktů.
- Nechat gel vyvíjet, aby došlo k separaci fragmentů DNA.
- Po skončení procesu (20–30 minut) vizualizovat UV transiluminátorem.

Izolace z gelu

Fragmenty DNA byly vyizolovány pomocí komerčního kitu Gen Elute (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Postup:

- Skalpelem vyříznout z gelu fragmenty DNA a vložit je do 1,5 ml mikrozkušavky.
- Do zkumavky s fragmentem gelu připipetovat 500 µl Gel Solubilization Solution (na 100 mg gelu 300 µl).

-
- Inkubovat 10 minut při 50 °C, kontrolovat rozpouštění a promíchat každé 2–3 minuty.
 - Dát inkubovat PCR vodu na eluci na 65 °C.
 - Sestavit Binding Column G, napipetovat 500 µl Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 16000 *g*.
 - Připipetovat ke vzorku 150 µl isopropanolu a promíchat.
 - Přepipetovat veškerý objem vzorku na kolonku (Binding Column G) a centrifugovat 1 minutu při 16000 *g*, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
 - Připipetovat 700 µl Wash Solution G a centrifugovat 1 minutu při 16000 *g*.
 - Vylít odpad ze sběrné zkumavky a centrifugovat 1 minutu při 16000 *g*.
 - Otočit zkumavku v centrifuze o 180° a centrifugovat znovu 3 minuty.
 - Vložit kolonku do nové 1,5 ml zkumavky a provést eluci napipetováním 30 µl PCR vody předeřáté na 65 °C přímo na střed kolony.
 - Inkubovat 1 minutu a poté centrifugovat 1 minutu při 16000 *g*.

Sekvenování a genotypizace

Purifikované sekundární produkty byly sekvenovány v obou směrech pomocí sekundárních PCR primerů v komerční společnosti (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Německo). Sekvence získané ve studii byly porovnány se sekvencemi v GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

4 Výsledky

Předpokusy provedené před započítáním práce prokázaly, že stáří oocyst má zásadní vliv na počet excystovaných oocyst (data nejsou součástí práce). Se zvyšujícím se stářím oocyst se snižuje procento úspěšně excystovaných oocyst. Z těchto důvodů byly pro experimenty použity oocysty mladší jednoho měsíce.

4.1 Testování vlivu teploty

Experimenty sledující vliv teploty na excystaci ukázaly, že do teploty 33 °C excystuje méně než 20 % oocyst. Při teplotách 34–35 °C dochází k excystaci přibližně až jedné poloviny oocyst. S rostoucí teplotou a přibývajícím časem dochází ke zvyšování procenta excystovaných oocyst až do teploty 40 °C. Další zvyšování teploty nemá vliv na počet excystovaných oocyst (Tabulka 2).

Tabulka 2 – Vliv teploty na excystaci oocyst *Cryptosporidium proliferans*. Výsledky ukazují průměrné procento excystovaných oocyst po odečtení mrtvých oocyst (1,6 %). 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	2	11	16
33 °C	9	12	18
34 °C	15	36	45
35 °C	37	57	60
36 °C	67	76	80
37 °C	78	83	84
38 °C	78	82	84
39 °C	86	86	86
40 °C	87	88	88
41 °C	86	88	88
42 °C	87	88	89
43 °C	88	88	89
44 °C	87	88	88

4.2 Testování vlivu pH

Experimenty sledující vliv pH na excystaci ukázaly, že při pH 2 a pH 3 excystuje méně jak 75 % oocyst. Při vyšších hodnotách pH dochází k excystaci přibližně 85 % oocyst, přičemž se míra excystovaných oocyst zvyšuje s rostoucím časem inkubace oocyst ve vodní lázni. Nejvyššího procenta excystovaných oocyst jsme docílili u pH 7 a 8, kdy excystovalo 86 % oocyst. Naopak nejnižší procento jsme naměřili u pH 2, kdy došlo k excystaci přibližně jen u 65 % oocyst (Tabulka 3).

Tabulka 3 – Vliv pH prostředí na excystaci oocyst *Cryptosporidium proliferans* při teplotě těla původního hostitele (38 °C). Výsledky ukazují procento excystovaných oocyst po odečtení mrtvých oocyst (1 %). Výsledná hodnota vyjadřuje průměr z pěti na sobě nezávislých měření.

Hodnota pH/teplotní podmínky	Čas expozice (minuty)		
	5	15	30
Kontrola pH 7 / 4 °C	0	0	0
pH 2 / 38 °C	60	66	67
pH 3 / 38 °C	69	71	74
pH 4 / 38 °C	78	80	82
pH 5 / 38 °C	77	78	84
pH 6 / 38 °C	77	79	84
pH 7 / 38 °C	81	83	86
pH 8 / 38 °C	82	85	86

4.3 Infektivita nevyexcystovaných oocyst

Vzhledem k tomu, že volní, infekční sporozoiti žaludečních kryptosporidií mohou přežívat v obsahu žaludku a vyvolat tedy infekci, provedli jsme devitalizaci vyexcystovaných sporozoitů. Experimentální infekce prokázaly, že excystovaní sporozoiti vystavení účinkům SAVA nebo ponechaní v laboratorní teplotě po dobu 2 dnů ztrácejí svou infektivitu a nejsou pro hostitele infekční (Tabulka 4). Výsledky infekčních experimentů s oocystami, které po vystavení excystační teplotě neexcystovaly, prokázaly, že jsou plně infekční pro hostitele (Tabulka 4).

Tabulka 4 – Infektivita oocyst a sporozoitů *Cryptosporidium proliferans* pro imunodeficitní SCID myši (modelové hostitele).

Skupina	Infektivita pro hostitele
1. Nevyexcystované oocysty po excystaci + SAVO	ANO
2. Nevyexcystované oocysty po excystaci + 2 dny v lab. teplotě	ANO
3. Infekční oocysty	ANO
4. Infekční sporozoiti	ANO
5. Infekční sporozoiti + SAVO	NE
6. Infekční sporozoiti + 2 dny v lab. teplotě	NE

4.4 Infektivita žaludečních kryptosporidií nevytloučených z hostitele

Výsledky pokusu ukázaly, že oocysty *C. proliferans* z různých částí zažívacího traktu jsou infekční pro dalšího hostitele (Tabulka 5), aniž by muselo dojít k procesu zchlazení. Lze přepokládat, že za vyvolanou infekci by mohly zodpovídat oocysty, které neexcystují pouze vlivem teploty.

Tabulka 5 – Infektivita oocyst *Cryptosporidium proliferans* z různých částí zažívacího traktu infikované imunodeficitní SCID myši pro naivní SCID myši.

Původ oocyst	Infektivita pro SCID myši		
	1	2	3
Žaludek	ANO	ANO	ANO
Tenké střevo	ANO	ANO	ANO
Slepé střevo	ANO	ANO	ANO
Tlusté střevo	ANO	ANO	ANO
Konečník	ANO	ANO	ANO
Kontrola – oocysty po vyloučení	ANO	ANO	ANO

5 Diskuse

Uvolňování sporozoitů z oocyst je extrémně rychlý proces, který se podobá vystřelování sporozoitů ze sutury ve stěně oocysty. Je známo, že nejvýznamnějšími excystačními faktory jsou vhodné pH a teplota. Ty modifikují propustnost stěny oocysty (Matsubayashi et al., 2011; Jenkins et al., 2003; Robertson et al., 1993). Mohou tak zvýšit tlak uvnitř oocysty absorbováním tekutin přes propustnou stěnu oocysty (nejpravděpodobněji přes suturu) do zvětšujícího se zbytkového tělíska. Následně nadměrný tlak v oocystě vede k výstřelovému uvolňování sporozoitů do okolního prostředí. Podmínky excystace se u jednotlivých druhů patogenů liší tak, aby došlo k maximalizaci infekce. Metody používané pro *in vitro* excystace tak imitují přirozené podmínky v hostiteli.

Většina dosud publikovaných studií se týká excystace střevních druhů kryptosporidií, zatímco žaludeční druhy jsou opomíjeny. Pecková et al. (2016) ve své studii srovnávali různé metody excystace střevního druhu *C. parvum* a zjistili, že nejúčinnější z používaných metod byly ty, které popsali Rasmussen et al. (1993), Petry a Harris (1999) a Mead et al. (1990). Společným jmenovatelem všech těchto metod je zařazení předinkubačního kroku – ošetření oocyst chlornanem sodným. Výsledky studie Woodmansee (1987) potvrzují, že bělení chlornanem sodným zvyšuje rychlost excystace. Je to pravděpodobně proto, že ošetření takovým roztokem má za následek ztenčení a perforaci vnější a vnitřní vrstvy stěny oocysty. Zároveň vystavuje receptory umístěné v různých úrovních stěny oocysty, které vyžadují stimulaci kyselinou chlorovodíkovou a žlučí, než se naskytne vhodný hostitel (Smith et al., 2005). Bělidlo může také sloužit k další sanitaci vzorku oocyst, aby se zabránilo nežádoucí mikrobiální kontaminaci buněčné kultury (Arrowood, 2002). Také výsledky studie Kar et al. (2011) docházejí k závěru, že u mladých oocyst (3 měsíční) předúprava za pomoci NaClO zvyšuje rychlost excystace. Opačné výsledky uvádí Gold et al. (2001), kteří testovali vliv žlučové soli (taurocholát sodný) v inkubačním médiu na rychlost excystace s použitím jak bělených, tak nebělených oocyst. Došli k závěru, že bělení nezvýšilo rychlost excystace druhu *C. parvum*. V případě žaludečních kryptosporidií nemá ošetření oocyst chlornanem sodným zásadní vliv na excystaci. Widmer et al. (2007) uvádí, že oocysty *C. andersoni* excystují samovolně při teplotě 37 °C, což je v souladu s našimi výsledky. Nicméně jako první jsme prokázali, že žaludeční kryptosporidie parazitující u hlodavců mají optimální teplotu excystace na hodnotě 38 °C.

Zvyšováním teploty nad 40 °C již nedochází ke zvýšení procenta excystovaných oocyst. Zatímco žaludeční druhy si zjevně vyvinuly metody k zabránění excystace u stejného hostitele, střevní druhy čelí výzvě, jak zabránit předčasnému uvolnění sporozoitů po příjmu novým hostitelem, protože excystace v žaludku by s největší pravděpodobností vedla k okamžité inaktivaci sporozoitů. Kolísání teploty během čištění a zejména během různých kroků odstředování by mohlo být dostatečné k zahájení excystace. Dokazuje to přítomnost prázdných obalů oocyst u vzorků, které nebyly inkubovány při 37 °C.

Matsubayashi et al. (2011) zkoumali morfologické změny a hodnotili životaschopnost sporozoitů *C. andersoni* po excystaci v médiu RPMI. Sporozoiti postupně, nikoli však rychle, měnily svůj podlouhlý tvar na zaoblený, jako *C. parvum*. Životaschopnost sporozoitů zůstala po 3 hodinách inkubace na 90,6 % ve srovnání s 56 % u *C. parvum* (Matsubayashi et al., 2010). Tyto výsledky naznačují, že je *C. andersoni* odolnější vůči kyselému prostředí a může mít tak delší životnost po excystaci *in vitro*. Dále vystavili sporozoity *C. andersoni* nízkému pH – pH ve slezu u skotu je stejné jako v žaludku u myši – přibližně 2,0 (Moran, 2005). V důsledku sníženého pH se životaschopnost sporozoitů *C. andersoni* postupně snižovala, což je v souladu se zjištěním, že *C. muris*, žaludeční druh, je také usmrcován při pH 2,0 (životaschopnost 23,2 %) (Brown et al., 1996). Naše výsledky ukázaly, že při pH 2 dochází k nízké míře excystace – pouze 65 % oocyst, oproti pH 7, kdy excystovalo až 86 % oocyst. Ve výsledcích našich experimentálních infekcí jsme také prokázali, že je možné nainfikovat hostitele volnými, vyexcystovanými sporozoity *C. proliferans*. Sporozoiti *C. proliferans* tedy přežívají nízké pH v žaludku myši. Dále jsme prokázali, že sporozoiti dlouhodobě nepřežívají a po vyčerpání energetických zásob dochází k jejich devitalizaci (po 48 hodinách při teplotách okolo 20 °C).

Životaschopnost kryptosporidiových oocyst je ovlivněna biotickými a abiotickými faktory, jako je stáří oocyst, teplota, postup čištění, doba skladování nebo chemické složení médií (Fayer et al., 1998a, Fayer et al., 1998b; Hijjawi, 2003; Jenkins et al., 2003; Kar et al., 2011; Reduker et al., 1985; Reinoso et al., 2008; Robertson et al., 1992), což potvrzují i výsledky této práce. Zatímco některé studie tvrdí, že životaschopnost oocyst lze udržet ve vhodných podmínkách po dobu 6 měsíců (Fayer et al., 1998a; Fayer et al., 1998b), jiné doporučují pracovat s oocystami mladšími než 3 měsíce (Kar et al., 2011). Výsledky této práce ukázaly, že optimální je pracovat s oocystami mladšími 1 měsíce. Podle našich poznatků lze usoudit, že pro úspěšné *in vitro*

experimenty s druhem *C. proliferans* není prodloužené skladování oocyst přijatelné. V naší studii jsme nepracovali s oocystami staršími 4 týdnů. U oocyst mladších 4 týdnů jsme při optimální excystaci detekovali více než 90 % excystovaných oocyst, zatímco u oocyst starších 3 měsíců byl zaznamenán významný pokles excystovaných oocyst. Tyto výsledky odpovídají i studii provedené Kváčem et al. (2007), která prokázala, že oocysty *C. andersoni* ztrácí svou infekce schopnost po 6 měsících skladování při teplotě 4 °C. Dle Melicherové et al. (2016) snížily oocysty *C. muris* uchovávané v PBS svou životaschopnost o 20 %, a to za dobu skladování 4 měsíců. Jenkins et al. (2003) zaznamenali 50% pokles úspěšnosti excystace po 3 měsících skladování oocyst, zatímco oocysty staré 9 měsíců byly neživotaschopné. Melicherová et al. (2016) uvádí, že testování životaschopnosti oocyst *C. muris* pomocí fluorescenčního dvojitého PI/FDA barvení je obecně považováno za standardní postup před experimentální prací (Jones a Senft, 1985). Tato tvrzení jsou v rozporu s výsledky Widmera et al. (2007), kteří nepřikládají těmto faktorům nijak zvlášť velký význam. Jako médium jsme použili deionizovanou vodu, Melicherová et al. (2016) však tvrdí, že pro *in vitro* kultivaci různých buněčných kultur a jednobuněčných parazitů je nejlepší použít RPMI 1640 společně s BSA, kvůli jejich stimulačnímu účinku na motilitu sporozoitů (Smith et al., 2005; Widmer et al., 2007; Galvani et al., 2007; Harrison et al., 1982). Doporučená koncentrace BSA je 5 %, při vyšším procentu by mohlo dojít k poškození oocyst vlivem velké hustoty média a tak ke znemožnění excystace.

Je však důležité zmínit, že Boyd et al. (2008) zkoumali integritu membrány a životaschopnost buněk pomocí barvení FDA/PI a tvrdili, že toto testování životaschopnosti závisí na řadě dalších faktorů (účinek ředidla FDA nebo doba trvání samotného postupu barvení). Smith a Smith (1989) pozorovali, že některé oocysty nelze obarvit ani pomocí FDA, ani PI. Kváč et al. (2007) popsali, že oocysty skladované v dichromanu draselném se po delší době skladování omezeně barví pomocí PI. Z těchto důvodů jsme v naší práci použili oocysty skladované pouze v deionizované vodě a životaschopnost oocyst byla testována barvením PI.

Trypsin, serinová proteáza, nacházející se v duodenu, je běžně používán mnoha výzkumníky v protokolech *in vitro* excystace k napodobení prostředí duodena (Mead et al., 1990; Black et al., 1996; Rennecker et al., 1999; Rasmussen et al., 1993). Pecková et al. (2016) ve své studii nezjistili žádný vliv přítomnosti trypsinu na excystaci střevních kryptosporidií, což je v souladu s výsledky Woodmansee (1987), který zjistil, že trypsin je pro excystaci nepotřebný a má při vyšší koncentraci dokonce inhibiční

účinky. Použití trypsinu nemá rovněž žádný vliv na excystaci žaludečních kryptosporidií. Také Robertson et al. (1993) potvrdili výsledky, že použití trypsinu nezvyšuje počet excystovaných oocyst, ale zvyšuje translucenci (průsvitnost) intaktních oocyst a také motilitu excystovaných i neexcystovaných sporozoitů. V souladu s těmito výsledky jsou i závěry našich experimentů. Oocysty *C. proliferans* procházející zažívacím traktem hostitele po dobu několika hodin jsou nevnímavé k podmínkám okolního prostředí a neexcystují, nicméně si zachovávají plnou infekce schopnost.

Tzipori (1983) vyzníval, že excystace kryptosporidií druhu *C. parvum* nastává krátce po vystavení vzduchu, pravděpodobně stimulovanému vhodnou hladinou kyslíku a oxidu uhličitého. Avšak oproti tomu údaje ze studie Reduker a Speer (1985) naznačují, že expozice samotnému vzduchu má malý nebo žádný vliv na excystaci oocyst. V našich experimentech jsme dospěli k obdobnému závěru jako Reduker a Speer (1985). Oocysty nevystavené vzduchu (získané z různých částí zažívacího traktu infikovaného hostitele) byly stejně infekční pro hostitele, jako oocysty vystavené účinkům vnějšího prostředí. Naopak změna teploty měla výrazný vliv na procento excystace oocyst *C. proliferans*.

Závěr

- Optimální teplota pro excystaci oocyst *C. proliferans* je 38 °C.
- Zvyšování teploty nad 40 °C nemá vliv na excystaci.
- Sporozoiti *C. proliferans* přežívají nízké pH žaludku a jsou schopni vyvolat infekci u hostitele.
- Sporozoiti *C. proliferans* jsou bezprostředně devitalizováni účinkem 2,5% roztoku chlornanu sodného.
- Nově vzniklé oocysty *C. proliferans* jsou plně infekční pro hostitele ještě před opuštěním těla hostitele.
- pH prostředí ovlivňuje procento excystovaných oocyst.

Seznam použité literatury

- 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.
- Arrowood, M. J. a Donaldson, K. (1996). Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43(5):89S.
- Arrowood, M. J. (2002). *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3):390–400.
- Aydin, Y. a Özkul, I. A. (1996). Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Veterinary Parasitology*, 66(3-4):257–262.
- Bankier, A. T. et al. (2003). Integrated mapping, chromosomal sequencing and sequence analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Genome Research*, 13(8):1787–1799.
- Barbee, S. L. et al. (1999). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. *Gastrointestinal Endoscopy*, 49(5):605–611.
- Baskin, G. B. (1996). *Cryptosporidium* of the conjunctiva in SIV-infected rhesus monkeys. *The Journal of Parasitology*, 82(4):630–632.
- Black, E. K. et al. (1996). Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. *FEMS Microbiology Letters*, 135(2-3):187–189.
- Bolland, S. J. et al. (2020). *Cryptosporidium bollandi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from angelfish (*Pterophyllum scalare*) and Oscar fish (*Astronotus ocellatus*). *Experimental Parasitology*, 217:107956.
- Boyd, V. et al. (2008) Limitations in the use of fluorescein diacetate/propidium iodide (FDA/PI) and cell permeable nucleic acid stains for viability measurements of isolated islets of Langerhans. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2(2):66–84.
- Brown, S. M. et al. (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*, 142:203–208.
- Cacció, S. M. (2005). Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parasitologia*. 47(2):185–192.
-

-
- Current, W. L. a Reese, N. C. (1986). A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of Protozoology*, 33(1):98–108.
- Current, W. L. et al. (1986). The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology*, 33(2):289–296.
- Current, W. L. a Reese, N. C. (1987). A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of Protozoology*, 33(1):98–108.
- Current, W. L. a Garcia, L. S. (1991). Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3):325–358.
- Curtiss, J. B. et al. (2015). Renal and cloacal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* avian genotype V) in a major mitchell's cockatoo (*Lophochroa leadbeateri*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(4):934–937.
- Dillingham, R. A. et al. (2002). Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 4(10):1059–1066.
- DuPont, H. L. et al. (1995). The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *The New England Journal of Medicine*, 332(13):855–859.
- Ebeid, M. et al. (2003). Infectivity of *Cryptosporidium parvum* genotype I in conventionally reared piglets and lambs. *Parasitology Research*, 90(3):232–235.
- El-Alfy, E. S. a Nishikawa, Y. (2020). *Cryptosporidium* species and cryptosporidiosis in Japan: a literature review and insights into the role played by animals in its transmission. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 82(8):1051–1067.
- Enemark, H. L. et al. (2003). *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the “porcine” genotype. *Parasitology*, 126(Pt 5):407–416.
- Fayer, R. a Leek, R. G. (1984). The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on *in vitro* excystation of *Cryptosporidium*. *The Journal of Protozoology*, 31(4):567–569.
- Fayer, R. a Ungar, B. L. P. (1986). *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, 50(4):458–483.
- Fayer, R. et al. (1990). Immunotherapeutic efficacy of bovine colostrum immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infection and Immunity*, 58(9):2962–2965.
-

-
- Fayer, R. et al. (1991). Chronic cryptosporidiosis in a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22(2):228–232.
- Fayer, R. (1995). Effect of sodium hypochlorite exposure on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts for neonatal BALB/c mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2):844–846.
- Fayer, R. et al. (1996). Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43(5):64S.
- Fayer, R. (1997). The general biology of *Cryptosporidium*. *CRC Press*, 12:1–41.
- Fayer, R. et al. (1998a). Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3):1070–1074.
- Fayer, R. et al. (1998b). Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *The Journal of Parasitology*, 84(6):1165–1169.
- Fayer, R. et al. (2001). *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *The Journal of Parasitology*, 87(6):1415–1422.
- Fayer, R. (2003). *Cryptosporidium*: From molecules to disease. In: Thompson R.C.A., Armson A., Ryan U.M. (Eds.): *Cryptosporidium*: From molecules to disease. *Elsevier*. pp. 11–18.
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126(1-2), 37–56.
- Fayer, R. et al. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Parasitology*, 91(3), 624–629.
- Fayer, R. a Xiao, L. (2007). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *CRC Press*, New York, 560 pp.
- Fayer, R. a Xiao, L. (2008). The general biology of *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis *CRC Press*, Boca Raton, FL. 1–42.
- Fayer, R. et al. (2008). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156(3-4):191–198.
- Fayer, R. et al. (2010). *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, 172(1-2):23–32.
- Flanigan, T. P. a Soave, R. (1993). "Cryptosporidiosis." *Progress in Clinical Parasitology*, 3:1–20.
- Feng, Y. et al. (2018). Genetic diversity and population structure of *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology*, 34(11):997–1011.
-

-
- Fleta, J. et al. (1995). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extraintestinal tissues of sheep and pigs. *Veterinary Parasitology*, 59(3-4):201–205.
- Fujino, T. et al. (2002). The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64(3):199–200.
- Gait, R. et al. (2008). Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. *The Veterinary Record*, 162(26):843–845.
- Galvani, C. D. et al. (2007). Twitching motility among pathogenic *Xylella fastidiosa* isolates and the influence of bovine serum albumin on twitching-dependent colony fringe morphology. *FEMS Microbiology Letters*, 268(2):202–208.
- Giles, M. et al. (2001). Experimental infection of a lamb with *Cryptosporidium parvum* genotype I. *The Veterinary Record*, 149(17):523–525.
- Ghazy, A. A. et al. (2015). Cryptosporidiosis in animals and man: 1. Taxonomic classification, life cycle, epidemiology and zoonotic importance. *Asian Journal of Epidemiology* 8:48–63.
- Gold, D. et al (2001). The utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium parvum* and infection of tissue culture. *The Journal of Parasitology*, 87(5):997–1000.
- Griffiths, J. K. et al. (1998). Paromomycin and genecitin inhibit intracellular *C. parvum* without trafficking through the host cell cytoplasm: implications for drug delivery. *Infection and Immunity*, 66(8), 3874–3883.
- Gut, J. a Nelson, R. G. (1999). *Cryptosporidium parvum*: synchronized excystation in vitro and evaluation of sporozoite infectivity with a new lectin-based assay. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(5):56–57.
- Harris, J. R. a Petry, F. (1999). *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. *The Journal of Parasitology*, 85(5):839–849.
- Harrison, R. A. et al. (1982). Bovine serum albumin, sperm motility, and the 'dilution effect'. *The Journal of Experimental Zoology*, 222(1):81–88.
- Hijjawi, N. (2003). *In vitro* cultivation and development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Cryptosporidium*, 233–253.
- Holubová, N. et al. (2016). *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitology Research*, 115(6):2243–2251.
- Holubová, N. et al. (2019). *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *European Journal of Protistology* 69:70–87.
-

-
- Holubová, N. et al. (2020). Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. *Parasites & Vectors*, 13(1):340.
- Hornok, S. et al. (1999). Study on the course of *Cryptosporidium baileyi* infection in chickens treated with interleukin-1 or indomethacin. *Acta Veterinaria Hungarica*, 47: 207–216.
- Horčíčková, M. et al. (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.
- Hůrková L. et al. (2003). Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Siberian chipmunks. *Journal of Wildlife Diseases*, 39:441–444.
- Chauret, C. P. et al. (2001). Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7): 2993–3001.
- Checkley, W. et al. (2015). A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(1):85–94.
- Iseki, M. (1986). Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Japanese Journal of Parasitology*, 35:521–526.
- Jenkins, M. et al. (2003). Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology Research*, 89(1):1–5.
- Ježková, J. et al. (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.
- Jirků, M. et al. (2008). New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*, 55(2):81–94.
- Jokipii, L. a Jokipii, A. M. (1986). “Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis.” *The New England Journal of Medicine*, 315(26):1643–1647.
- Jones, K.H. a Senft, J. A. (1985). An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: official Journal of the Histochemistry Society*, 33(1):77–79.
- Kahn, D. G. et al. (1987). Cryptosporidial and cytomegaloviral hepatitis and cholecystitis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 111(9):879–881.
-

-
- Kar, S. et al. (2011). *Cryptosporidium parvum* oocyst viability and behaviour of the residual body during the excystation process. *Parasitology Research*, 109(6):1719–1723.
- Katsumata, T. et al. (2000). Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(1):70–72.
- Korich, D. G. et al. (1990). Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(5):1423–1428.
- Kváč, M. et al. (2007). Viability staining and animal infectivity of *Cryptosporidium andersoni* oocysts after long-term storage. *Parasitology Research*, 100(2):213–217.
- Kváč, M., et al. (2007). Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology*, 143(3-4): 229–233.
- Kváč, M. et al. (2008). The role of CD8⁺ T-lymphocytes during gastric *Cryptosporidium muris* strain TS03 infection in mice. Abstract PO65. X International workshops on opportunistic protists (IWOP-10), Boston, Massachusetts, USA, pp. 90–91.
- Kváč, M. et al. (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. et al. (2013). The Lesser Egyptian Gerbil (*Gerbillus gerbillus*) is a suitable host for the long-term propagation of *Cryptosporidium andersoni*. *Experimental Parasitology*, 134(4):438–442.
- Kváč, M. et al. (2014). *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology*, 201(1-2):9–17.
- Kváč, M. et al (2016). *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLoS One*, 11(1):e0147090.
- Kváč, M. et al. (2018). *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *European Journal of Protistology*, 63:96–104.
- Levine, N. D. (1980). Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *The Journal of Parasitology*, 66(5):830–834.
- Levine, N. D. (1988). Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *The Journal of Protozoology*, 35(4):518–520.
- Li, N. et al. (2014). Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 20(2):217–224.
-

-
- Li, D. F. et al. (2021). Tandem mass tag (TMT)-based proteomic analysis of *Cryptosporidium andersoni* oocysts before and after excystation. *Parasites & Vectors*, 14(1):608.
- Lindsay, D. S. et al. (1987). Experimentally induced infections in turkeys with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 48(1):104–108.
- Lindsay, D. S. et al. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(1):91–95.
- Lupo, P. J. et al. (2008). *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(6):917–921.
- Maggi, P. et al. (2000). Effect of Antiretroviral Therapy on Cryptosporidiosis and Microsporidiosis in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 19(3):213–217.
- Matsubayashi, M. et al. (2010). Morphological changes and viability of *Cryptosporidium parvum* sporozoites after excystation in cell-free culture media. *Parasitology*, 137(13):1861–1866.
- Matsubayashi, M. et al. (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*, 41(3-4):287–292.
- Mead, J. R. et al. (1990). Identification of isolate-specific sporozoite proteins of *Cryptosporidium parvum* by two-dimensional gel electrophoresis. *Infection and Immunity*, 58(7):2071–2075.
- Melicherová, J. et al. (2014). Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology*, 141(2):287–303.
- Melicherová, J. et al. (2016). *In vitro* excystation of *Cryptosporidium muris* oocysts and viability of released sporozoites in different incubation media. *Parasitology Research*, 115(3):1113–1121.
- Melicherová, J. et al. (2018). Response of cell lines to actual and simulated inoculation with *Cryptosporidium proliferans*. *European Journal of Protistology*, 62:101–121.
- 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.
-

-
- Módelo, J. R. et al. (1994). The evaluation of the effect of formol and sodium hypochlorite on the demonstration of *Cryptosporidium* oocysts in feces by Heine's method. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27(2):75–77.
- Moran, J. (2005). Tropical dairy farming: feeding management for small holder dairy farmers in the humid tropics. *Landlinks Press*, Victoria, Australia, 295 pp.
- Morgan, U. M. et al. (2000). Detection of the *Cryptosporidium parvum* 'human' genotype in a dugong (*Dugong dugon*). *The Journal of Parasitology*, 86(6):1352–1354.
- Neumayerová, H. a Koudela, B. (2008). Effects of low and high temperatures on infectivity of *Cryptosporidium muris* oocysts suspended in water. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4):197–202.
- Nime, F. A. et al. (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70(4):592–598.
- O'Donoghue, P. J. (1995). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, 25(2):139–195.
- Okhuysen, P. C. a Chappell, C. L. (2002). *Cryptosporidium* virulence determinants – are we there yet? *International Journal for Parasitology*, 32(5):517–525.
- Panciera, R. J. et al. (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(2):95–101.
- Pavlásek, I. (1999). Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum specificity and the environment. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství*, 3:290–301.
- Pecková, R. et al. (2016). Statistical comparison of excystation methods in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Veterinary Parasitology*, 230:1–5.
- Petry, F. a Harris, J. R. (1999). Ultrastructure, fractionation and biochemical analysis of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *International Journal for Parasitology*, 29(8):1249–1260.
- Rasmussen, K. R. et al. (1993). Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. *Infection and Immunity*, 61(4):1482–1485.
- Rasmussen, K. R. et al. (1995). Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Parasitology*, 81(3):429–433.
-

-
- Reduker, D. W. a Speer, C. A. (1985). Factors influencing excystation in *Cryptosporidium* oocysts from cattle. *The Journal of Parasitology*, 71(1):112–115.
- Reinoso, R. et al. (2008). Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4):980–6.
- Ren, X. et al. (2012). *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, 130(3):274–281.
- Rennecker, J. L. et al. (1999). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone. *Water Research*, 33(11):2481–2488.
- Robertson, J. L. et al. (1992). Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied Environmental Microbiology*, 58(11):3494–500.
- Robertson, J. L. et al. (1993). *In vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, 106(Pt 1):13–19.
- Rossignol, J. F. et al. (2001). Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(1):103–106.
- Ryan, U. et al. (2015). *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*, 150:31–35.
- Santoro, A. et al. (2019). Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. in calves in Estonia: high prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding and 10 subtypes identified. *Parasitology*, 146(2):261–267.
- Silverlås, C. et al. (2012). Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. *International Journal for Parasitology*, 42(11):963–967.
- Siripanth, C. et al. (2004). Comparison of *Cryptosporidium parvum* development in various cell lines for screening in vitro drug testing. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35(3):540–546.
- Slavin, D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, 65(3):262–266.
- Smith, H. V. et al. (1988). The effect of free chlorine on the viability of *Cryptosporidium* spp. oocysts. *WRC Publication PRU 2023–M* Water Research Centre. Medmenham, Bucks, UK.
- Smith, A. L. a Smith, H. V. (1989) A comparison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and *in vitro* excystation for determining *Giardia intestinalis* cyst viability. *Parasitology*, 3:329–31.
-

-
- Smith, H. V. et al. (2005). *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, 21(3):133–142.
- Sparks, H. et al. (2015). Treatment of *Cryptosporidium*: What We Know, Gaps, and the Way Forward. *Current Tropical Medicine Reports*, 2(3):181–187.
- Sponseller, J. K. et al. (2014). The evolution of respiratory cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3):575–586.
- Schulzová, T. (2020). *Kuřecí embrya jako inkubátor pro pomnožení parazitů rodu Cryptosporidium*. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, zemědělská fakulta.
- Taylor, M. A. et al. (1999). The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. *Veterinary Parasitology*, 86(1):41–48.
- Theodos, C. M. et al. (1998). Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8):1959–1965.
- Thompson, R. C. A. et al. (2005). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 59:77–158.
- Trotz-Williams, L. A. et al. (2011). Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. *The Veterinary Record*, 168(19):509.
- 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.
- Tyzzer, E. E. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde*, 26:394–412.
- Tzipori, S. (1983). Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiological Reviews*, 47(1):84–96.
- Upton, S. J. a Current, W. L. (1985). The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *The Journal of Parasitology*, 71(5):625–629.
- Vetterling, J. M. et al. (1971). *Cryptosporidium wairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *The Journal of Protozoology*, 18(2):243–247.
-

-
- Wang, Y. et al. (2014). Population genetics of *Cryptosporidium meleagridis* in humans and birds: evidence for cross-species transmission. *International Journal for Parasitology*, 44(8):515–521.
- Wetzel, D. M. et al. (2005). Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infection and Immunity*, 73(9):5379–5387.
- White, A. C., Jr. et al. (1994). Paromomycin for cryptosporidiosis in AIDS: a prospective, double-blind trial. *The Journal of Infectious Diseases*, 170(2):419–424.
- Widmer, G. et al. (2007). Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology*, 134(11):1583–1588.
- Woodmansee, D. B. (1987). Studies of *in vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves. *The Journal of Protozoology*, 34(4):398–402.
- Xiao, L. et al. (1999). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4):1578–1583.
- Xiao, L. et al. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1):72–97.
- Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124(1):80–89.
- Xu, Z. et al. (2019). Comparative analysis reveals conservation in genome organization among intestinal *Cryptosporidium* species and sequence divergence in potential secreted pathogenesis determinants among major human-infecting species. *BMC genomics*, 20(1):406.
-

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Seznam platných druhů žaludečních kryptosporidií	12
Tabulka 2 – Vliv teploty na excystaci oocyst <i>Cryptosporidium proliferans</i> . Výsledky ukazují průměrné procento excystovaných oocyst po odečtení mrtvých oocyst (1,6 %). Výsledná hodnota vyjadřuje průměr z pěti na sobě nezávislých měření.	24
Tabulka 3 – Vliv pH prostředí na excystaci oocyst <i>Cryptosporidium proliferans</i> při teplotě těla původního hostitele (38 °C). Výsledky ukazují procento excystovaných oocyst po odečtení mrtvých oocyst (1 %). Výsledná hodnota vyjadřuje průměr z pěti na sobě nezávislých měření.....	25
Tabulka 4 – Infektivita oocyst a sporozoitů <i>Cryptosporidium proliferans</i> pro imunodeficitní SCID myši (modelové hostitele).	26
Tabulka 5 – Infektivita oocyst <i>Cryptosporidium proliferans</i> z různých částí zažívacího traktu infikované imunodeficitní SCID myši pro naivní SCID myši.....	26
