



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

Funkční a patologické změny žaludku hostitelů reinfikovaných
různými druhy a genotypy žaludečních kryptosporidií

Autorka práce: Bc. Marie Marková

Vedoucí práce: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Konzultant práce: doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.

České Budějovice
2024

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 16. dubna 2024

.....
Marie Marková

Abstrakt

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou intracelulární paraziti z kmene Apicomplexa, parazitující v gastrointestinálním traktu obratlovců. V rámci rodu rozdělujeme druhy do dvou skupin dle místa infekce, na střevní a žaludeční kryptosporidie. Infekce střevními druhy je spojována s vodnatým průjmem, zatímco infekce žaludečními druhy probíhá asymptomaticky. Dosud provedené studie však poukazují na histopatologické změny žaludeční tkáně během infekce těmito druhy. Tato práce se zaměřuje na vliv infekce a reinfekce *Cryptosporidium proliferans* a *Cryptosporidium muris* CAT21 na pH žaludečního obsahu a morfologické a patologické změny žaludeční sliznice u experimentálních mastomýši a myši kmenů BALB/c a C57Bl6. U myši BALB/c a C57Bl6 infikovaných *C. muris* CAT21 došlo ke zvýšení pH žaludku pouze po primární infekci, při reinfekci nebylo pozorováno zvýšení pH v žádném ze sledovaných dnů v průběhu experimentu. U obou skupin bylo při infekci zaznamenáno zvýšení sliznice, které následně u myši BALB/c při reinfekci nebylo tak markantní jako v případě primární infekce. U C57Bl6 myši došlo při reinfekci k mírnému zesílení sliznice, nicméně nebyl pozorován žádný významný vrchol a výška sliznice se udržovala na podobných hodnotách. Zánětlivé infiltráty se u BALB/c i C57Bl6 myši v tkáni objevily při infekci i reinfekci. Reinfekce *C. proliferans* vedla ke zvýšení pH žaludečního obsahu u BALB/c i C57Bl6 myši. Po reinfekci byly sice zaznamenány morfologické změny, to však v menším rozsahu. Výsledky naznačují, že reinfekce může ovlivnit imunitní odpověď a morfologii žaludku i různě výrazné změny v pH. Dále byl zkoumán vliv napájení okyselenou vodou na průběh infekce *C. proliferans*. Nebyly zjištěny významné rozdíly v průběhu infekce a v patologických změnách mezi skupinami mastomýši napájených okyselenou a kohoutkovou vodou a infikovanými *C. proliferans*.

Klíčová slova: hlodavci; žaludek; pH; patogenita; morfologické změny; infekce; reinfekce; *Cryptosporidium*

Abstract

Representatives of the genus *Cryptosporidium* are intracellular parasites from the phylum Apicomplexa that parasitise the gastrointestinal tract of vertebrates. Within the genus, the species are divided into two groups depending on the site of infection: intestinal and gastric cryptosporidia. Infection with intestinal species is associated with watery diarrhoea, while infection with gastric species is usually asymptomatic. However, studies have indicated histopathological changes in gastric tissue during infection with these species. This work focuses on the influence of infection and reinfection with *Cryptosporidium proliferans* and *Cryptosporidium muris* CAT21 on gastric pH, morphological and pathological changes of the gastric mucosa in experimental mastomys and the mouse strains BALB/c and C57Bl6. In mice infected with *C. muris* CAT21, an increase in stomach pH was observed only after the primary infection; during reinfection, no increase in pH was observed on any of the days observed. In both groups, an increase in mucosal thickness was observed during infection, but was not as pronounced in BALB/c mice during reinfection as during primary infection. In C57Bl6 mice, reinfection resulted in a slight thickening, but no significant peak was observed and mucosal thickness remained similar. Inflammatory infiltrates were present in the tissue of both BALB/c and C57Bl6 mice during both infection and reinfection. Reinfection with *C. proliferans* led to an increase in gastric pH in both BALB/c and C57Bl6 mice. Although morphological changes were observed after reinfection, they were less pronounced. The results indicate that reinfection can influence the immune response and gastric morphology, but does not cause significant changes in pH. In addition, the influence of acidic water administration on the course of *C. proliferans* infection was investigated. No significant differences in the course of infection and pathological changes were observed between groups of mastomys supplied with acidic and tap water and infected with *C. proliferans*.

Keywords: rodents; stomach; pH; pathogenicity; morphology changes; infection; reinfection; *Cryptosporidium*

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, podnětné rady a obdivuhodnou ochotu. Dále bych chtěla poděkovat konzultantům doc. Ing. Michaelu Rostovi, Ph.D. a doc. Ing. Romanu Konečnému, Ph.D. za pomoc při zpracování dat a histologických vzorků. Mé díky patří všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i za jejich přátelské jednání a čas, který mi při zpracovávání této práce věnovali, i mé rodině a příteli za podporu při studiu.

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

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	11
2.1	Rod <i>Cryptosporidium</i>	11
2.1.1	Historie.....	11
2.1.2	Taxonomie.....	11
2.1.3	Vývojový cyklus	12
2.1.4	Hostitelská a tkáňová specifita.....	13
2.2	Žaludeční kryptosporidie	14
2.2.1	Druhy žaludečních kryptosporidií.....	14
2.2.2	Klinické a histopatologické příznaky a patogenita žaludečních kryptosporidií	15
3	Cíl práce	17
4	Použité materiály a metody	18
4.1	Zdroj oocyst	18
4.2	Experimentální zvířata	18
4.3	Purifikace oocyst.....	18
4.3.1	Sacharózový gradient (Arrowood <i>et</i> Sterling 1987).....	19
4.3.2	Cesium chloridový gradient (Arrowood <i>et</i> Donaldson 1996).....	19
4.4	Barvení oocyst.....	20
4.4.1	Metoda barvení podle Miláčka a Vítovce (Miláček <i>et</i> Vítovec 1985).....	20
4.5	Ověření identity izolátu.....	21
4.5.1	Izolace DNA.....	21
4.5.2	Polymerázová řetězcová reakce (PCR).....	22
4.5.3	Gelová elektroforéza	23
4.5.4	Genotypizace.....	23
4.6	Intenzita infekce.....	24

4.7	Infekční dávka.....	25
4.8	Měření pH v žaludku.....	25
4.9	Histologické zpracování vzorků a analýza řezů.....	25
4.10	Patogenita a intenzita infekce hodnocená na histologických řezech	25
4.11	Statistické zpracování.....	25
4.12	Design experimentů	26
4.12.1	Experiment I. – vliv napájecí vody s upraveným pH na infekci <i>Cryptosporidium proliferans</i>	26
4.12.2	Experiment II. – vliv reinfekce <i>Cryptosporidium proliferans</i>	26
4.12.3	Experiment III – vliv infekce a reinfekce <i>Cryptosporidium muris</i> CAT21	27
5	Výsledky	28
5.1	Experiment I. – vliv napájení okyselenou vodou na infekci <i>Cryptosporidium proliferans</i>	28
5.1.1	Identita izolátu.....	28
5.1.2	Změny pH žaludku vlivem infekce.....	28
5.1.3	Patologické změny žaludeční sliznice vyvolané primární infekcí <i>Cryptosporidium proliferans</i>	29
5.2	Experiment II. – vliv reinfekce <i>Cryptosporidium proliferans</i>	32
5.2.1	Identita izolátu.....	32
5.2.2	Změny pH žaludku vlivem reinfekce.....	32
5.2.3	Patologické změny žaludeční sliznice vyvolané infekcí <i>Cryptosporidium proliferans</i>	32
5.3	Experiment III – vliv infekce a reinfekce <i>Cryptosporidium muris</i> CAT21	38
5.3.1	Identita izolátu.....	38
5.3.2	Infektivita izolátu	38
5.3.3	Změny pH žaludku vlivem infekce a reinfekce	39

5.3.4	Patologické změny žaludeční sliznice vyvolané infekcí <i>Cryptosporidium muris</i> CAT21	40
6	Diskuze.....	49
7	Závěr	53
8	Seznam použité literatury.....	54

1 Úvod

Zástupci z rodu *Cryptosporidium* jsou jednobuněční intracelulární paraziti z kmene Apicomplexa, kteří parazitují obratlovce patřící do všech tříd, včetně lidí. Některé z druhů mají úzkou hostitelskou specifitu (většina zástupců z tohoto rodu, např. *C. tyzzeri*), kdy kryptosporidie infikují jen jednoho či velmi omezený počet hostitelů, některé mají hostitelskou specifitu širší a jsou schopny infikovat některé nepříbuzné druhy hostitelů (např. *C. andersoni* infikující přežvýkavce, *C. muris* parazitující u hloдавců) anebo infikují hostitele napříč třídami obratlovců (např. *C. parvum*) (Fayer *et Xiao* 2008; Anderson 1991). Dle místa infekce v gastrointestinálním traktu, ve kterém typicky kryptosporidie parazitují, můžeme zástupce tohoto rodu rozdělit na dvě skupiny – kryptosporidie střevní a žaludeční (Fayer *et Xiao* 2008), které se liší nejen afinitou k tělním buňkám, ale i morfologií oocyst. Zatímco skupina střevních kryptosporidií zahrnuje více známých druhů a jejich oocysty jsou menší a kulatější, skupina žaludečních kryptosporidií je méně početná, s většími a oválnějšími oocystami. Příznaky, které kryptosporidiózu – tedy onemocnění vyvolané tímto rodem – doprovázejí, nejsou jednotné a liší se nejen dle místa výskytu v hostitelském organismu, ale i podle jeho imunitního stavu a konkrétního druhu kryptosporidie (Tinavská 2021, Kváč *et al.* 2009). Infekci střevními druhy doprovází vodnatý průjem, úbytek hmotnosti, může se objevit nevolnost a zvracení (Nime *et al.* 1976). Oproti tomu infekce způsobená žaludečními druhy není spojována s žádnými charakteristickými symptomy, v několika případech byl pozorován pokles užitkovosti a ztráta kondice (Anderson 1998; Esteban *et Anderson* 1995).

Přestože při infekci žaludečními druhy nebyly pozorovány symptomy typické pro střevní kryptosporidie, dosud provedené studie poukazují na nezářlivé histopatologické změny tkáně žaludku infikovaných hostitelů. Mezi pozorované změny patří například zesílení sliznice, zvýšení žaludečního pH a tvorby hlenu, který v průběhu infekce postupně zasahuje do středních až spodních částí sliznice, a přítomnost zánětlivých infiltrátů, zejména v okolí *lamina propria* (Anderson 1998; Matsubayashi *et al.* 2010; Kváč *et Vítovec* 2003; Kváč *et al.* 2016; Marková 2020; Taylor *et al.* 1999). V této práci jsme se zabývali vlivem infekcí a reinfekcí *C. muris* CAT21 a *C. proliferans* na funkční a patologické změny žaludku u různých skupin modelových organismů. Práce navazuje na mou bakalářskou práci, ve které jsme se zaměřili

na patogenitu *Cryptosporidium proliferans*, konkrétně na změnu pH žaludku a vzniklé histopatologické změny na jeho sliznici v průběhu infekce.

2 Literární přehled

2.1 Rod *Cryptosporidium*

2.1.1 Historie

Ernest Edward Tyzzer provedl první identifikaci a popis parazita nalezeného v žaludečních žlázách laboratorních myši (*Mus musculus*) a jeho vývojových stádií v roce 1907 (Tyzzer 1907). V roce 1910 navrhl pro tyto parazity nový rod nazvaný *Cryptosporidium* a pro jeho typový druh uvedl název *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1910). Tyzzer také vyslovil myšlenku autoinfekce hostitele sporozoity z oocyst ze žaludečních žláz. V roce 1912 identifikoval další druh, tentokrát v tenkém střevě, vyznačující se menšími oocystami, který pojmenoval *Cryptosporidium parvum* a který se později stal jedním z nejprozkoumanějších druhů tohoto rodu (Tyzzer 1912).

Až v roce 1955 popsal Slavin (1955) další druh patřící do tohoto rodu, *Cryptosporidium meleagridis*, v epitelu střeva a ve Fabriciově burze u krocanů. Zvířata trpěla těžkými průjmy, které byly zaznamenány i v případě první popsané infekce u lidí, a to konkrétně v roce 1976 u dvou jedinců, kteří žili na farmách s dobyt看em (Meisel *et al.* 1976; Nime *et al.* 1976). Zájem o onemocnění prudce vzrostl po epidemii v Milwaukee v roce 1993, kdy bylo přibližně 403 000 lidí infikováno vodou kontaminovanou oocystami rodu *Cryptosporidium*, které byly schopné přejít i přes funkční filtrační systém (MacKenzie *et al.* 1994).

Významný druh parazitující běžně ve slezu skotu, byl popsán a pojmenován *Cryptosporidium andersoni* několik let po této epidemii (Lindsay *et al.* 2000). Tento druh byl kvůli morfologickým podobnostem oocyst nalezených u myši a skotu až do roku 2000 považován za *C. muris*-like boviní izolát.

Na základě molekulárních studií v posledních 20 letech umožněných dostupností molekulárních metod došlo k rozšíření počtu platných druhů na aktuálních 51 (Prediger *et al.* 2021; Kváč *et al.* 2016; Ryan *et al.* 2021) a identifikaci desítek genotypů. Tyto genotypy však nelze zařadit mezi platné druhy kvůli nedostatečnosti biologických charakteristik, přestože je pravděpodobné, že většina z nich představuje samostatné taxony.

2.1.2 Taxonomie

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou intracelulární paraziti s epiplazmatickou lokalizací patřící do kmene Apicomplexa. Pro zástupce tohoto kmene je charakteristickým znakem apikální komplex, který slouží k infekci hostitelské buňky a který se skládá

z polárních prstenců, konoidu, rhoptrií a mikroném (Fayer *et Xiao* 2008). V průběhu let se zařazení rodu několikrát měnilo; kvůli morfologické podobnosti a podobnosti vývojového cyklu byly dříve řazeny mezi kokcidie (Tyzzer 1907). Obrat nastal díky výsledkům molekulárních analýz, které odhalily blízky vztah ke gregarinám (Carreno *et al.* 1999). Nejen molekulární analýzy, ale i podobná morfologická stavba organel, které slouží k přichycení k hostitelské buňce, potvrzují příbuznost k nim (Valigurová *et al.* 2007). Aktuálně jsou tak kryptosporidie přesunuty z podtřídy Coccidia do podtřídy Cryptogregarie, která je v rámci třídy Gregarinomorpha a řádu Cryptogregarida (Ryan *et al.* 2016).

2.1.3 Vývojový cyklus

I přes známost mnoha druhů i genotypů kryptosporidií byl vývojový cyklus popsán jen u zlomku z nich, konkrétně u pěti druhů, z nichž tři jsou savčí – *C. proliferans*, *C. muris* a *C. parvum* (Melicherová *et al.* 2014; Tyzzer 1907; 1910; 1912). Vývojový cyklus zástupců rodu *Cryptosporidium* je monoxenní. Takové organismy nazýváme také jednohostitelskými parazity, což znamená, že dokážou kompletně dokončit svůj životní cyklus v jednom hostiteli.

Vývojový cyklus kryptosporidií zahrnuje čtyři klíčové fáze: excystaci, merogonii, gametogonii a sporogonii.

Excystace počíná pozřením oocysty, která je infekční již při vyloučení a není potřeba dalšího dozrávání, vhodným hostitelem. Obsahuje čtyři pohyblivé sporozoity banánovitěho tvaru, kteří se z oocysty uvolní po jejím otevření podél švu (sutura) na jednom z jejích pólů a kteří napadají hostitelské buňky, jimiž mohou být typicky buňky trávicího traktu, ale například i plíce či ledviny (Current *et Garcia* 1991; Smith *et al.* 2005).

Všechny mechanismy podílející se na excystaci nejsou plně známy, mezi významné faktory však prokazatelně patří například změna teploty a pH prostředí a vystavení pankreatickým enzymům, což je důležité zejména pro excystaci střevních a žaludečních druhů kryptosporidií (Fayer *et Xiao* 1984). Pro druhy infikující tkáň mimo gastrointestinální trakt nejsou podmínky pro excystaci známy. Jakmile se sporozoit připojí na buňku, dochází k prodloužení mikroklků a vytvoření vakuoly zvané parazitoforní vakuola. Tato vakuola obklopuje parazita a následně splyne s membránou hostitelské buňky. Vzniká tak rozhraní mezi buňkou a parazitem, které brání přímému kontaktu parazita s cytoplazmou buňky (Huang *et al.* 2004). Po přichycení se

sporozoiti transformují do jednojaderných epicelulárních stádií nazývaných trofozoiti (Valigurová *et al.* 2008).

Merogonie je fází opakovaného nepohlavního dělení. U vývojových cyklů většiny studovaných druhů byly zaznamenány meronti dvou typů (typ I a II); u druhu *C. baileyi* vyskytujícího se u ptáků byl detekován ještě typ III (Current *et al.* 1986).

Meronti typu I vznikají jako první a po dělení vzniká 6–8 merozoitů. Zralí merozoiti tohoto typu jsou uvolňováni z merontů a infikují další buňky a vznikají z nich meronti I. anebo II. typu. Meronti typu II dávají za vznik 4 merozoitům II. typu. V případě druhu *C. baileyi* je tomu jinak a z merontů typu II vzniká 8 merozoitů.

Ve fázi **gametogonie** probíhá sexuální rozmnožování, které podle předpokladů iniciuje pouze typ II (Fayer *et Xiao* 2008). Z merontů tohoto typu vznikají samčí (mikrogamonti) a samičí (makrogamonti) stádia. Z mikrogamontů se uvolňují pohyblivé mikrogamety (16) a splývají s makrogametami (1) vznikajícími z makrogamontů, čímž vzniká diploidní stádium – zygota, která se vyvíjí v oocystu (Melicherová *et al.* 2014).

Při **sporogonii** je jádro děleno meioticky a vznikají 4 sporozoiti, kteří mají redukovaný počet chromozomů a reziduální tělísko. Oocysty sporulují *in situ* a byly popsány dva typy. První, tenkostěnný typ, je přítomen jen v 20 % celkového počtu oocyst a excystuje v těle hostitele za vzniku autoinfekce. Druhý, silnostěnný typ, opouští tělo hostitele spolu s výměškou a infikují další hostitele (Fayer *et Xiao* 2008).

2.1.4 Hostitelská a tkáňová specifita

U zástupců rodu *Cryptosporidium* rozeznáváme hostitelskou specifitu, kterou můžeme rozdělit do tří skupin. Druhy první skupiny mají úzkou hostitelskou specifitu a patří do ní většina zástupců tohoto druhu. Při takovémto typu specifity dochází k infekci jednoho či omezeného počtu hostitelů, často fylogeneticky příbuzných. Do druhé skupiny spadají druhy a genotypy infikující nepříbuzné skupiny hostitelů – např. *C. andersoni* parazitující u skotu, hlodavců i sudokopytníků (Anderson 1991;1998). V třetí, málo početné skupině jsou zastoupeny druhy s širokou hostitelskou specifitou. Ty infikují vícero hostitelů napříč třídami živočichů, významnými zástupci jsou například *C. parvum* a *C. baileyi*.

Gastrointestinální trakt je primární oblastí, ve které kryptosporidie parazitují, a podle konkrétního úseku infekce je můžeme dělit na dvě skupiny. První skupina střevních kryptosporidií je více početná. Oocysty těchto kryptosporidií jsou menší, kulatější a mají afinitu ke střevním buňkám. K aktivaci excystace oocyst dochází pomocí

účinku trypsinu, žluče a proteolytických enzymů (Widmer *et al.* 2007). Druhou skupinou jsou kryptosporidie žaludeční k jejichž aktivaci je zapotřebí změna teploty a pH (Dudáková 2020).

2.2 Žaludeční kryptosporidie

Oproti střevním kryptosporidiím je skupina infikující žaludek hostitele méně početná. Liší se nejen počtem zástupců, ale i morfologií oocyst. Ty jsou oproti oocystám střevních kryptosporidií většího, oválného tvaru.

2.2.1 Druhy žaludečních kryptosporidií

Vůbec prvním popsaným druhem z rodu *Cryptosporidium* je *Cryptosporidium muris*, který byl E. E. Tyzzerem nalezen v žaludečních žlázách myši a který byl popsán v roce 1907. Druh vyskytující se v žaludku plazů – *Cryptosporidium serpentis* – byl v roce 1980 pojmenován Normanem D. Levinem (Levine 1980) a to na základě již dřívějšího popisu v roce 1977, který provedl Brownstein *et al.* (1977) u hadů s hypertrofickou gastritidou. *Cryptosporidium galli* je druh nalezený ve žláznatém žaludku ptáků a pojmenovaný v roce 1999 Pavláskem (1999). Další druh, *Cryptosporidium andersoni*, byl původně chybně identifikován jako *Cryptosporidium muris*. Na základě molekulárních analýz a dle lokalizace vývojových stádií nalezených ve slezu skotu byl uznán v roce 2000 samostatným druhem (Lindsay *et al.* 2000). V roce 2002 byl popsán druh parazitující u dvou druhů mořských ryb (*Sparus aurata* a *Dicentrarchus labrax*) v hlubokých vrstvách žaludečního epitelu a pojmenován *Cryptosporidium molnari* (Alvarez-Pellitero *et Sitjà-Bobadilla* 2002). U obojživelníků, konkrétně v žaludku ropuchy dovezené do České republiky z Malajsie, byl v roce 2008 nalezen druh *Cryptosporidium fragile*, který mimo tento popis nebyl u jiných hostitelů zaznamenán (Jirků *et al.* 2008). Dalším druhem parazitujícím u ryb je *Cryptosporidium huwi* nalezený v živorodce duhové (*Poecilia raticulata*), který byl popsán v roce 2015 (Ryan *et al.* 2015). *Cryptosporidium proliferans*, původně *Cryptosporidium muris* kmen TS03 získaný z přirozeně infikovaného hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) a typicky infikující hlodavce, byl v roce 2016 popsán jako samostatný nový druh na základě odlišných biologických a molekulárních charakteristik (Kvác *et al.* 2016). U ptáků, konkrétně postihující žaludek papoušků, byl v roce 2019 popsán druh *Cryptosporidium proventriculi* (Holubová *et al.* 2019). *Cryptosporidium bollandi* nalezené u sladkovodních ryb bylo popsáno v roce 2020 (Bolland *et al.* 2020).

2.2.2 Klinické a histopatologické příznaky a patogenita žaludečních kryptosporidií

Příznaky infekce kryptosporidiemi se liší v závislosti na místě výskytu v hostiteli. Infekce tenkého střeva se typicky projevuje charakteristickými vodnatými průjmy, doprovázenými bolestí břicha, nevolností, zvracením a horečkou. Poškození epitelu tenkého střeva narušuje absorpci živin, což může vést k dehydrataci a úbytku na váze. Naopak infekce žaludečními druhy obvykle probíhají bez zjevných symptomů, nejsou doprovázeny průjmovými onemocněními. Ojedinele jsou doprovázeny poklesem mléčné užitkovosti a přírůstků a ztrátou kondice (Anderson 1998; Esteban *et al.* Anderson 1995). I v tomto případě je však infekce spojena se vznikem patologických změn.

Anderson (1998) pozoroval makroskopické změny slezu skotu infikovaného *C. andersoni*, kdy u chronicky nemocných zvířat byla sliznice slezu zbytnělá, tím pádem došlo ke zvýšení hmotnosti samotného slezu oproti neinfikovaným zvířatům (Anderson 1998). Podobné zvětšení žaludku a nezářlivé histopatologické změny pozoroval u infikovaných zvířat nejen Matsubayashi *et al.* (2010), ale i Kváč a Vítovec (2003) u přirozeně infikovaného masného skotu. Kváč *et al.* (2016) popsal markantní zesílení sliznice žaludku mastomyší infikovaných *C. proliferans*, zatímco u myši nebyla změna výšky sliznice tak patrná. Tuto skutečnost potvrdila i Marková (2022), která však popsal obdobné zesílení sliznice u krátkodobých infekcí způsobených také *C. proliferans* u BALB/c a C57Bl6 myši. Zatímco v případě mastomyší zůstala sliznice zesílená, u BALB/c a C57Bl6 myši došlo k jejímu postupnému ztenčení přibližně na fyziologickou výšku.

Mucinózní (hlenotvorné) buňky mají za úkol produkci hlenové vrstvy sloužící k ochraně sliznice žaludku před mechanickými a chemickými účinky a míra jejich sekrece je závislá na správném prokrvení stěny žaludku (Vernygorodskiy 2013). V případě infekce má na sekreci vliv i konkrétní druh patogenu. Při infekci vyvolané bakterií *Helicobacter pylori* dochází k nižší produkci hlenu a tím ke ztenčení jeho vrstvy, která při fyziologické produkci buněk měří přibližně 60 μm . Příčinou omezení syntézy hlenu je interakce s bakteriemi, jejichž růst je nadbytkem hlenu inhibován (Kamisago *et al.* 1996; Simon *et al.* 1997). Sliznice je tak odhalena nepříznivému prostředí a na jejím povrchu vznikají vředy (Byrd *et al.* Bresalier 2000). Obdobné snížení hlenové vrstvy žaludku pozoroval i Simpson *et al.* (2016) u jehňat infikovaných háďátkou a vlasovkami. Oproti tomu u hostitelů infikovaných kryptosporidiemi lze pozorovat postupné

zvyšování tvorby hlenu, který postupně v průběhu infekce zasahuje do středních až spodních částí sliznice (Marková 2020; Matsubayashi *et al.* 2010).

Zánětlivé infiltráty, zejména v okolí *lamina propria*, byly pozorovány při použití vysokých infekčních dávek *C. muris* u hlodavců, a to především v oblasti infikovaných buněk (Taylor *et al.* 1999). Jalovecká *et al.* (2009) ve své práci popsala nepřítomnost T-lymfocytů v lyzátu sliznice žaludku neinfikovaných myší, což se ovšem po infekci změnilo a byly naměřeny migrující a proliferující CD4 a CD8 T-lymfocyty, jejichž množství se zvyšovalo do 28 dnů po infekci. Marková (2022) pozorovala u BALB/c a C57Bl6 myší infikovaných *C. proliferans* zvyšující se počet zánětlivých infiltrátů, které byly lokalizovány při *lamina propria* anebo maximálně ve 2/3 výšky žaludeční sliznice, ovšem u mastomyší byly zánětlivé infiltráty pozorovatelné ve všech vrstvách sliznice, což odpovídalo masivní infekci zasahující celou sliznici.

3 Cíl práce

Cílem práce je navázat na bakalářskou práci a rozšířit poznatky z ní prostřednictvím provedení experimentálních infekcí a reinfekcí vyvolaných druhy *Cryptosporidium proliferans* a *Cryptosporidium muris* CAT21. Cílem je popsat vliv infekce a reinfekce savčími žaludečními kryptosporidiiemi u modelových hostitelů na patogenitu, změnu pH žaludku, průběh infekce a charakterizovat patologické změny na sliznici žaludku, včetně změn pH žaludku a produkce hlenu v různých fázích infekce.

4 Použité materiály a metody

4.1 Zdroj oocyst

Pro výzkumné účely byly využity dva typy žaludečních kryptosporidií, konkrétně *Cryptosporidium proliferans*, který pochází z přirozeně infikovaného hlodouna východoafrického (*Tachyorectes splendens*) a který je dlouhodobě udržován ve SCID myších v laboratořích Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i. a *Cryptosporidium muris* pocházející z přirozeně infikované kočky domácí (*Felis catus*) a který je dlouhodobě udržován v IFN γ myších v laboratořích Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i..

4.2 Experimentální zvířata

V experimentech byly použity dvě skupiny laboratorních inbredních imunokompetentních myši (*Mus musculus*), konkrétně kmeny BALB/c a C57Bl6, spolu s mastomyšmi (*Mastomys coucha*) ve věku 8 týdnů. Všechna zvířata byla chována v samostatných plastových boxech v zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i. v Českých Budějovicích.

Krmivo tvořila granulovaná komerční směs pro hlodavce a bylo stejně jako voda dostupné *ad libitum*. Jako podestýlka byly použity dřevěné piliny a jejich výměna probíhala dvakrát týdně nebo častěji podle potřeby. Prostředí v zvěřinci bylo nastaveno na 12 hodin světla a 12 hodin tmy za teploty 22 °C a relativní vzdušné vlhkosti 50–55 %. Zdravotní stav zvířat, kvalita krmiva a přístup k pitné vodě byly kontrolovány minimálně dvakrát denně.

4.3 Purifikace oocyst

Pro dosažení standardizace experimentálních infekcí bylo nezbytné získat čistou suspenzi oocyst, proto před samotným procesem čištění bylo nutné důkladně rozmělnit trus a odstranit větší částice.

Postup čištění:

- Zhomogenizuj trus v třecí misce a následně zřed' deionizovanou vodou (dH₂O).
- Přepasíruj pomocí špachtle skrz jemné sítko (velikost ok asi 250 μ m) do skleněné kádinky. Během tohoto procesu průběžně oplachuj sítko dH₂O, aby nedocházelo k nežádoucím ztrátám oocyst.

- Několikrát promyj sítko vodou a získanou suspenzi dvakrát přelij přes sítko. Tímto připravený materiál použij k další purifikaci pomocí sacharóзовého gradientu (Arrowood *et* Sterling 1987) a dokonči čištění pomocí cesium chloridového gradientu (Arrowood *et* Donaldson 1996).

4.3.1 Sacharózový gradient (Arrowood *et* Sterling 1987)

Roztoky a způsob jejich přípravy:

- Sheaterův roztok: 295 ml dH₂O + 405 g cukru + 7,29 g fenolu
- PBS Tween: přidat 0,5 ml Tween 20 do 1 litru PBS
- Pracovní Sheaterův roztok: 1+2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween), 1+4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

Pracovní postup:

- V třecí misce zhomogenizuj s dH₂O vzorek trusu a zbav jej příměsí scezením přes sítko (velikost ok asi 250 μm).
- Navrstvi plastovou Pasteurovou pipetou do skleněných nádobek gradient v níže uvedeném pořadí:
 1. vrstva: 30 ml Sheaterův roztok 1+2
 2. vrstva: 30 ml Sheaterův roztok 1+4
 3. vrstva: 15 ml vzorku, který byl zhomogenizován
- Po vyvážení zkumavek na analytické váze centrifuguj 20 minut při 1 370 g a 4 °C.
- Odsaj vrchní zbarvenou vrstvu vývěvou a zbylý supernatant přenes do nových, čistých zkumavek, sediment vyhod'.
- Dopln' objem zkumavek dH₂O.
- Centrifuguj 20 minut při 1 370 g a 4 °C.
- Odsaj ½ objemu zkumavek vývěvou a zbytek objemu dopln' dH₂O.
- Centrifugovat 20 minut při 1 370 g a 4 °C.
- Sedimenty zhomogenizuj v dH₂O a přenes je do čistých zkumavek, uchovávej při 4 °C.

4.3.2 Cesium chloridový gradient (Arrowood *et* Donaldson 1996)

Použit' roztoky:

- Roztok cesium chloridu (CsCl; 1,15 g/ml)
- PBS (0,025 M; pH 7,2)

- dH₂O

Pracovní postup:

- Po přečištění na sacharózovém gradientu vzorek centrifuguj 10 minut při 1 450 g a 4 °C.
- Odeber supernatant a přidej 0,5 ml PBS a zhomogenizuj.
- Do nové, čisté mikroskopické pipety napipetuj 1 ml CsCl.
- Na vrstvu CsCl přidej 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
- Centrifuguj 3 minuty při 16 000 g a 20 °C.
- Odeber supernatant a přepipetuj jej do čisté 50 ml centrifugační zkumavky, zbylý sediment vyhoď.
- Obsah zkumavky doplň dH₂O.
- Centrifuguj 20 minut při 1 370 g a 4 °C.
- Odsaj supernatant vodní vývěvou na objem 5 ml.
- Dopln obsah zkumavky dH₂O a zvortexuj, centrifuguj 20 minut při 1 370 g a 4 °C.
- Předchozí krok zopakuj 3–4× pro lepší účinnost promytí.
- Sedimenty zhomogenizuj v dH₂O a přenes je do čistých zkumavek, uchovávej při 4 °C.

4.4 Barvení oocyst

4.4.1 Metoda barvení podle Miláčka a Vítovce (Miláček *et* Vítovec 1985)

Použitý materiál:

- Roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti, 1 ml anilinu, 30 ml alkoholu, 1 g fenolu, 70 ml dH₂O)
- Roztok tartrazinu v 1% kyselině octové, 2% kyselina sírová

Pracovní postup:

- Na podložní sklo vytvoř tenký nátěr vzorku trusu.
- Podložní sklíčko se vzorkem ponoř do methanolu a zafixuj plamenem.
- Sklíčko vlož do stojánku a ponoř jej do roztoku methylvioleti na 30 minut.
- Pod tekoucí vodou opláchni a následně i ponoř i se stojánkem do 2% kyseliny sírové na 2 minuty.
- Oplachuj pod tekoucí vodou a obarvi v roztoku tartrazinu po dobu 3–5 minut.

- Oplachuj pod tekoucí vodou.
- Nech vzorek oschnout při laboratorní teplotě a prohlížej jej světelným mikroskopem při 1 000násobném zvětšení za použití imerzního oleje.

4.5 Ověření identity izolátu

Identita izolátů kryptosporidií použitých pro experimenty byla ověřována nejen před zahájením experimentů, ale i v jejich průběhu.

4.5.1 Izolace DNA

Izolace celkové genomové DNA (gDNA) z čistých oocyst, které byly použity pro inokulaci, a ze žláznaté části žaludku zvířat, u nichž byla infekce potvrzena, proběhla pomocí komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN).

Použitá chemie, která byla součástí kitu:

- ATL pufr
- Proteináza K
- AL pufr
- EtOH
- AW1 pufr
- AW2 pufr
- AE pufr

Pracovní postup:

- Nastříhej přibližně 10 mg tkáně nebo 200 mg trusu, vlož ji do mikrokumavky a přidej malé skleněné kuličky (0,5 mm; cca 100 µl) a 1 velkou skleněnou kuličku (2 mm).
- Připipetuj 180 µl ATL pufru a zvertexuj.
- Rozbij za pomoci přístroje FastPrep®24 Instrument MP – 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
- Centrifuguj 10 sekund při 6 000 g.
- Připipetuj 20 µl proteinázy K.
- Inkubuj po dobu 1 hodiny při 56 °C, během této doby pravidelně míchej.
- Centrifuguj 10 sekund při 6 000 g.
- Připipetuj 200 µl AL pufru a vzorek zvertexuj.
- Připipetuj 200 µl 96% EtOH a vzorek zvertexuj.

- Centrifuguj 45 sekund při 14 000 g.
- Veškerý supernatant přepipetuj na kolonku Mini spin, centrifuguj 3 minuty při 8 000 g, vylíj odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetuj 500 µl AW1 pufru, centrifuguj 1 minutu při 8 000 g, vylíj odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetuj 500 µl AW2 pufru, centrifuguj 1 minutu při 14 000 g, vylíj odpad ze sběrné zkumavky.
- Vyhoď sběrné zkumavky a nahraď je novými mikrozukmavkami.
- Na membránu čisté kolony napipetuj 200 µl AE pufru, inkubuj po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě.
- Centrifuguj 1 minutu při 8 000 g.
- Získanou DNA skladuj při teplotě -20 °C v mikrozukmavce.

4.5.2 Polymerázová řetězcová reakce (PCR)

Specifická DNA kryptosporidií byla detekována metodou nested PCR amplifikující část genu, která kóduje malou podjednotku rRNA (SSU) (Xiao *et al.* 1999).

Pracovní postup:

- PCR reakci proved' v 20 µl – smíchej 10 µl komerčně dodávaného HS-Taq premixu (GenAll, Korea) obsahujícího 2U HS-Taq DNA polymerázy, 200 µM dNTPs, loading dye, stabilizátor, 7 µl PCR vody, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 µl forward primeru (200 mM), 0,5 µl reverse primeru (200 mM) a 2 µl gDNA v případě primární reakce nebo 2 µl produktu primární reakce v případě sekundární reakce.
- Jako negativní kontrolu použij PCR vodu a jako pozitivní kontrolu použij gDNA *Cryptosporidium tyzzeri*.

Amplifikaci proved' v termocykleru při tomto programu:

- Prvotní denaturace – 3 minuty, 95 °C.
- Denaturace (35 opakujících se cyklů) – 45 sekund, 95 °C.
- Teploty nasedání primerů (v závislosti na použitém typu primerů) – 45 sekund.
- Extenze řetězců – 1 minuta, 72 °C.
- Konečná extenze řetězců – 10 minut, 72 °C.

4.5.3 Gelová elektroforéza

Produkty, které vznikly při sekundární PCR, byly nanесeny na 1% agarózový gel s přidavkem ethidium-bromidu (EtBr). Po dokončení elektroforézy byl vzniklý produkt vizualizován UV transiluminátorem.

Použitá chemie:

- 50× TAE pufr
- Ethidium-bromid (10 mg/ml, Sigma Aldrich, USA)
- Agaróza (Serva Electrophoresis, Germany)
- 100 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc., Kanada)

Pracovní postup:

- V Erlenmayerově baňce smíchej 1× TAE pufr s odváženou agarózou v poměru dle velikosti nosiče, směs vlož do mikrovlnné trouby po takovou dobu, dokud nevznikne homogenní směs.
- Zchlad' baňku pod tekoucí vodou, přidej do směsi 1 µl EtBr.
- Do vhodně velkého nosiče vylij obsah baňky, dle počtu vzorků vyber vhodný hřeben a ten vlož následně do nosiče.
- Směs nech v nosiči zatusnout.
- Hřeben vyjmi a gel vlož do elektroforetické vany, která obsahuje 1×TAE pufr.
- Nanášeј dle schématu: první jamka – 10 µl 100 bp DNA Ladder; následující jamky – 20 µl produktů získaných po sekundární PCR.
- Nastav napětí na 90 V a nech fragmenty separovat (cca 30–50 minut).
- Zobraz fragmenty pomocí UV transiluminátoru.

4.5.4 Genotypizace

Sekundární produkty vzniklé při PCR byly z gelu izolovány pomocí kitu Gen Elute od firmy Sigma dle instrukcí výrobce. Získané fragmenty DNA pak sekvenovaly komerční laboratoře s použitím kitu ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing a sekundárních primerů. Každý vzorek byl sekvenován z obou stran.

Nukleotidové sekvence byly poté analyzovány v programu ChromasPro a následně porovnány s uloženými sekvencemi v databázi GenBank. Jak referenční, tak získané sekvence byly seřazeny online nástrojem MAFFT verze 7 online server s automatickým výběrem seřazovací strategie (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) a

dále ručně doopraveny v programu BioEdit. Nakonec byla porovnána identita použitých izolátů vůči izolátům získaným z experimentálně infikovaných zvířat.

4.6 Intenzita infekce

Intenzita infekce byla měřena metodou qPCR pomocí komerčního kitu od firmy You-Seq (YSL-qP-EC-Crypto-100).

Použitá chemie, která byla součástí kitu:

- *Cryptosporidium* spp. specifický primer/sonda (FAM sonda)
- Endogenní kontrolní primer/sonda (VIC/HEX sonda)
- Pasivní referenční barvivo ROX
- Voda bez DNázy/RNázy
- Pufr pro resuspenzi templátu
- Lyofilizovaná směs Tetra 2X qPCR MasterMix
- MasterMix resuspenzní pufr
- Pozitivní kontrolní templát

Pracovní postup:

- Smíchej 10 µl lyofilizované směsi Tetra 2X qPCR MasterMix, 1 µl *Cryptosporidium* spp. specifického primeru/sondy, 1 µl endogenního kontrolního primeru/sondy a 8 µl extrahované DNA vzorku.
- Pro negativní kontrolu použij stejné reagentie v totožném objemu a extrahovanou DNA vzorku nahraď vodou bez DNázy/RNázy.
- Pro vzorky použij následující PCR protokol

	Teplota	Čas
Hot Start	95 °C	3 minuty
45 cyklů	95 °C	15 sekund
	60 °C	60 sekund

Intenzita infekce byla hodnocena dle kalibrační křivky, která byla součástí každá reakce a složené ze vzorků obsahující 1 000 000, 100 000, 10 000, 1 000, 100 a 10 kopií SSU.

4.7 Infekční dávka

Oocysty kryptosporidií, čištěné podle předchozích postupů (viz. kapitola 4.3), byly využity k perorální infekci laboratorních hlodavců. Použity byly oocysty mladší čtyř týdnů po odběru/purifikaci a před infekcí byla ověřena jejich životaschopnost podle dříve publikovaných postupů (Kváč *et al.* 2007). Počet oocyst v infekční dávce byl spočítán v Bürkerově komůrce podle pokynů výrobce.

4.8 Měření pH v žaludku

K měření pH vnitřní stěny žaludku byla použita dotyková kombinovaná pH elektroda Theta 90 typu HC 163-FES, která byla kalibrována za pomoci kalibračních roztoků pH 4 a pH 7 při laboratorní teplotě.

4.9 Histologické zpracování vzorků a analýza řezů

Odebrané vzorky žaludeční tkáně dle designu experimentu byly fixovány v neutrálním pufrovaném formalínu. Po dostačujícím profixování byly vzorky přikrojeny a prosyceny parafínem za pomoci tkáňového procesoru KOS (99 % histoalkohol – 35 minut, isopropylalkohol – 1,15 hodin, histowax – 1,5 hodin). Prosycené vzorky byly zality do bločků a následně z nich byly vytvořeny histologické řezy o síle 5 μm . Na řezech byl proveden průkaz polysacharidů metodou PAS (Periodic-Acid-Schiff). Obarvené řezy byly montovány do Pertexu a prohlíženy světelným mikroskopem (Olympus IX70) s vhodným zvětšením. Výsledky pozorování byly porovnány s neinfikovanými tkáněmi, které byly vyšetřeny totožným postupem.

4.10 Patogenita a intenzita infekce hodnocená na histologických řezech

Fotografie zhotovené z histologických řezů byly vyhodnocovány ručně a v kombinaci s umělou inteligencí v programu Microscopy Image Browser.

Výška sliznice byla měřena pomocí vzdálenosti koncových bodů přímek vedenných po vygenerované stereologické mřížce od *lamina propria*.

Přítomnost zánětlivých infiltrátů byla hodnocena jako procentuální poměr plochy, kterou zaujímají vůči celkové ploše tkáně nad lamina propria na jednotlivých fotografiích histologických řezů.

Přítomnost infikovaných žláz byla hodnocena jako procentuální poměr žláz, uvnitř nichž byla detekována vývojová stádia parazita, vůči prázdným žlázám.

4.11 Statistické zpracování

Změny na sliznici žaludku byly testovány jako dvojrozměrné průměrné vektory měření a srovnávány s kontrolními vzorky. K ověření hypotézy byl použit Hotellingův

T2 test. Rozdíly v přítomnosti infekce a imunitních buněk mezi skupinami byly testovány neparametrickým Mann–Whitney U testem. Bartlettův test byl použit k testování homoskedasticity rozdílů v prepatentních a patentních obdobích různých infekcí. Výpočty byly provedeny v softwaru R 4.1.0. Testovaná hypotéza zněla, že dvourozměrné střední vektory měření jsou v obou srovnávaných populacích stejné.

4.12 Design experimentů

4.12.1 Experiment I. – vliv napájecí vody s upraveným pH na infekci *Cryptosporidium proliferans*

Cílem tohoto experimentu bylo sledovat vliv okyselené vody na změnu pH žaludku, charakterizovat jeho patologické změny a porovnat získaná data s daty původního experimentem popsaného v bakalářské práci. Voda s upraveným pH na hodnotu 3,3, čehož bylo docíleno za použití 1 M HCl, byla zvířatům dostupná *ad libitum*, a experimentální infekce byla provedena po týdnu od začátku podávání takto upravené vody.

- **Druh použitých hlodavců:** mastomysí (*Mastomys coucha*) ve věku 8 týdnů.
- **Druh parazita použitý k infekci:** *Cryptosporidium proliferans*.
- **Infekce zvířat:** jícnovou sondou, a to infekční dávkou, která obsahovala 1×10^6 oocyst v 10 μ l dH₂O.
- **Příjem upravené napájecí vody:** *ad libitum* po celou dobu experimentu.
- **Design experimentu:** vylučněná zvířata byla usmrcována po 7denních intervalech až do 70 dnů po infekci, ve skupinách, která obsahovala 1–3 zvířata, a to humánním způsobem – usmáním isofluranem s následným zlomením vazů. Zvířata použitá jako kontroly byla usmrcována v den nultý.
- **Postup při sbírání dat:** po otevření dutiny břišní byl vyjmut žaludek, ten byl podélně rozstříhnut a rozevřen, a byly provedeny následující činnosti:
 - **Měření pH vnitřní stěny žaludku:** viz. kapitola 4.8.
 - **Odebrání části pro účely histologického vyšetření:** viz. kapitola 4.10
 - **Vyšetření přítomnosti DNA kryptosporidií:** viz. kapitola 4.5.

4.12.2 Experiment II. – vliv reinfekce *Cryptosporidium proliferans*

Tento experiment měl za účel navázat na poznatky bakalářské práce provedením experimentální reinfekce. Opět byla sledována změna pH žaludku a jeho patologické změny.

- **Druh použitých hlodavců:** kmeny inbredních myší (*Mus musculus*), konkrétně BALB/c a C57Bl6 ve věku 8 týdnů.

- **Druh parazita použitý k reinfekci:** *Cryptosporidium proliferans*.
- **Infekce zvířat:** primární infekce byla provedena totožně jako u I. experimentu (viz. kapitola 4.13.1). Reinfekce proběhla po 3 měsících od primární infekce stejným způsobem.
- **Design experimentu:** vylučněná zvířata byla usmrcována po 7denních intervalech až do 70 dnů po infekci, ve skupinách, která obsahovala 1–3 zvířata, a to humánním způsobem – uspáním isofluranem s následným zlomením vazů. Zvířata použitá jako kontroly byla usmrcována v den nultý.
- **Postup při sbírání dat:** po otevření dutiny břišní byl vyjmut žaludek, ten byl podélně rozstříhnut a rozevřen, a byly provedeny následující činnosti:
 - **Měření pH vnitřní stěny žaludku:** viz. kapitola 4.8.
 - **Odebrání části pro účely histologického vyšetření:** viz. kapitola 4.10
 - **Vyšetření přítomnosti DNA kryptosporidií:** viz. kapitola 4.5.

4.12.3 Experiment III – vliv infekce a reinfekce *Cryptosporidium muris* CAT21

I v tomto experimentu byla sledována změna pH žaludku a jeho patologické změny, tentokrát po provedení infekce a následné reinfekce u vybraných hlodavců.

- **Druh použitých hlodavců:** kmeny inbredních myši (*Mus musculus*), konkrétně BALB/c a C57Bl6 ve věku 8 týdnů.
- **Druh parazita použitý k reinfekci:** *Cryptosporidium proliferans*.
- **Infekce zvířat:** primární infekce byla provedena totožně jako u I. experimentu (viz. kapitola 4.13.1). Reinfekce proběhla po 3 měsících od primární infekce stejným způsobem.
- **Design experimentu:** vylučněná zvířata byla usmrcována po 7denních intervalech až do 70 dnů po infekci, ve skupinách, která obsahovala 1–3 zvířata, a to humánním způsobem – uspáním isofluranem s následným zlomením vazů. Zvířata použitá jako kontroly byla usmrcována v den nultý.
- **Postup při sbírání dat:** po otevření dutiny břišní byl vyjmut žaludek, ten byl podélně rozstříhnut a rozevřen, a byly provedeny následující činnosti:
 - **Měření pH vnitřní stěny žaludku:** viz. kapitola 4.8.
 - **Odebrání části pro účely histologického vyšetření:** viz. kapitola 4.10
 - **Vyšetření přítomnosti DNA kryptosporidií:** viz. kapitola 4.5.

5 Výsledky

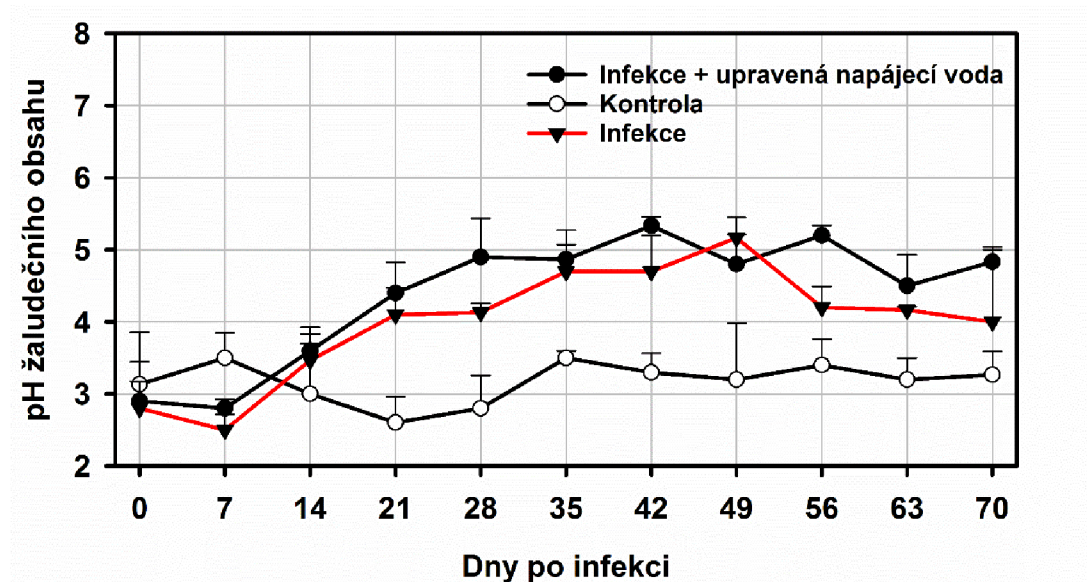
5.1 Experiment I. – vliv napájení okyselenou vodou na infekci *Cryptosporidium proliferans*

5.1.1 Identita izolátu

Výsledky molekulárních analýz prokázaly, že sekvence SSU získané z izolátu *C. proliferans* použitého k inokulaci mastomýši a sekvence získané z infikovaných zvířat byly mezi sebou vzájemně identické a současně identické se sekvencemi *C. proliferans* uloženými v GenBank (*C. proliferans* – KR090615).

5.1.2 Změny pH žaludku vlivem infekce

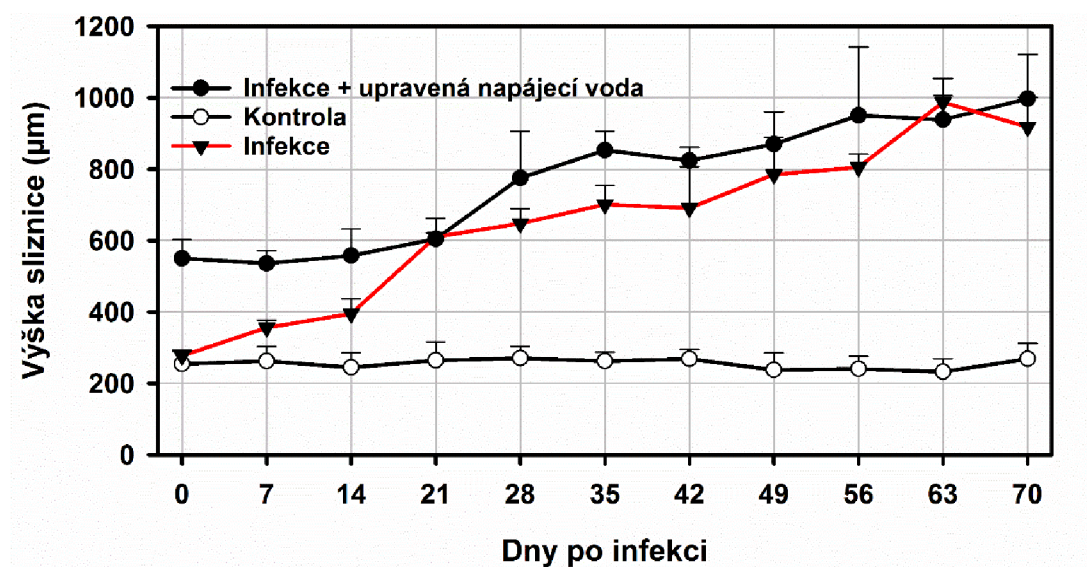
U infikované skupiny mastomýši, jimž týden před infekcí a v průběhu infekce *C. proliferans* byla podávána voda s pH 3,3, nebyl v den infekce zjištěn statisticky významný rozdíl v pH žaludečního obsahu oproti kontrole ($P > 0,05$). U obou infikovaných skupin mastomýši došlo ke statisticky významnému nárůstu pH oproti kontrole 21 DPI ($P < 0,05$). Napájení kyselou vodou nemělo vliv na změnu pH žaludku ani na průběh infekce. U obou infikovaných skupin mastomýši nedošlo až do konce experimentu ke změně pH ($P > 0,05$) a žádné zvíře se z infekce nevyhléčilo. Nebyl pozorován rozdíl mezi mastomýši napájenými okyselenou vodou a kohoutkovou vodou ($P > 0,05$).



Obrázek 1: Vliv infekce *Cryptosporidium proliferans* na změnu pH v žaludku u mastomýši napájených okyselenou vodou (pH 3,3). Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců \pm směrodatná odchylka. Data primární infekce (červeně zvýrazněno) byla převzata z bakalářské práce (Marková 2020) a to pouze pro účel porovnání s daty získanými touto prací.

5.1.3 Patologické změny žaludeční sliznice vyvolané primární infekcí *Cryptosporidium proliferans*

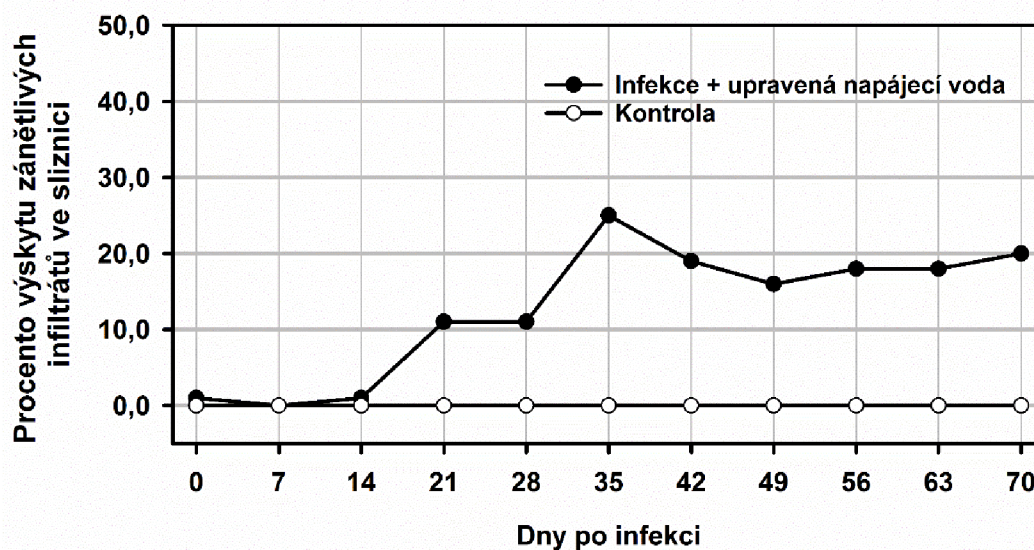
U experimentálně nakažených mastomysů napájených upravenou napájecí vodou bylo pozorováno zesílení stěny žaludku již na počátku experimentu (Obrázek 2). Toto zesílení bylo statisticky významné oproti kontrole a skupině myši s infekcí napájené vodovodní vodou ($P < 0,05$). U infikované skupiny napájené vodovodní vodou bylo pozorováno postupné zesílení stěny žaludku od 7 DPI ($P < 0,05$). Od 21 DPI, kdy bylo u obou skupin infikovaných mastomysů detekováno identické zesílení stěny žaludku (600–611 μm), bylo pozorováno větší zesílení u skupiny napájené upravenou vodou. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky nevýznamné ($P > 0,05$). Na konci experimentu nebyl zjištěn rozdíl mezi skupinami, u obou skupin mastomysů s infekcí bylo naměřeno zesílení sliznice žaludku v rozmezí 900–980 μm (Obrázek 2).



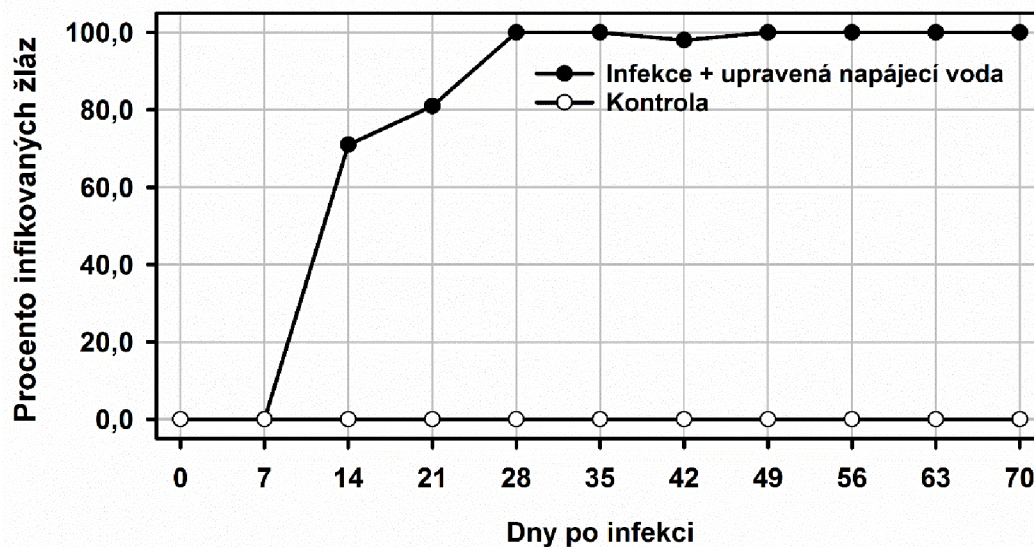
Obrázek 2: Vývoj výšky sliznice v průběhu infekce *Cryptosporidium proliferans* u mastomysů napájených okyselenou vodou (pH 3,3). Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců \pm směrodatná odchylka. Data primární infekce (červeně zvýrazněno) byla převzata z bakalářské práce (Marková 2020) a to pouze pro účel porovnání s daty získanými touto prací.

Zánětlivé infiltráty se u infikovaných mastomysů napájených upravenou vodou začaly objevovat ve tkáni od 21 DPI (11 % z celkové tkáně) a nejvíce infiltrátů bylo zaznamenáno 35 DPI, kdy jich bylo průměrně 25 %. Po zbytek experimentu se množství infiltrátů výrazně neměnilo a jejich procento se pohybovalo v rozmezí 18–20 % (Obrázek 3).

Vrchol intenzity infekce byl pozorován 28 DPI, kdy procento infikovaných žláz tvořilo 100 % a až do konce experimentu byl tento průměr konstantní (Obrázek 4).

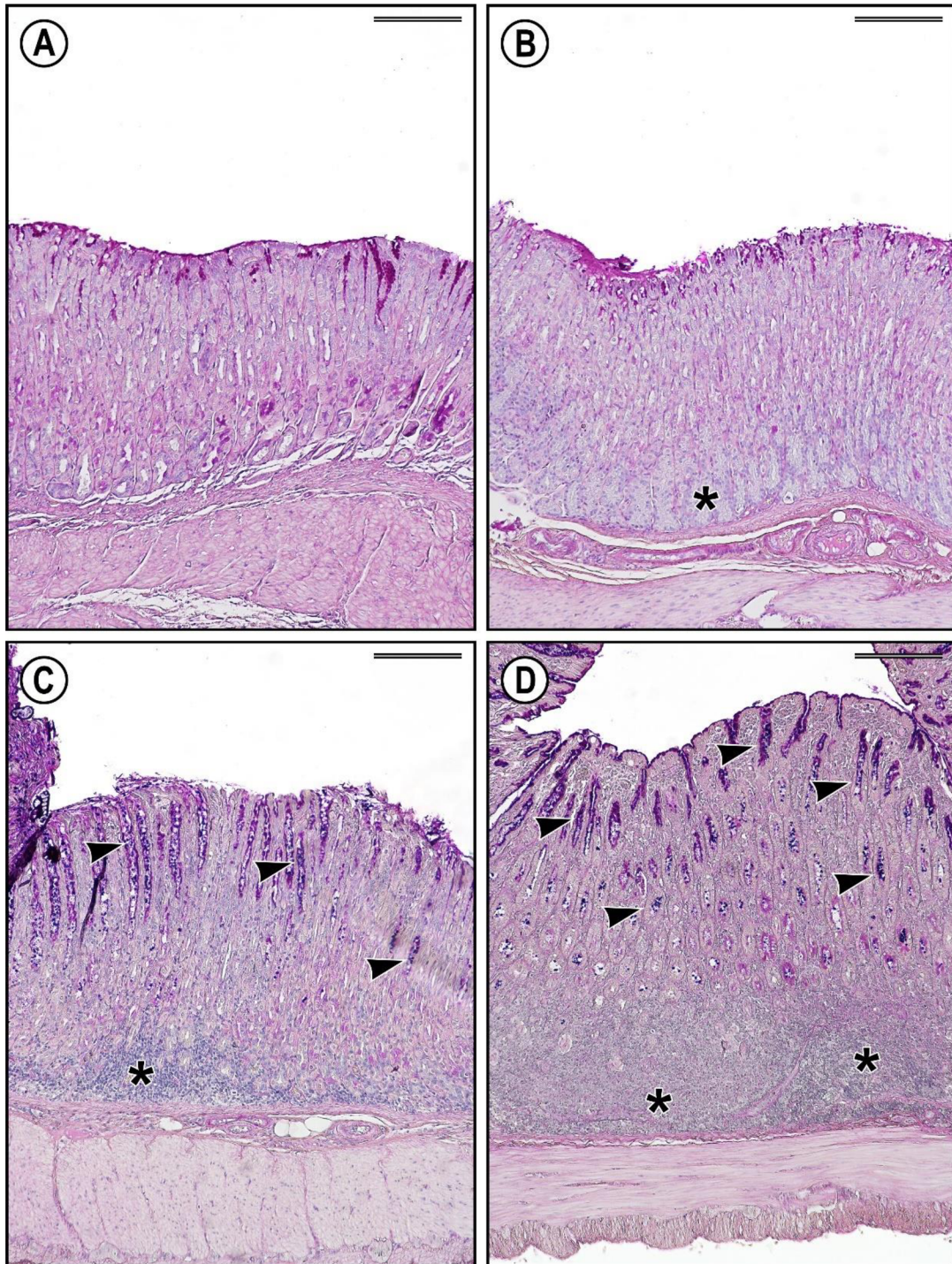


Obrázek 3: Vývoj procenta výskytu zánětlivých infiltrátů ve sliznici v průběhu infekce *Cryptosporidium proliferans* u mastomyší napájených okyselenou vodou (pH 3,3). Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců ± směrodatná odchylka.



Obrázek 4: Vývoj procenta infikovaných žláz ve sliznici v průběhu infekce *Cryptosporidium proliferans* u mastomyší napájených okyselenou vodou (pH 3,3). Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců ± směrodatná odchylka.

Změna výšky sliznice, přítomnost zánětlivých infiltrátů, stejně jako přítomnost kryptosporidií ve sliznici v průběhu experimentu jsou uvedeny na obrázku 5.



Obrázek 5: Změny na sliznici žaludku mastomyši s infekcí *Cryptosporidium proliferans* a napájených vodou o pH 3,3 v **A)** 0 DPI, **B)** 14 DPI, **C)** 21 DPI a **D)** 42 DPI. Histologické řezy žláznatého žaludku infikovaných myši, zpracované metodou popsanou v kapitole 4.9. DPI – dny po infekci. Šipky poukazují na přítomnost vývojových stádií *C. proliferans*; * znázorňuje zánětlivé infiltráty. Měřítko = 20 μ m.

5.2 Experiment II. – vliv reinfekce *Cryptosporidium proliferans*

5.2.1 Identita izolátu

Výsledky molekulárních analýz prokázaly, že sekvence SSU získané z izolátu *C. proliferans* použitého k inokulaci BALB/c a C57Bl6 myši a sekvence získané z infikovaných zvířat byly mezi sebou vzájemně identické a současně identické se sekvencemi *C. proliferans* uloženými v GenBank (*C. proliferans* – KR090615).

5.2.2 Změny pH žaludku vlivem reinfekce

Vlivem reinfekce *C. proliferans* došlo u BALB/c i C57Bl6 myši ke zvýšení pH žaludečního obsahu (Obrázek 6). U skupiny BALB/c myši došlo ke statisticky významnému zvýšení pH oproti kontrole 7 DPI (pH 4,85). Od 7 DPI bylo pozorováno postupné zvyšování pH obsahu žaludku až do 49 DPI, kdy byly naměřeny nejvyšší hodnoty (pH 5,77; $P < 0,05$). Po tomto vrcholu pH postupně rychle kleslo na průměrnou hodnotu 2,90 ($P > 0,05$).

Obdobně jako u BALB/c myši také v případě reinfikovaných C57Bl6 myši došlo ke zvýšení pH již 7 DPI (4,53), hodnoty opět rostly do vrcholu 49 DPI (pH 5,60; $P < 0,05$) s následným poklesem na fyziologickou hodnotu ($P > 0,05$).

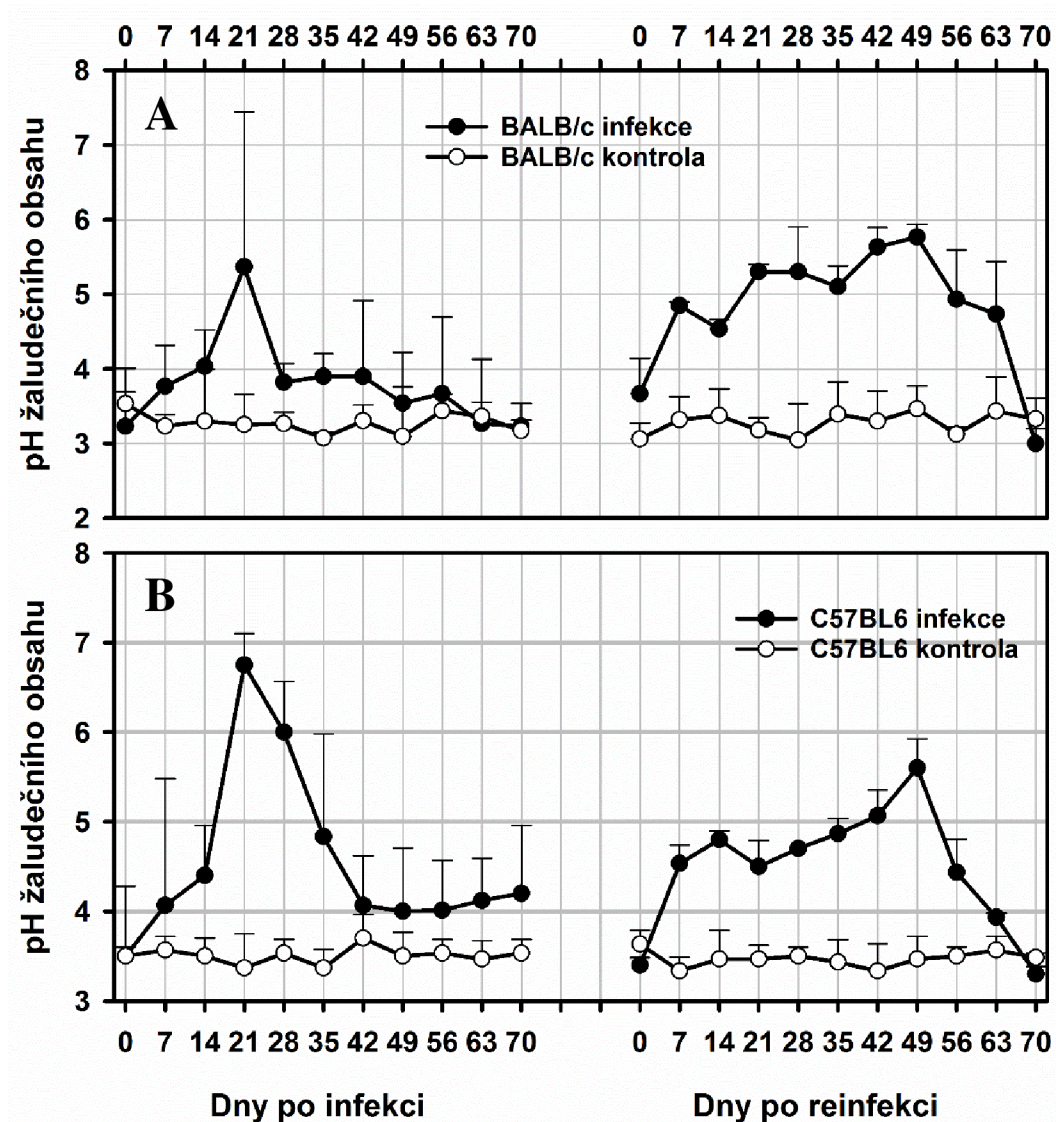
5.2.3 Patologické změny žaludeční sliznice vyvolané infekcí *Cryptosporidium proliferans*

U obou experimentálních skupin laboratorních hlodavců, BALB/c a C57Bl6, došlo vlivem reinfekce *C. proliferans* ke zvýšení žaludeční sliznice bezprostředně po infekci, tedy 7 DPI (Obrázek 7). U skupiny BALB/c myši byl pozorován postupný nárůst zesílení sliznice od 21 do 35 DPI, kdy její výška byla v průměru 439,5 μm ($P < 0,05$). Od 49 DPI byl pozorován postupný návrat výšky sliznice k fyziologickým hodnotám. Zánětlivé infiltráty ani infikované žlázy nebyly v tkáni pozorovány po celou dobu experimentu.

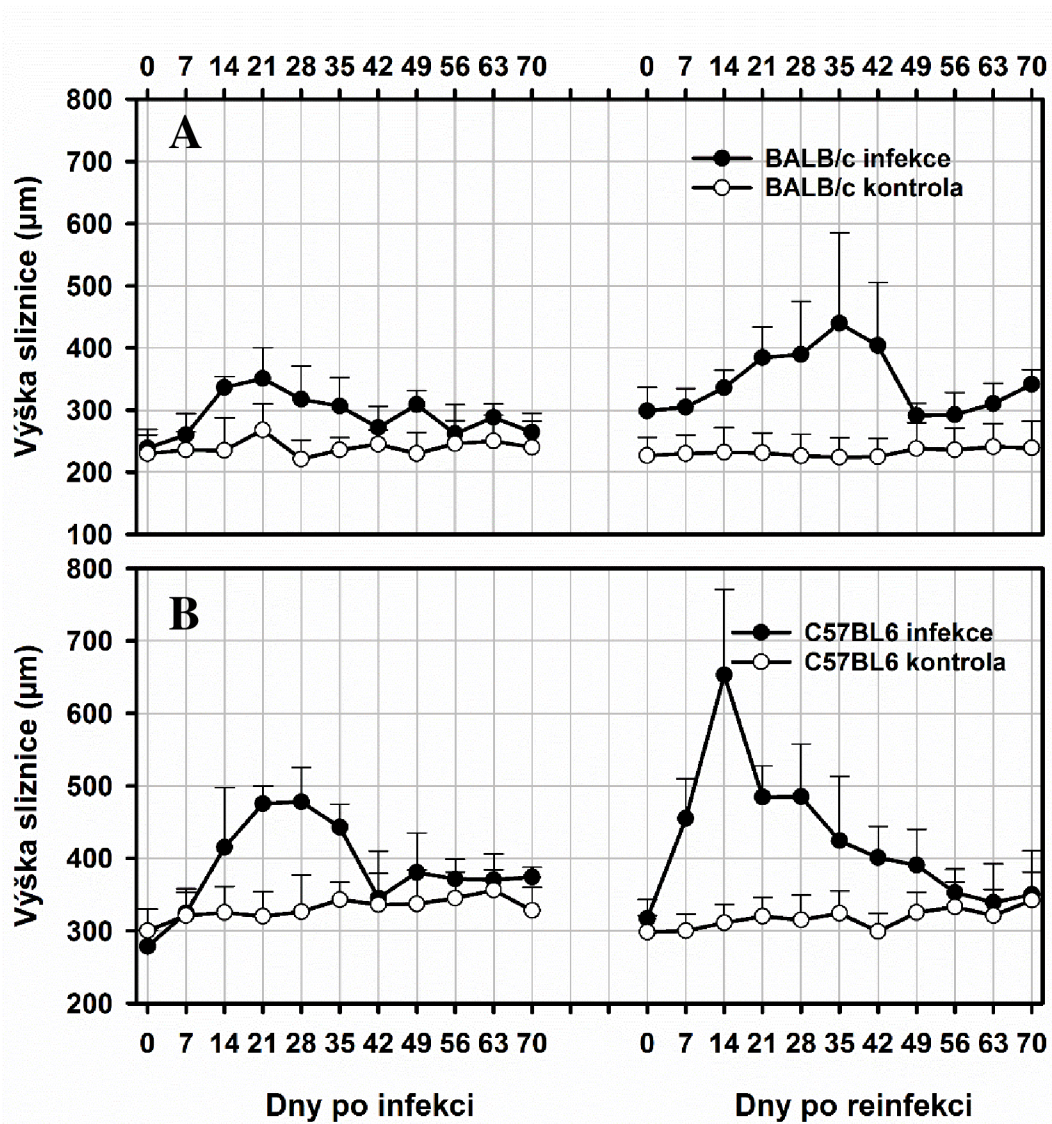
U skupiny C57Bl6 myši došlo k zesílení sliznice již 7 DPI. Tento nárůst byl v porovnání s primární infekcí razantní ($P < 0,05$). Největší zesílení žaludeční sliznice bylo zaznamenáno 14 DPI (652,8 μm), které bylo vyšší než v případě primární infekce. Po 14 DPI výška sliznice postupně klesala až na fyziologické hodnoty. Od 56 DPI nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi infikovanými myšmi a kontrolou ($P > 0,05$; Obrázek 7). Zánětlivé infiltráty se objevily 7 DPI, kdy jich také bylo pozorováno nejvíce (1,5 % z celkové tkáně), po 14 DPI jejich množství kleslo na 1 % a

vyšší hodnoty nebyly až do konce experimentu zaznamenány (Obrázek 8). V tkáni nebyly pozorovány žádné infikované žlázy.

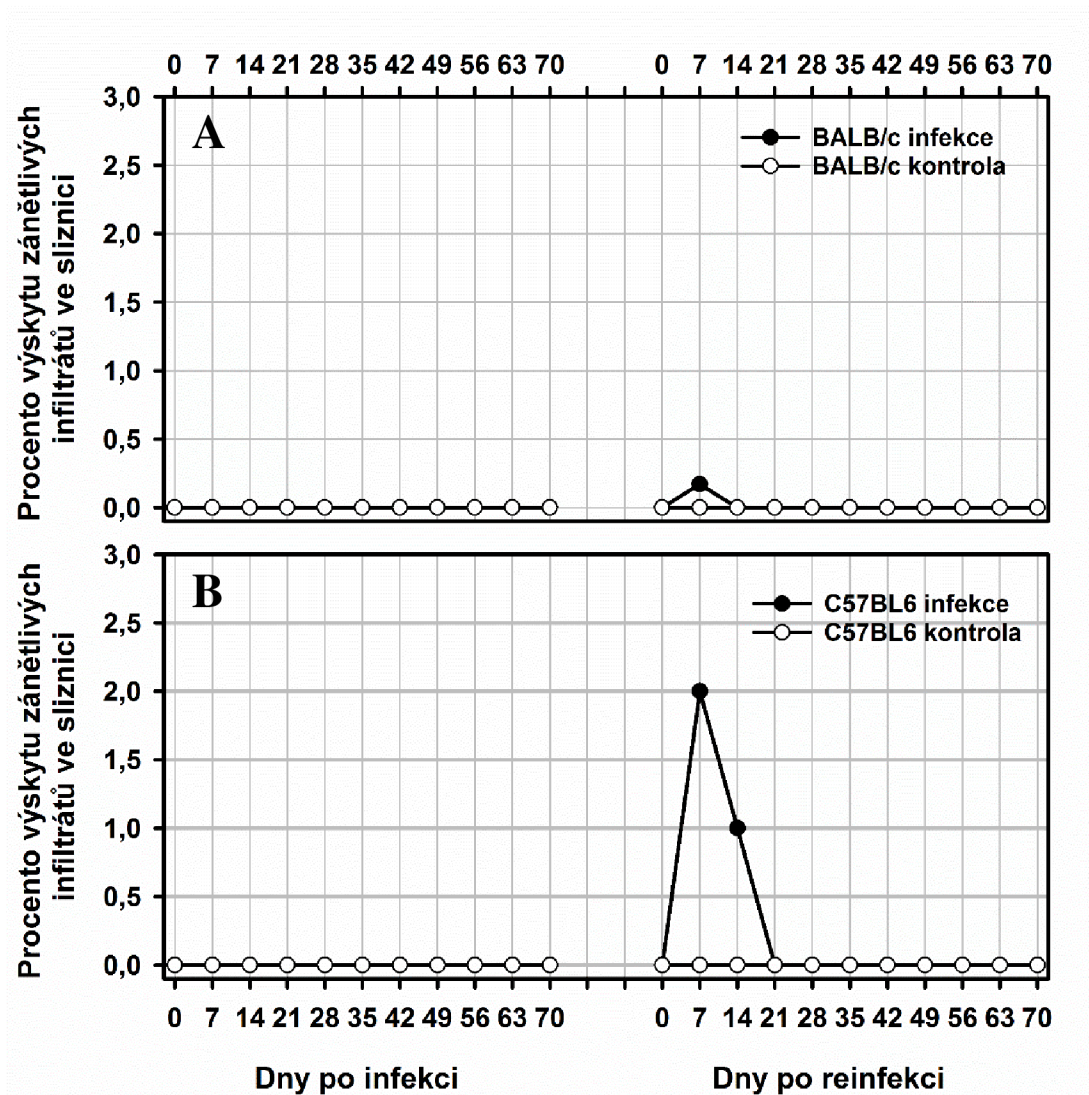
Změna výšky sliznice, přítomnost zánětlivých infiltrátů, stejně jako přítomnost kryptosporidií ve sliznici v průběhu experimentu u BALB/c a C57Bl6 myši infikovaných *C. proliferans* jsou uvedeny na obrázcích 9 a 10.



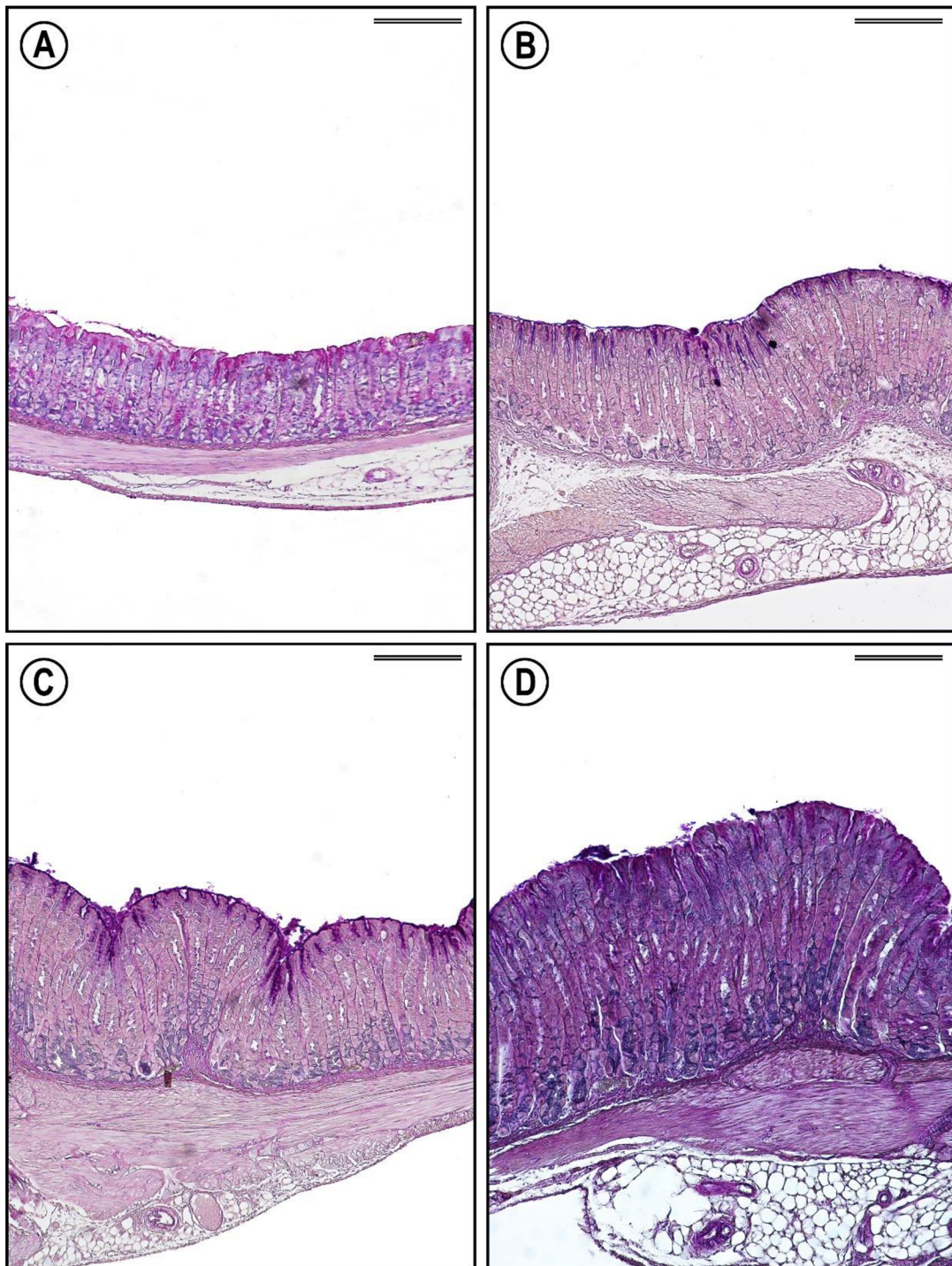
Obrázek 6: Vliv infekce a reinfekce *Cryptosporidium proliferans* na změnu pH v žaludku u A) BALB/c myši a B) C57Bl6 myši. Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců \pm směrodatná odchylka. Data primární infekce byla převzata z bakalářské práce (Marková 2020) a to pouze pro účel porovnání s daty získanými touto prací.



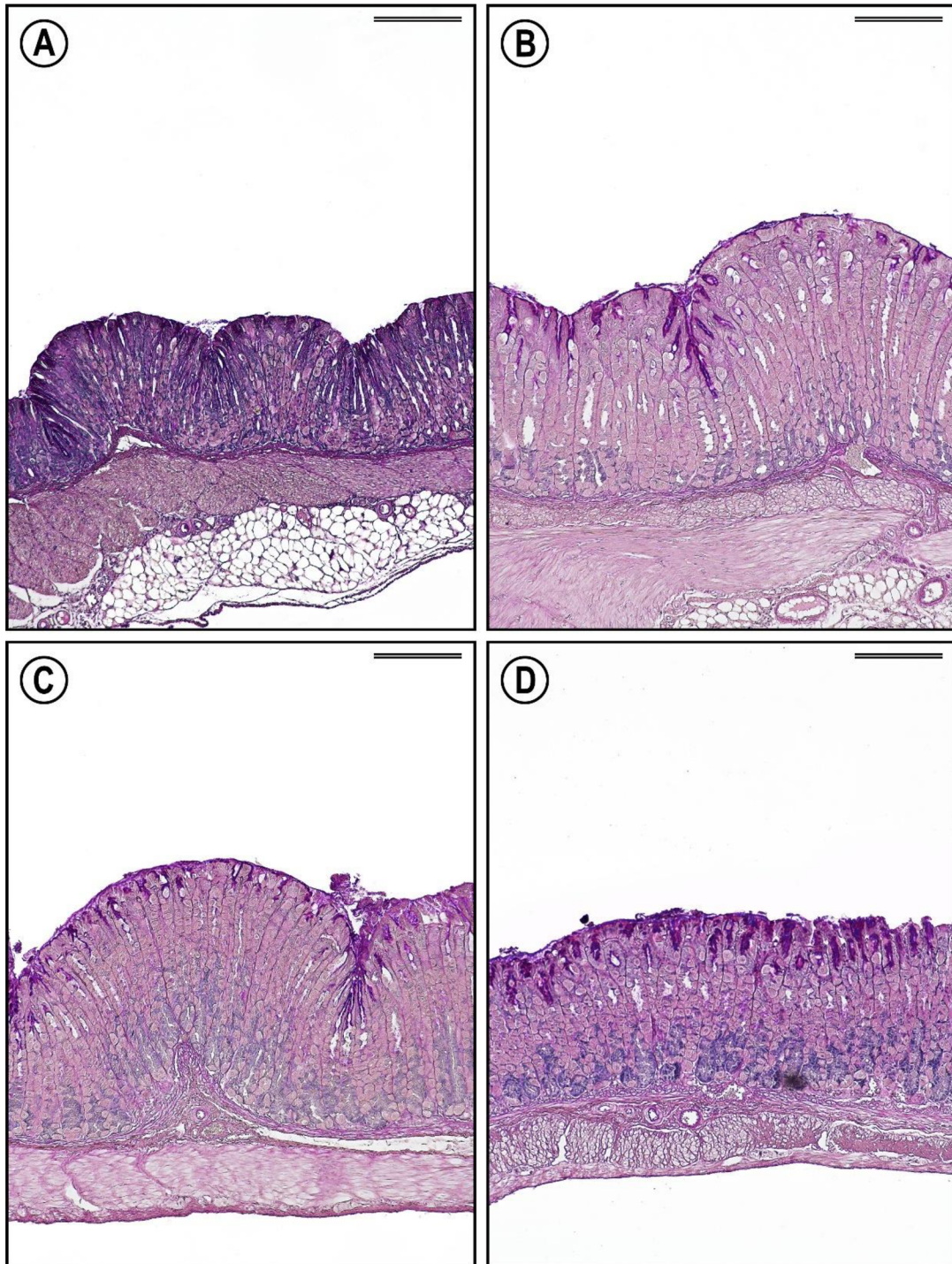
Obrázek 7: Vývoj výšky sliznice v průběhu reinfekce *Cryptosporidium proliferans* u A) BALB/c myši a B) C57BL6 myši. Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců ± směrodatná odchylka. Data primární infekce byla převzata z bakalářské práce (Marková 2020) a to pouze pro účel porovnání s daty získanými touto prací.



Obrázek 8: Vývoj procenta výskytu zánětlivých infiltrátů ve sliznici v průběhu reinfekce *Cryptosporidium proliferans* u **A)** BALB/c myši a **B)** C57BL6 myši. Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců \pm směrodatná odchylka.



Obrázek 9: Změny na sliznici žaludku BALB/c myši s reinfekcí *Cryptosporidium proliferans* v **A)** 0 DPI, **B)** 14 DPI, **C)** 21 DPI a **D)** 42 DPI. Histologické řezy žláznatého žaludku infikovaných myši, zpracované metodou popsanou v kapitole 4.9. DPI – dny po infekci. Měřítko = 20 μ m.



Obrázek 10: Změny na sliznici žaludku C657Bl6 myši s reinfekcí *Cryptosporidium proliferans* v **A)** 0 DPI, **B)** 14 DPI, **C)** 21 DPI a **D)** 42 DPI. Histologické řezy žláznatého žaludku infikovaných myši, zpracované metodou popsanou v kapitole 4.9. DPI – dny po infekci. Měřítka = 20 μ m.

5.3 Experiment III – vliv infekce a reinfekce *Cryptosporidium muris* CAT21

5.3.1 Identita izolátu

Výsledky molekulárních analýz prokázaly, že sekvence SSU získané z izolátu *C. muris* CAT21 použitého k inokulaci BALB/c a C57BL6 myši a sekvence získané z infikovaných zvířat byly mezi sebou vzájemně identické a současně identické se sekvencemi *C. muris* uloženými v GenBank (*C. muris* – MN038146).

5.3.2 Infektivita izolátu

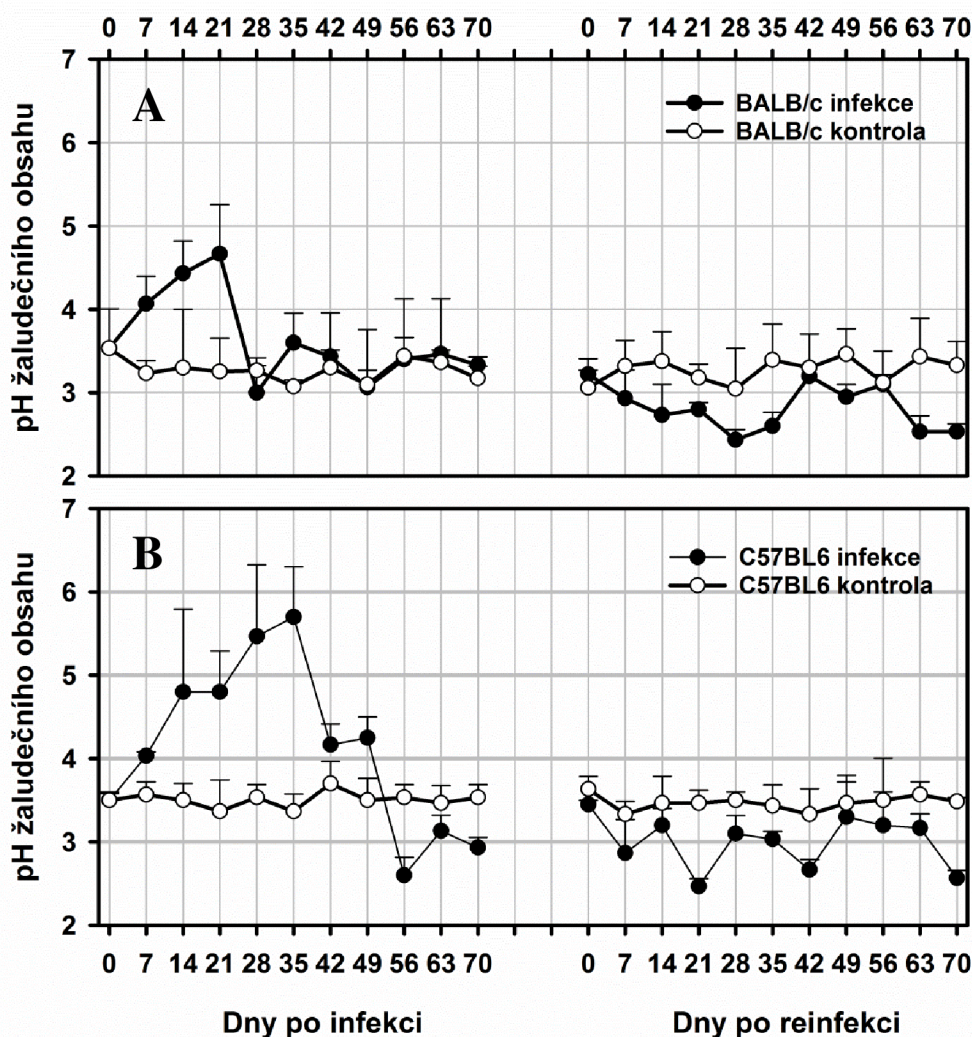
Výsledky infektivy izolátu *C. muris* CAT21, která byla měřena metodou qPCR (viz. kapitola 4.6) ze vzorků žaludků zvířat perorálně inokulovaných dávkou 1 000 000 oocyst *C. muris* CAT21, prokázaly detekovatelné množství specifické DNA u myši BALB/c a C57BL6. U obou kmenů myši byla specifická DNA *C. muris* CAT21 detekována 7 DPI. U BALB/c byl vrchol intenzity infekce zaznamenán 14 DPI, po němž došlo k výraznému poklesu intenzity infekce (Tabulka 1), zatímco u C57BL6 myši byl vrchol intenzity infekce až 21 DPI. I u těchto myši došlo následně k poklesu intenzity infekce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Intenzita infekce *Cryptosporidium muris* CAT21 u BALB/c a C57BL6 myši vyjádřených jako počet kopií malé podjednotky rRNA na gram tkáně žaludku měřená metodou qPCR.

Dny po infekci	BALB/c	C57BL6
	Počet kopií na 1 g tkáně	
7	10 174	9 296
14	214 627	125 924
21	8 156	1 623 967
28	4 221	12 458
35	3 993	945
42	6 252	1 162
49	6 774	1 322
56	1 034	1 046
63	0	0
70	0	0

5.3.3 Změny pH žaludku vlivem infekce a reinfekce

U myši BALB/c experimentálně infikovaných *C. muris* CAT21 došlo při primární infekci ke zvýšení pH v žaludku (průměrně na hodnotu 4,07) od 7 DPI ($P < 0,05$; Obrázek 11). Největší hodnota pH naměřeného u pokusné BALB/c skupiny byla zaznamenána 21 DPI, kdy v průměru dosahovalo pH hodnoty 4,67 ($P < 0,05$). Po tomto vrcholu se hodnota pH v žaludku vrátila na fyziologickou hodnotu, kde zůstala až do konce experimentu ($P > 0,05$; Obrázek 11).



Obrázek 11: Vliv infekce a reinfekce *Cryptosporidium muris* CAT21 na změnu pH v žaludku u A) BALB/c myši a B) C57BL6 myši. Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců ± směrodatná odchylka.

V případě reinfekce BALB/c myši kryptosporidií *C. muris* CAT21 nebylo pozorováno zvýšení pH žaludku v žádném ze sledovaných dnů v průběhu experimentu ($P > 0,05$; Obrázek 11).

U C57Bl6 myši při primární infekci došlo obdobně jako u BALB/c ke zvýšení pH od 7 DPI (pH 4,03), nicméně hodnoty pH se zvyšovaly do vrcholu v 35 DPI (pH 5,70). Tyto změny byly oproti kontrole statisticky významné ($P < 0,05$; Obrázek 11). Od 42. DPI se pH žaludku u této skupiny myši pohybovalo ve fyziologických hodnotách a nelišilo se od kontrol ($P > 0,05$; Obrázek 11). Taktéž reinfekce C57Bl65 myši nevedla ke změně pH žaludku ($P > 0,05$; Obrázek 11).

5.3.4 Patologické změny žaludeční sliznice vyvolané infekcí *Cryptosporidium muris* CAT21

Během primární infekce *C. muris* CAT21 u BALB/c myši byl 7 DPI pozorován nárůst výšky sliznice s vrcholem 21 DPI, kdy průměrná výška dosahovala 549,1 μm . Rozdíly ve výšce sliznice oproti kontrole byly statisticky významné ($P < 0,05$). Posupné snižování výšky sliznice bylo zaznamenáno v období od 35. do 42. DPI, kdy výška sliznice dosahovala průměrných 359,6 – 369,7 μm ($P < 0,05$). Od 49. DPI došlo k navrácení sliznice do téměř fyziologických hodnot ($P < 0,05$). Při reinfekci k zesílení sliznice došlo již 7 DPI, kdy sliznice zesílila z hodnot naměřených v den nultý (průměrně 263,2 μm), nejvyšší hodnoty poté byly zaznamenány 56 DPI (průměrně 462,4 μm). Po tomto vrcholu hodnoty postupně klesaly.

Zánětlivé infiltráty se při primární infekci objevily 14 DPI a nejvíce jich bylo pozorováno 21 DPI, kdy tvořily přibližně 7 % z celkové tkáně. Po tomto vrcholu jich výrazně ubylo a do konce experimentu netvořily více než 1 % z tkáně. Při reinfekci byly zaznamenány již 7 DPI, kdy bylo zaznamenáno i jejich maximum – tvořily 2 % z celkové tkáně, po němž jich stejně jako v případě primární infekce ubylo pod 1 % (Obrázek 13).

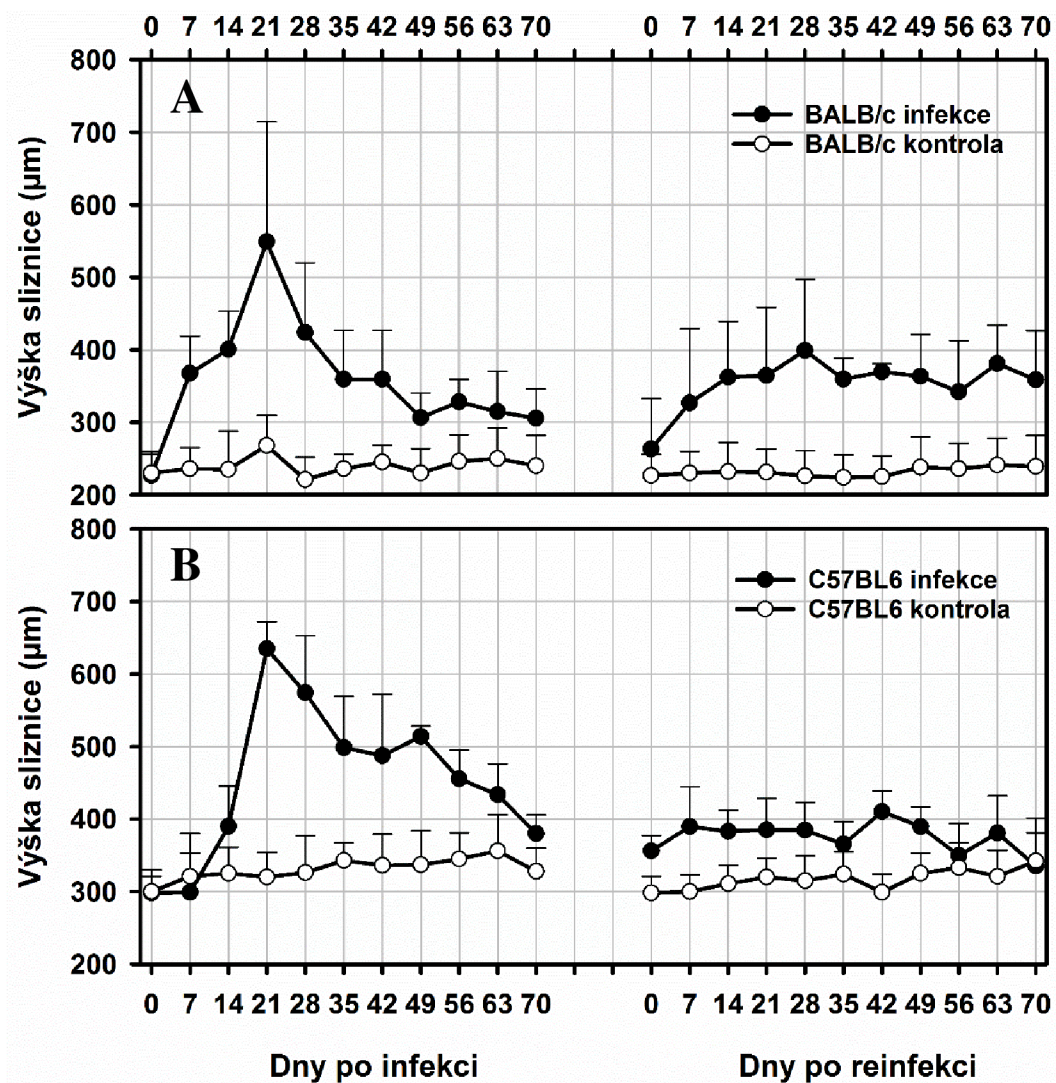
Nejvyšší intenzita při primární infekci byla zjištěna 14 DPI, kdy bylo procento infikovaných žláz téměř 70 %. Během reinfekce se v tkáni neobjevila žádná vývojová stádia (Obrázek 14).

U skupiny infikovaných C57Bl6 při primární infekci byl vrchol zesílení pozorován 21 DPI, kdy výška sliznice měřila v průměru 634,8 μm (Obrázek 12). Tloušťka sliznice se následně snižovala a 70 DPI dosáhla téměř fyziologických hodnot, nicméně rozdíly mezi skupinami byly stále statisticky významné ($P < 0,05$). Při reinfekci došlo ke zvýšení výšky sliznice oproti kontrolní skupině od 7 DPI, nicméně nebyl pozorován žádný významný vrchol v zesílení a výška sliznice se udržovala na podobných hodnotách (Obrázek 12). Od 56 DPI se výška sliznice vrátila do fyziologických hodnot ($P < 0,05$).

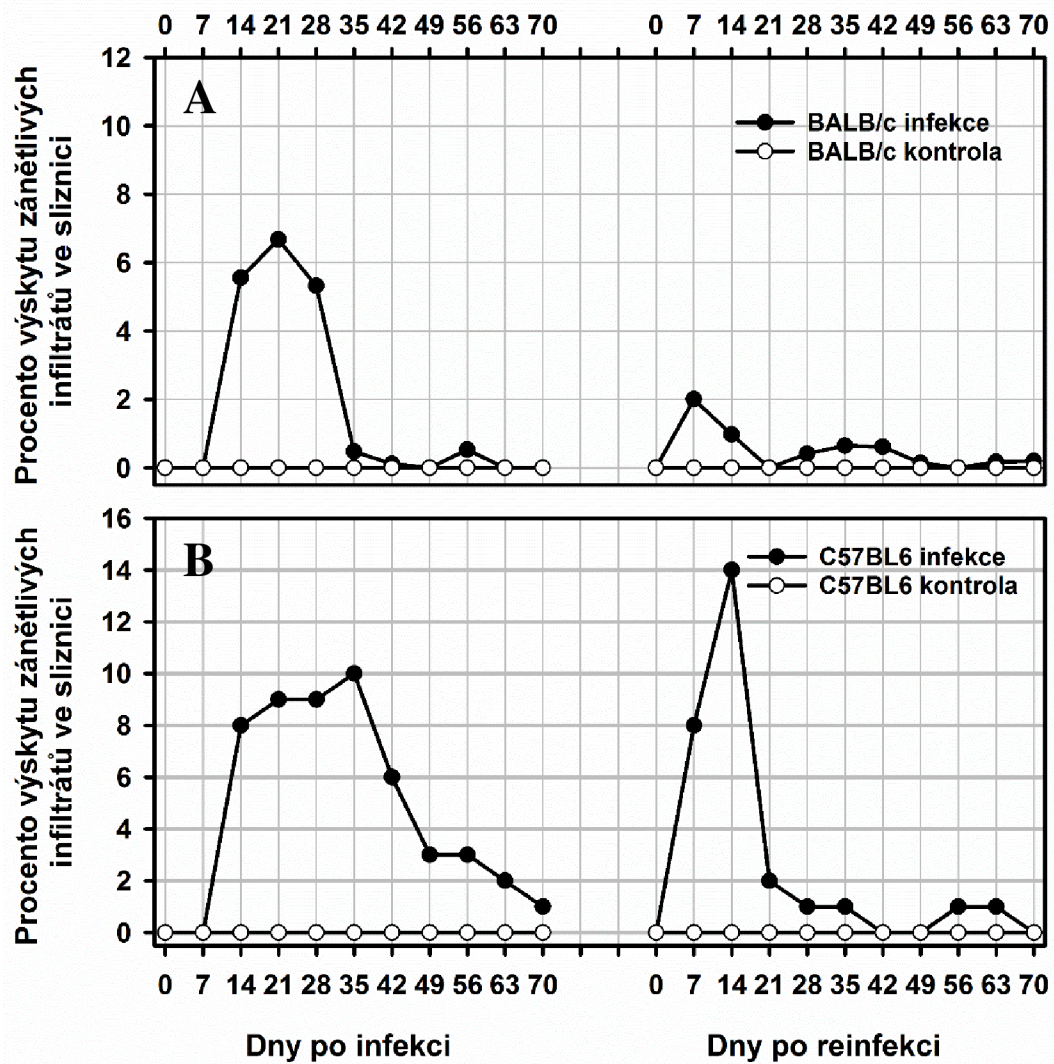
Zánětlivé infiltráty byly u C57B6 myši při primární infekci pozorovány od 14. DPI. Největší procentuální zastoupení vůči celkové tkáni bylo zaznamenáno 35 DPI, kdy tvořily 10 %. Poté jich postupně ubývalo, na hodnotu 1 % se dostaly až 70 DPI. Při následné reinfekci byly zánětlivé infiltráty pozorovány v největším zastoupení 7 DPI, kdy tvořily v průměru 8 % (obrázek 13).

Vrchol intenzity infekce nastal 21 DPI, kdy procento infikovaných žláz bylo v průměru 83 %. Stejně tak jako u předchozí skupiny BALB/c, ani u tohoto druhu myši během reinfekce nebyla v tkáni dekována žádná vývojová stádia (Obrázek 14).

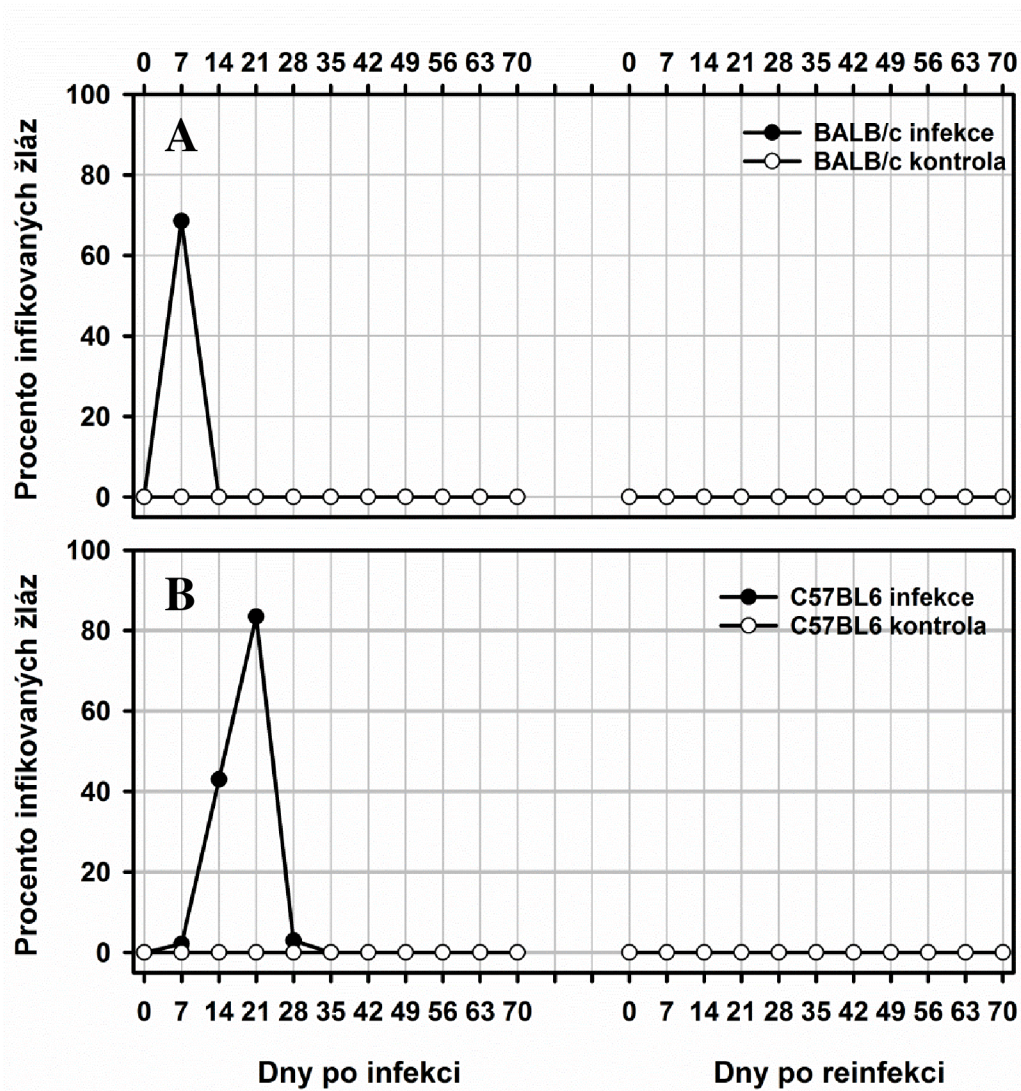
Změna výšky sliznice, přítomnost zánětlivých infiltrátů, stejně jako přítomnost kryptosporidií ve sliznici v průběhu experimentu u BALB/c a C57B16 myši infikovaných *C. muris* CAT21 jsou uvedeny v obrázcích 15–18.



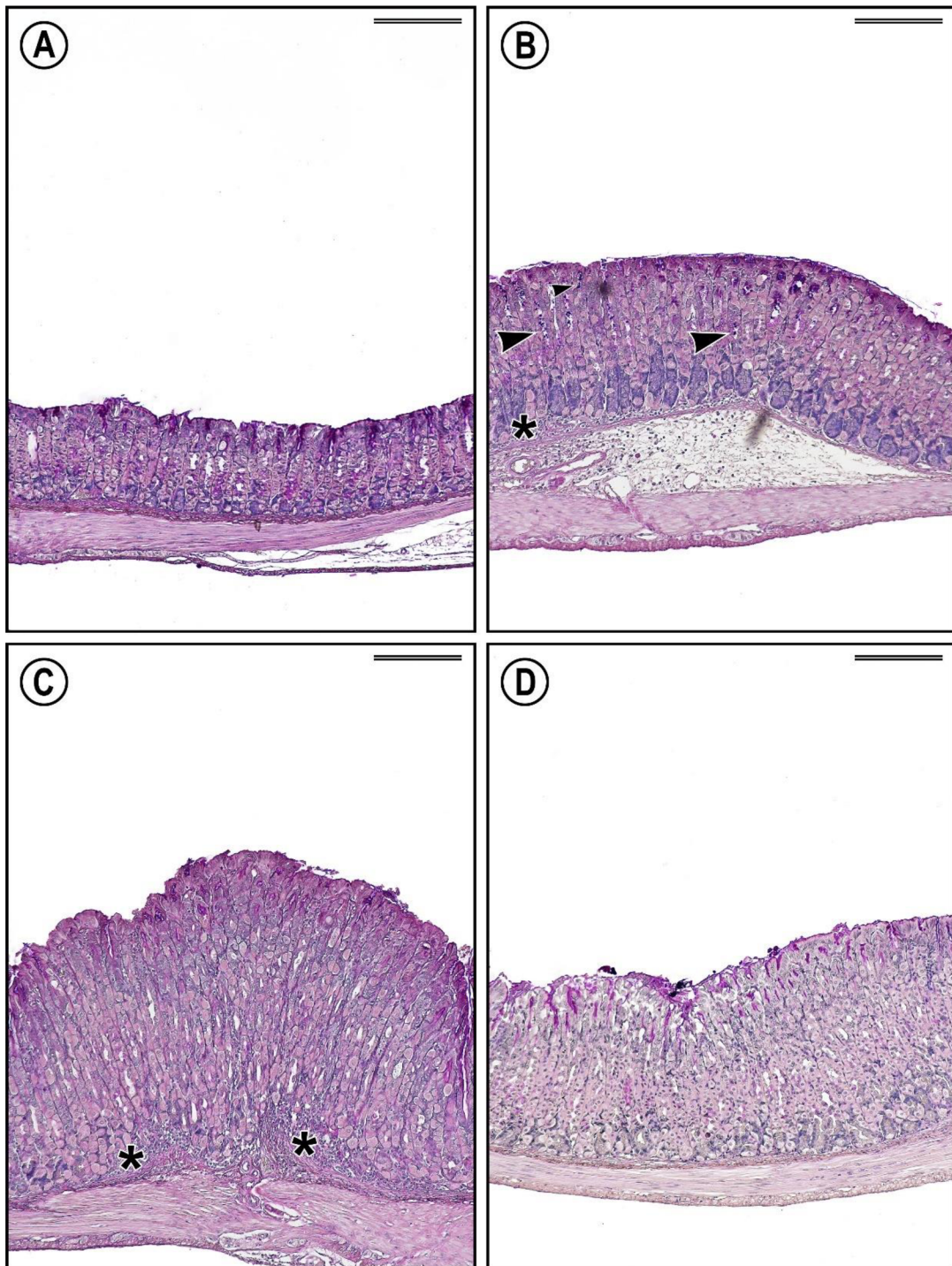
Obrázek 12: Vývoj výšky sliznice v průběhu infekce a reinfekce *Cryptosporidium muris* CAT21 u A) BALB/c myši a B) C57Bl6 myši. Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců \pm směrodatná odchylka.



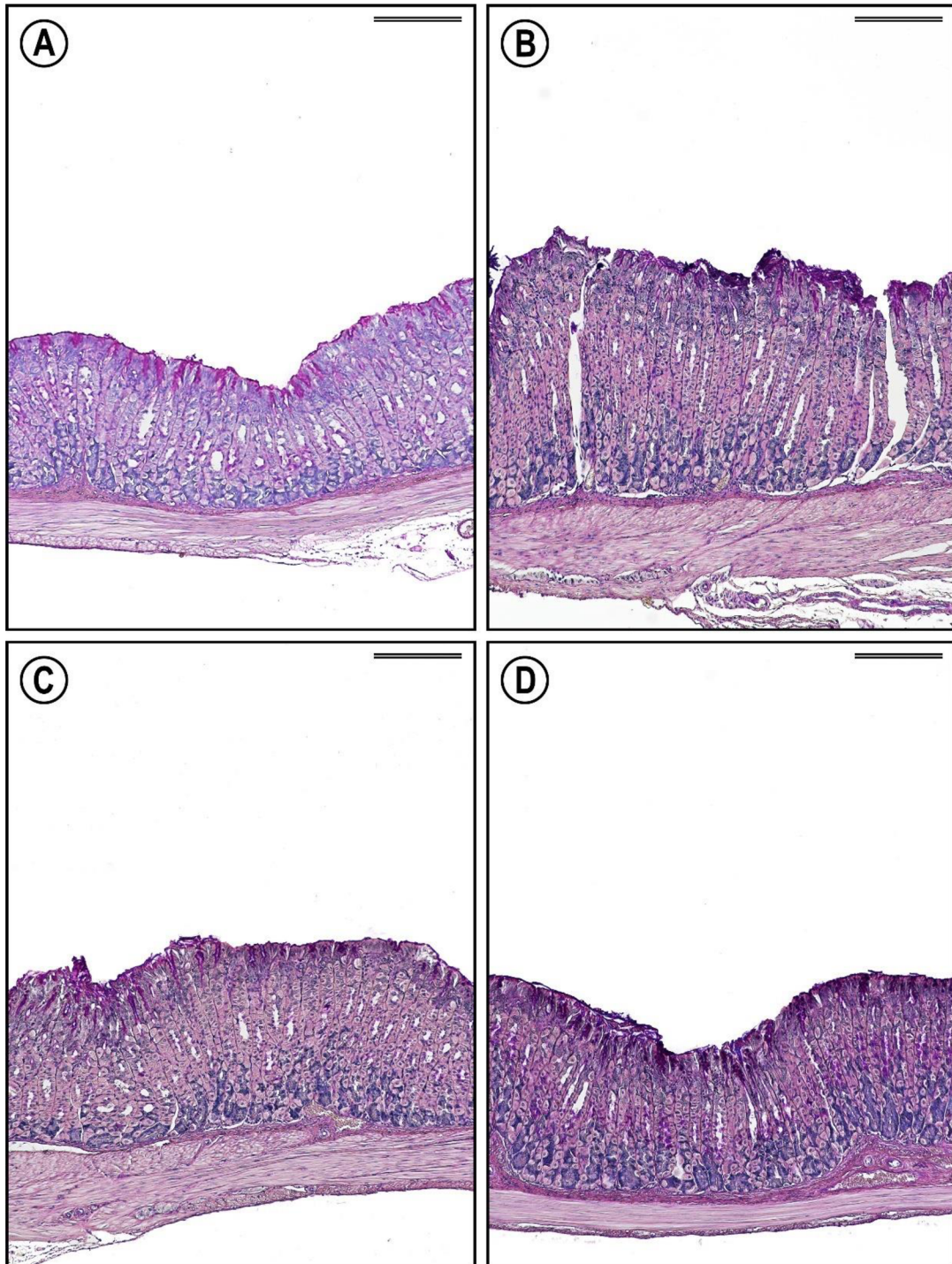
Obrázek 13: Vývoj procenta výskytu zánětlivých infiltrátů ve sliznici v průběhu infekce a reinfekce *Cryptosporidium muris* CAT21 u A) BALB/c myši a B) C57BL6 myši. Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců ± směrodatná odchylka.



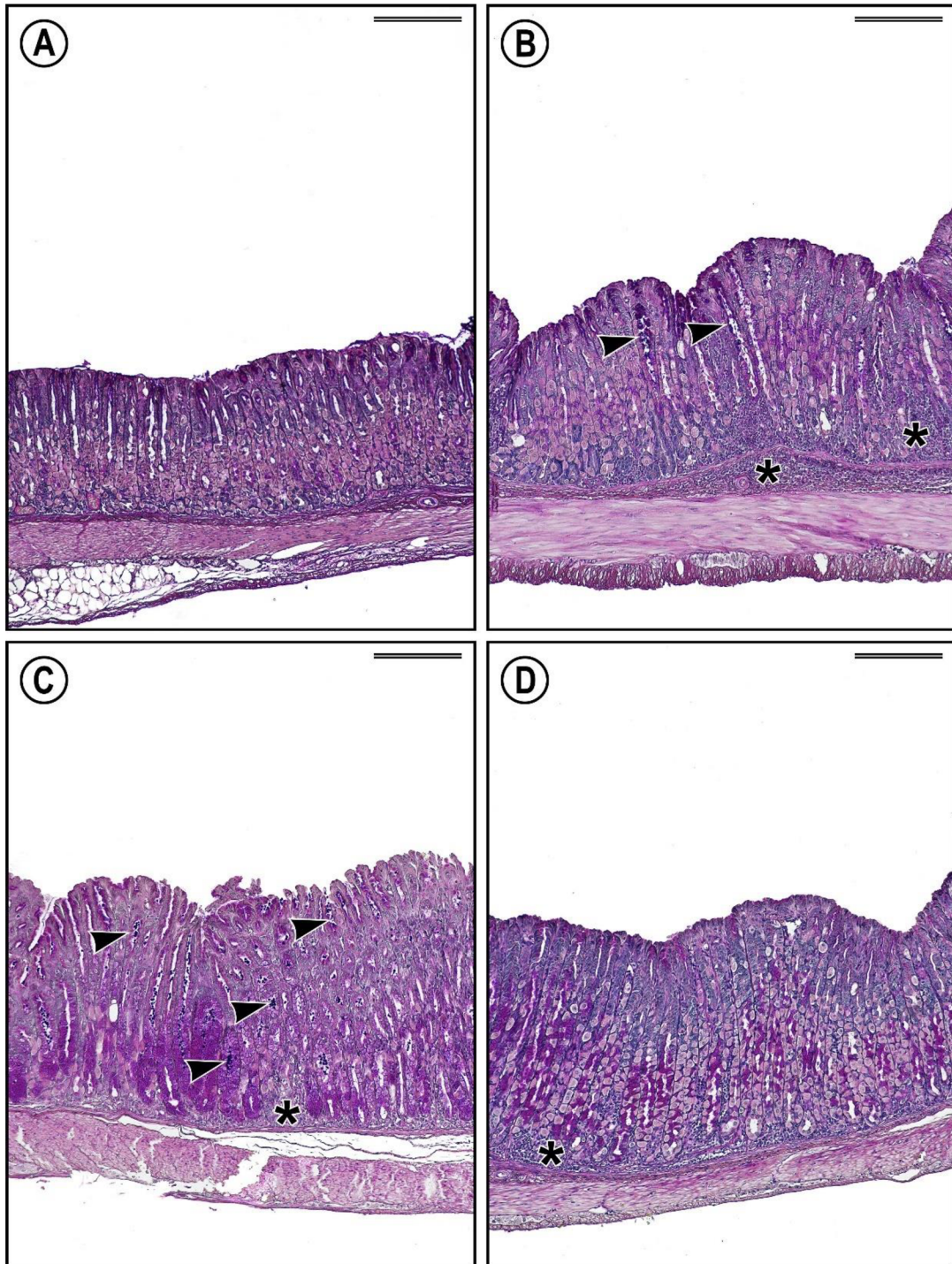
Obrázek 14: Vývoj procenta infikovaných žláz ve sliznici v průběhu infekce a reinfekce *Cryptosporidium muris* CAT21 u **A)** BALB/c myší a **B)** C57BL6 myší. Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců ± směrodatná odchylka.



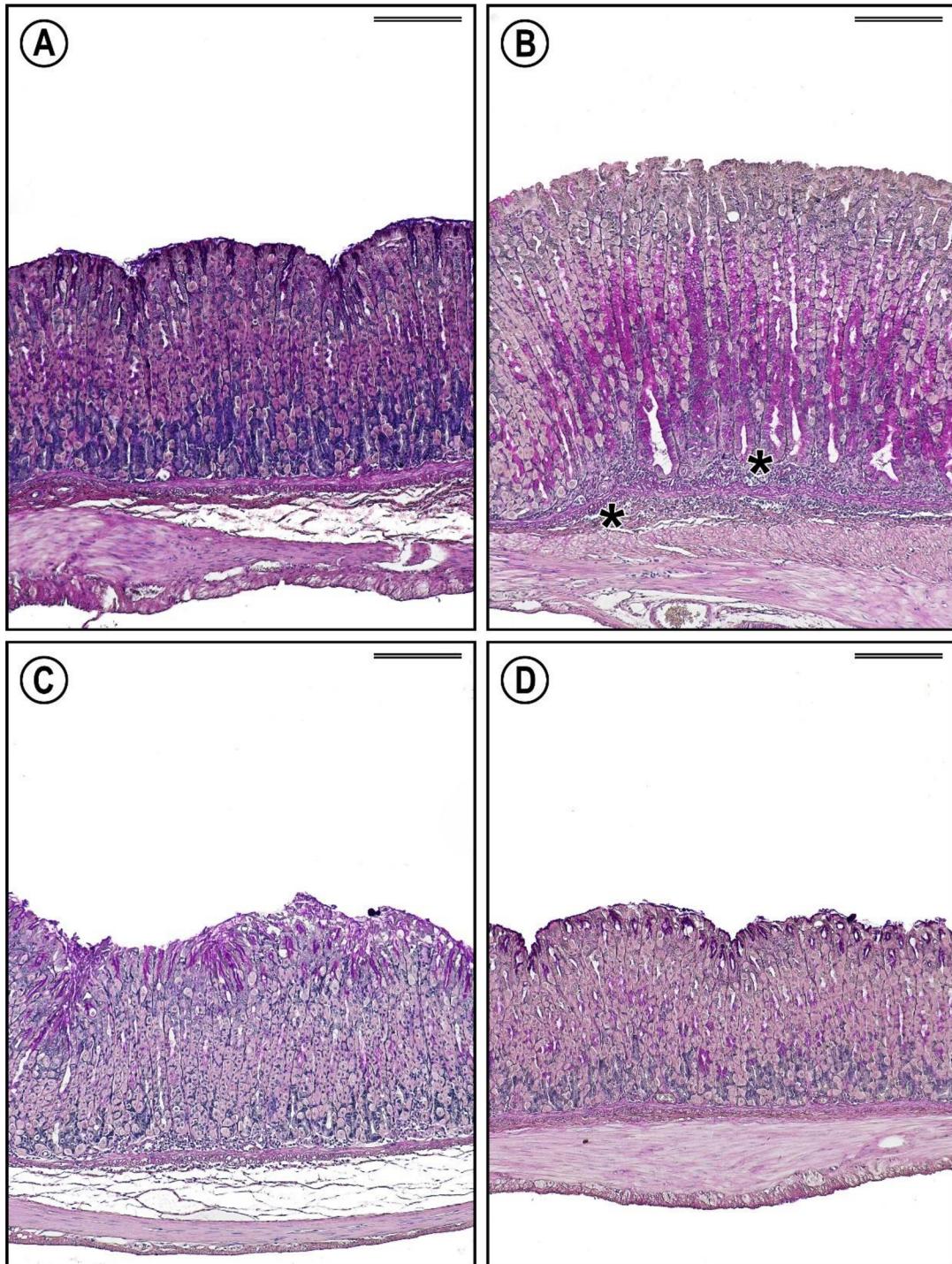
Obrázek 15: Změny na sliznici žaludku BALB/c myši s infekcí *Cryptosporidium muris* CAT21 v **A)** 0 DPI, **B)** 14 DPI, **C)** 21 DPI a **D)** 42 DPI. Histologické řezy žláznatého žaludku infikovaných myši, zpracované metodou popsanou v kapitole 4.9. DPI – dny po infekci. Šipky poukazují na přítomnost vývojových stádií *C. muris* CAT21; * znázorňuje zánětlivé infiltráty. Měřítko = 20 μ m.



Obrázek 16: Změny na sliznici žaludku BALB/c myši s reinfekcí *Cryptosporidium muris* CAT21 v **A)** 0 DPI, **B)** 14 DPI, **C)** 21 DPI a **D)** 42 DPI. Histologické řezy žláznatého žaludku infikovaných myši, zpracované metodou popsanou v kapitole 4.9. DPI – dny po infekci. Měřítko = 20 μ m.



Obrázek 17: Změny na sliznici žaludku C57Bl6 myši s infekcí *Cryptosporidium muris* CAT21 v **A)** 0 DPI, **B)** 14 DPI, **C)** 21 DPI a **D)** 42 DPI. Histologické řezy žláznatého žaludku infikovaných myši, zpracované metodou popsanou v kapitole 4.9. DPI – dny po infekci. Šipky poukazují na přítomnost vývojových stádií *C. muris* CAT21; * znázorňuje zánětlivé infiltráty. Měřítka = 20 μ m.



Obrázek 18: Změny na sliznici žaludku C57Bl6 myši s reinfekcí *Cryptosporidium muris* CAT21 v **A)** 0 DPI, **B)** 14 DPI, **C)** 21 DPI a **D)** 42 DPI. Histologické řezy žláznatého žaludku infikovaných myši, zpracované metodou popsanou v kapitole 4.9. DPI – dny po infekci. * znázorňuje zánětlivé infiltráty. Měřítko = 20 μ m.

6 Diskuze

Žaludek je klíčový orgán v gastrointestinálním traktu, který plní důležitou roli v ochraně těla před patogenními mikroorganismy. Jeho prostředí je známé pro svou vysokou kyselost, která je způsobena přítomností kyseliny chlorovodíkové (Helander *et Keeling* 1993). Kyselé prostředí žaludku má několik důležitých funkcí. Pomáhá trávicím enzymům rozkládat potravu, zajišťuje efektivní trávení a působí jako bariéra proti patogenům, které mohou být přítomny v potravě nebo vodě. Kyselé pH žaludku může zabít nebo oslabovat mnoho mikroorganismů, což snižuje riziko infekce (Martinsen *et al.* 2019). Nicméně existuje celá řada patogenů, včetně některých druhů kryptosporidií, které se tomuto prostředí přizpůsobily (Widmer *et al.* 2007).

Práce zabývající se studiem těchto patogenů ukazují, že při infekci dochází nejen k významným patologickým změnám, ale i ke změnám fyziologickým. Asi nejčastější popisovanou změnou je změna pH žaludečního obsahu. Efekt zvýšení pH zaznamenal Nicholls *et al.* (1987) u jehňat infikovaných vlasovkou *Haemonchus contortus*, kdy se hodnoty pH ve slezu zvýšily na hodnoty v rozmezí 6–6,5 během prvních 4 dnů po infekci, které však po 14 dnech po infekci klesly na hodnoty naměřené před infekcí. Zvýšení pH ve slezu infikovaných zvířat bylo zaznamenáno i v případě infekcí způsobených hlísticí *Ostertagia circumcincta* (Lawton *et al.* 1996). Také infekce bakterií *Helicobacter pylori* spojená s gastritidou a žaludečními vředy může způsobit poruchy v rovnováze pH žaludečních šťáv a ke snížení kyselosti žaludku, což může vést k různým trávicím potížím a žaludečním onemocněním (Yamaoka *et al.* 2023).

Ve spojitosti s kryptosporidiiemi v roce 1998 Anderson pozoroval změnu pH žaludku u zvířat infikovaných *C. andersoni*. U skotu infikovaného touto kryptosporidií zaznamenal zvýšení pH ve slezu na hodnoty mezi 4,5 a 5. Přitom se fyziologická hodnota pH u zdravých dojnic pohybuje mezi pH 3,5 a 4 (Anderson 1998).

S ohledem na asymptomatický průběh infekce žaludečními druhy nebyla problematika patologických změn způsobených žaludečními kryptosporidiiemi dlouho dobu studována. Marková (2022) prokázala, že při primární infekci způsobené *C. proliferans* u mastomysí, BALB/c a C57Bl6 myši dochází k obdobně jako u skotu s *C. andersoni* infekcí k signifikantnímu zvýšení pH žaludečního obsahu. V této práci jsme prokázali, že k obdobným změnám dochází i v případě infekce druhem *C. muris*. V souladu s předešlými výsledky a výsledky této práce lze učinit závěr, že organismus naivního jedince infikovaného jednou ze tří známých žaludečních kryptosporidií savců

reaguje na infekci zvýšením pH v žaludku. V souladu s výsledky Markové (2022) jsme prokázali, že v případě samovyléčení dochází k opětovnému návratu pH blízko k fyziologickým hodnotám. V případě, že je jedinec infikován celoživotně, jako je tomu v případě infekce *C. proliferans* u mastomyší, nedochází k poklesu pH v žaludku. Tyto výsledky odpovídají výsledkům Andersona (1998), který detekoval fyziologické změny u zvířat na jatkách, a lze předpokládat, že zvířata s infekcí *C. andersoni* byla infikována dlouhodobě. Studie provedená Kváčem a Vítovcem (2003) potvrzuje celoživotní infekci *C. andersoni* u skotu.

Zvýšené pH pravděpodobně pomáhá k lepší infekci a motilitě zoitů žaludečních kryptosporidií. Widmer *et al.* (2007) prokázali, že žaludeční kryptosporidie excystují v teplé vodě, tedy v roztoku s pH okolo 7,5. K obdobným závěrům dospěly i Dudáková (2022) a Schulzová (2022). Navíc nízké pH stimuluje zoity k vyšší aktivitě, čímž dochází k jejich rychlému vyčerpání a ztrátě infekivity (Roiko *et al.* 2014; Sateriale *et al.* 2021). Pokus o snížení pH žaludku a tím o zmírnění infekce pomocí napájení okyselenou vodou neměl na intenzitu infekce *C. proliferans* žádný vliv. Je možné, že k částečnému omezení infekivity a motility došlo, nicméně intenzita infekce byla příliš vysoká a toto snížení nemělo na zatížení hostitele parazity významný vliv.

Zajímavé je, že nárůst pH žaludečního obsahu jsme pozorovali pouze v případě reinfekcí *C. proliferans*, zatímco při reinfekci *C. muris* CAT21 ke změně pH nedošlo, přestože v obou případech jak BALB/c, tak C57Bl/6 hostitelé na reinfekci reagovali signifikantní proliferací sliznice a migrací leukocytů do *lamina propria*. Tyto výsledky odpovídají zjištění Jalovecké (2010), která prokázala migraci a proliferaci leukocytů ve sliznici žaludku myší reinfikovaných *C. proliferans*. Zvýšená migrace a proliferace buněk imunitního systému byla popsána i v případě infekce *C. muris* u myší a *C. andersoni* u skotu a myší (Anderson 1998; Kváč *et al.* 2016; Melicherová *et al.* 2014; Matsubayashi *et al.* 2010).

Kváč *et al.* (2011) prokázali, že rozhodující úlohu ve zvládnutí infekce žaludečními kryptosporidii hraje buněčná imunita, zejména CD4 a CD8 T lymfocyty. U myší kmene BALB/c myší, jejichž imunitní odpověď je spojována s Th2 humorální imunitou, jsme v naší práci detekovali poloviční množství zánětlivých infiltrátů v porovnání s kmenem C57Bl/6, který je spojován Th1 buněčnou odpovědí (Fukushima *et al.* 2006). U BALB/c myší infikovaných *C. muris* CAT21 jsme pozorovali zvyšování procentuálního zastoupení zánětlivých infiltrátů do 21 DPI. Oproti myším BALB/c infikovaných *C. proliferans* však infiltráty z tkáně vymizely podstatně rychleji

(Marková 2020). U C57Bl6 myši byly zaznamenány zánětlivé infiltráty v největším zastoupení 35 DPI, což je o týden později, než tomu bylo v případě infekce *C. proliferans* (Marková 2020). Během reinfekce *C. muris* CAT21 se zánětlivé infiltráty v tkáni objevily opětovně, přestože u obou typů hlodavců v ne tak vysoké míře jako při primární infekci. Stejně jako Jalovecká *et al.* (2010) jsme ani my nezaznamenali ve sliznici žaludku kontrolních neinfikovaných myši a mastomyši přítomnost infiltrátů buněk imunitního systému.

Během reinfekcí *C. proliferans* i *C. muris* CAT21 nebyly detekovány žádné oocysty v trusu, ani v histologických preparátech vyhotovených ze vzorků žaludků experimentálně reinfikovaných hlodavců. Toto zjištění odpovídá výsledkům Jalovecké *et al.* (2010), kteří nepozorovali oocysty ve vzorcích trusu zvířat reinfikovaných *C. proliferans*, a výsledkům Millera a Schaefera (2007), v jejichž práci je popsána absence oocyst v trusu v případě reinfekce *C. muris*.

Detekce specifické DNA *C. muris* CAT21 metodou qPCR zjistila přítomnost parazitů u obou druhů myši BALB/c i C57Bl6 od 7 do 56 DPI, což je výrazně déle, než uvádí Tinavská (2023) ve své práci. U myši typu BALB/c nakažených stejným druhem kryptosporidie detekovala specifickou DNA od 11 do 42 DPI. Rozdíl v uváděných výsledcích je způsoben citlivostí použité metody. Zatímco Tinavská (2023) používala mikroskopické metody s citlivostí 2000 oocyst na gram trusu a detekci specifické DNA v trusu pomocí PCR, která má sice vysokou senzitivitu, ale je závislá na přítomnosti oocyst v trusu, my jsme v naší práci použili qPCR metodu s citivostí 10 kopií genu cryptosporidií přímo v místě infekce. Je možné, že infekce *C. muris* i *C. proliferans* přetrvává v žaludku hostitele ve formě nepohlavního množení delší dobu, přičemž hostitel nevylučuje žádné oocysty. Těmto výsledkům odpovídá i studie provedená Yangem a Healeyem (1993), kteří pomocí imunosuprese dexametazonem vyvolali relaps infekce *C. parvum* u myši, které již nevylučovaly téměř žádné oocysty.

Další změnou, která je při infekci žaludečními kryptosporidie detekována je zvýšení výšky sliznice. Anderson (1998) u skotu s *C. andersoni* infekcí zaznamenal viditelné změny ve struktuře slezu u dlouhodobě nakažených zvířat – sliznice slezu dlouhodobě nemocného skotu byla zesílená a kvůli tomuto fenoménu došlo ke zvýšení celkové hmotnosti slezu infikovaných zvířat v porovnání s hmotnostmi slezu zdravých zvířat. Obdobné změny popsali i Matsubayashi *et al.* (2010) u hlodavců infikovaných *C. andersoni*. U infikovaných myši po 1. týdnu nepozoroval žádné histopatologické změny stěny žaludku, přestože detekoval přítomnost parazitů ve sliznici žaludku a ve

svrchní části foveol. Po 2–4 týdnech infekce došlo k zesílení sliznice v okolí žaludečních žláz, a to až trojnásobně. 12. týden po infekci byla sliznice zesílená až pětinašobně, a i v tomto období obsahovaly žlázy vývojová stadia parazitů (Matsubayashi *et al.* 2010). Výsledky naší práce se shodují s předchozími daty. Zesílení sliznice po infekci *C. proliferans* je jednoznačně patrné i u krátkodobých infekcí BALB/c a C57Bl6 myši, nicméně v případě infikovaných mastomyši s celoživotní infekcí je zesílení sliznice ještě markantnější (Kváč *et al.* 2016; Marková 2022). Oproti infikovaným mastomyším však u BALB/c a C57Bl6 hlodavců došlo po samovyléčení k pozvolnému poklesu výšky sliznice. Stejně tomu tak bylo v případě infekce *C. muris* CAT21 v naší práci. U reinfikovaných BALB/c a C57Bl6 myši *C. proliferans* a *C. muris* CAT21 došlo taktéž k zesílení sliznice, ačkoli u hlodavců reinfikovaných *C. muris* CAT21 nebylo tak výrazné jako v případě primární infekce. K zesílení došlo i přestože se ve sliznici neobjevily žádné žlázy zasažené infekcí a intenzita infekce byla nižší než v případě primární infekce. Reakci žaludku při reinfekci potvrzuje i pozorování Jalovecké *et al.* (2010), která popsala nárůst koncentrace T lymfocytů u hlodavců reinfikovaných *C. muris*.

7 Závěr

Reinfekce *C. proliferans* u mastomyší a infekce a reinfekce *C. muris* CAT21 u BALB/c a C57Bl6 myši má přímý vliv na změnu pH žaludečního obsahu hostitele a na proliferaci sliznice, což vede k zesílení sliznice a tím pádem ke zvýšení hmotnosti samotného žaludku. Po samovyléčení BALB/c a C57Bl6 myši z infekce i reinfekce *C. proliferans* i *C. muris* CAT21 dochází k návratu pH i morfometrických hodnot téměř na fyziologické hodnoty.

U mastomyší s infekcí *C. proliferans* napájených okyselenou vodou (pH 3,3) nebylo zaznamenáno zvýšení pH žaludku, jak tomu bylo u infikovaných mastomyší napájené vodou o pH 7,5. U obou skupin však byly pozorovány stejné histopatologické změny žaludku, z čehož vyplývá, že změna pH nemá vliv na vývoj patologických změn sliznice.

8 Seznam použité literatury

- ALVAREZ-PELLITERO, P. a SITJÀ-BOBADILLA, A., 2002.** *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*. 32(8), 1007–1021. ISSN 0020-7519.
- ANDERSON, B. C., 1991.** Experimental infection in mice of *Cryptosporidium muris* isolated from a camel. *The Journal of Protozoology*. 38(6), 16–17.
- ANDERSON, B. C., 1998.** Cryptosporidiosis in bovine and human health. *Journal of Dairy Science*. 81(11), 3036–3041. ISSN 0022-0302.
- ARROWOOD, M. J. a STERLING, Ch. R., 1987.** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. *The Journal of Parasitology*. 73(2), 314–319. ISSN 0022-3395.
- ARROWOOD, M. J. a DONALDSON, K., 1996.** Improved purification methods for calfd *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 43(5), 89S. ISSN 1550-7408.
- BOLLAND, S. J., ZAHEDI, A., OSKAM, Ch., MURPHY, B. a RYAN, U., 2020.** *Cryptosporidium bollandi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiiae) from angelfish (*Pterophyllum scalare*) and Oscar fish (*Astronotus ocellatus*). *Experimental Parasitology*. 217. ISSN 0014-4894.
- BROWNSTEIN, D. G., STRANDBERG, J. D., MONTALI, R. J., BUSH M. a FORTNER J., 1977.** *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. *Veterinary Pathology*. 14(6), 606–617.
- BYRD, J. C., YUNKER, C. K., XU, Q. S., STERNBERG, L. R. a BRESALIER, R. S., 2000.** Inhibition of gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 118(6), 1072–9.
- CARRENO, R. A., MARTIN, D. S. a BARTA, J. R., 1999.** *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis

of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*. 85(11), 899–904. ISSN 1432-1955.

CURRENT, W. L., UPTON, S. J. a HAYNES, T. B., 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology*. 33(2), 289–296. ISSN 0022-3921.

CURRENT, W. L. a GARCIA, L. S., 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 4(3), 325–358. ISSN 0893-8512.

DUDÁKOVÁ, H., 2022. Faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií přežvýkavců. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita, Fakulta zemědělská a technologická. Pp. 53.

ESTEBAN, E. a ANDERSON, B. C., 1995. *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *Journal of Dairy Science*. 78(5), 1068–1072. ISSN 0022-0302.

FAYER, R. a XIAO, L., 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. ISSN 0022-3921.

FAYER, R. a XIAO, L., 2008. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2. vyd. Florida: CRC Press. ISBN 978-14-20052-26-8.

FUKUSHIMA, A., YAMAGUCHI, T., ISHIDA, W., FUKATA, K., TANIGUCHI, T., LIU, F. T. a UENO, H., 2006. Genetic background determines susceptibility to experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis: comparison of Balb/c and C57BL/6 mice. *Experimental eye research*, 82(2), 210–218.

HELANDER, H. F. a KEELING, D. J., 1993. Cell biology of gastric acid secretion. *Bailliere's clinical gastroenterology*. 7(1), 1–21.

HOLUBOVÁ, N., ZIKMUNDOVÁ, V., LIMPOUCHOVÁ, Z., SAK, B., KONEČNÝ, R., HLÁSKOVÁ, L., RAJSKÝ, D., KOPACZ, Z., McEVOY, J. a KVÁČ, M., 2019. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa:

- Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *European Journal of Protistology*. 69, 70–87. ISSN 0932-4739.
- HUANG, B. Q., CHEN, X., LaRUSSO a N. F., 2004.** *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro: a morphologic study. *The Journal of Parasitology*. 90(2), 212–221. ISSN 0022-3395.
- JALOVECKÁ M., 2009.** Imunitní odpověď myši na infekci žaludečnými kryptosporidii. Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta. Pp. 49.
- JALOVECKÁ, M., SAK, B., KVÁČ, M., KVĚTOŇOVÁ, D., KUČEROVÁ, Z. a SALÁT, J., 2010.** Activation of protective cell-mediated immune response in gastric mucosa during *Cryptosporidium muris* infection and re-infection in immunocompetent mice. *Parasitology Research*. 106(5), 1159–1166. ISSN 1432-1955.
- JIRKŮ, M., VALIGUROVÁ, A., KOUDELA, B., KŘÍŽEK, J., MODRÝ, D. a ŠLAPETA, J., 2008.** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*. 55(2), 81–94. ISSN 1803-6465.
- KAMISAGO, S., IWAMORI, M., TAI, T., MITAMURA, K., YAZAKI, Y. a SUGANO, K., 1996.** Role of sulfatides in adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells. *Infection and Immunity*. 64, 624–628. ISSN 0019-9567.
- KVÁČ, M. a VÍTOVEC, J., 2003.** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Medicine*. 50(9), 451–457.
- KVÁČ, M., ONDRÁČKOVÁ, Z., KVĚTOŇOVÁ, D., SAK, B. a VÍTOVEC, J., 2007.** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology*. 143(3), 229–233.
- KVÁČ, M., SAK, B., KVĚTOŇOVÁ, D. a SECOR, W. E., 2009.** Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Veterinary Parasitology*. 163(1–2), 33–38.

- KVÁČ, M., KODÁDKOVÁ, A., SAK, B., KVĚTOŇOVÁ, D., JALOVECKÁ, M., ROST, M. a SALÁT, J., 2011.** Activated CD8+ T cells contribute to clearance of gastric *Cryptosporidium muris* infections. *Parasite immunology*. 33(4), 210–216. ISSN 1365-3024.
- KVÁČ, M., HAVRDOVÁ, N., HLÁSKOVÁ, L., DAŇKOVÁ, T., KANDĚRA, J., JEŽKOVÁ, J., VÍTOVEC, J., SAK, B., ORTEGA, Y., XIAO, L., MODRÝ, D., CHELLADURAI, J. R. J. J., PRANTLOVÁ, V. a McEVOY, J., 2016.** *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLOS One*. 11(1).
- LAWTON, D. E., REYNOLDS, G. W., HODGKINSON, S. M., POMROYI, M. Y. a SIMPSON, H. V., 1996.** Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: effects on abomasal pH and serum gastrin and pepsinogen. *International journal for parasitology*. 26(10), 1063–1074. ISSN 1879-0135.
- LEVINE, N. D., 1980.** Some corrections of Coccidian (Apicomplexa: Protozoa) Nomenclature. *The Journal of Parasitology*. 66(5), 830–834. ISSN 0022-3395.
- LINDSAY, D. S., UPTON, S. J., OWENS, D. S., MORGAN, U. M., MEAD, J. R. a BLAGBURN, B. L., 2000.** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47(1), 91–95. ISSN 1550-7408.
- MacKENZIE, W. R., HOXIE, N. J., PROCTOR, M. E., GRADUS, M. S., BLAIR, K. A., PETERSON, D. E., KAZMIERCZAK, J. J., ADDISS, D. G., FOX, K. R., ROSE, J. B. a DAVIS, J. P., 1994.** A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*. 331(3), 161–167. ISSN 0028-4793.
- MARKOVÁ, M., 2022.** Funkční a patologické změny žaludku hostitelů infikovaných různými druhy a genotypy žaludečních kryptosporidie. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita, Fakulta zemědělská a technologická. Pp. 46.
- MARTINSEN, T. C., FOSSMARK, R. a WALDUM, H. L., 2019.** The Phylogeny and Biological Function of Gastric Juice-Microbiological Consequences of

Removing Gastric Acid. *International journal of molecular sciences*. 20(23), 6031. ISSN 1422-0067.

MATSUBAYASHI, M., ANDO, H., KIMATA, I., TAKASE, H., NAKAGAWA, H., FURUYA, M., TANI, H. a SASI, K., 2010. 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. ISSN 0020-7519.

MEISEL, J. L., PERERA, D. R., MELIGRO, C. a RUBIN, C. E., 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*. 70(6), 1156–1160. ISSN 0016-5085.

MELICHEROVÁ, J., ILGOVÁ, J., KVÁČ, M., SAK, B., KOUDELA, B. a VALIGUROVÁ, A., 2014. Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology*. 141(2), 287–303. ISSN 0031-1820.

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. ISSN 1803-6465.

MILLER, T. a SCHAEFER, F. W., 2007. Characterization of a *Cryptosporidium muris* infection and reinfection in CF-1 mice. *Veterinary parasitology*. 144(3-4), 208–221. ISSN 1873-2550.

NICHOLLS, C. D., HAYES, P. R. a LEE, D. L., 1987. Physiological and microbiological changes in the abomasum of sheep infected with large doses of *Haemonchus contortus*. *Journal of Comparative Pathology*. 97, 299–308. ISSN 1532-3129.

NIME, F. A., BUREK, J. D., PAGE, D. L., HOLSCHEER, M. A. a YARDLEY, J. H., 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 70(4), 592–598. ISSN 0016-5085.

PAVLÁSEK, I., 1999. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství*. 3, 290–301.

- PREDIGER, J., JEŽKOVÁ, J., HOLUBOVÁ, N., SAK, B., KONEČNÝ R., ROST, M., McEVOY, J., RAJSKÝ, D. a KVÁČ, M., 2021.** *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. (Api complexa: Cryptosporidiidae) in Eurasian Red Squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Microorganisms*. 9(10), 2050.
- ROIKO, M. S., SVEZHOVA, N. a CARRUTHERS, V. B., 2014.** Acidification activates *Toxoplasma gondii* motility and egress by enhancing protein secretion and cytolytic activity. *Public Library of Science Pathogens*. 10(11).
- RYAN, U., PAPANINI, A., TONG, K., YANG, R., GIBSON-KUEH, S., O'HARA, A., LYMBREY, A. a XIAO, L., 2015.** *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*. 150, 31–35.
- RYAN U. M., PAPANINI A., MONIS P. a HIJJAWI N., 2016.** It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*. 105, 305–313.
- RYAN, U., ZAHEDI, A., FENG, Y. a XIAO, L., 2021.** An update on zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes in humans. *Animals*. 11(11), 3307.
- SCHULZOVÁ, T., 2022.** Faktory ovlivňující excystaci žaludečních kryptosporidií hlodavců. České Budějovice. Diplomová práce, Jihočeská univerzita, Fakulta zemědělská a technologická. Pp. 43.
- SATERIALE, A., GULLICKSRUD, J. A., ENGILES, J. B., MCLEOD, B. I., KUGLER, E. M., HENAO-MEJIA, J., ZHOU, T., RING, A. M., BRODSKY, I. E., HUNTER, C. A. a STRIEPEN, B., 2021.** The intestinal parasite *Cryptosporidium* is controlled by an enterocyte intrinsic inflammasome that depends on NLRP6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 118(2).
- SIMON, P. M., GOODE, P. L., MOBASERRI, A. a ZOPF, D., 1997.** Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharide. *Infection and Immunity*. 65, 750–757. ISSN 0019-9567.

- SIMPSON, H. V., UMAIR, S., HOANG, V. C. a SAVOIAN, M. S., 2016.** Histochemical study of the effects on abomasal mucins of *Haemonchus contortus* or *Teladorsagia circumcincta* infection in lambs. *Veterinary Parasitology*. 226, 210–221. ISSN 1873-2550.
- SLAVIN, D., 1955.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*. 65(3), 262–266.
- SMITH, H. V., NICHOLS, R. A. B. a GRIMASON, A. M., 2005.** *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*. 21(3), 133–142.
- TAYLOR, M. A., MARSHALL, R. N., GREEN, J. A. a CATCHPOLE, J., 1999.** The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. *Veterinary Parasitology*. 86, 41–48.
- TINAVSKÁ, J., 2021.** Vývoj protilátkové imunitní odpovědi proti kryptosporidiovým infekcím. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta. Pp. 61.
- TINAVSKÁ, J., 2023.** Vnitrodruhová variabilita *Cryptosporidium muris*. Diplomová práce, Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta. Pp. 84.
- 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, 12–13. ISSN 0003-9365.
- TYZZER, E. E., 1910.** An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of Medical Research*. 23(3), 487–510.3. ISSN 2395-7565.
- 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.
- VALIGUROVÁ, A., HOFMANNOVÁ, L., KOUDELA, B. a VÁVRA, J., 2007.** An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 54(6), 495–510.

- VALIGUROVÁ, A., JIRKŮ, M., KOUDELA, B., GELNAR, M., MODRÝ, D. a ŠLAPETA, J., 2008.** Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *International Journal for Parasitology*. 38(8), 913–922.
- VERNYGORODSKYJ, S., 2013.** Immunohistochemical evaluation of mucin expression in precancerous tissue of stomach. *Experimental Oncology*. 35(2), 114–7.
- WIDMER, G., KLEIN, P. a BONILLA, R., 2007.** Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology*. 134(11), 1583–1588.
- XIAO, L., ESCALANTE, L., YANG, Ch., SULAIMAN, I., ESCALANTE, A. A., MONTALI, R. J., FAYER, R. a LAL, A. A., 1999.** Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(4), 1578–83. ISSN 0099-2240.
- YAMAOKA, Y., SARUULJAVKHLAN, B., ALFARAY, R. I. a LINZ, B., 2023.** Pathogenomics of *Helicobacter pylori*. *Current topics in microbiology and immunology*. 444, 117–155. ISSN 2196-9965.
- YANG, S. a HEALEY, M. C., 1993.** The immunosuppressive effects of dexamethasone administered in drinking water to C57BL/6N mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Parasitology*. 79(4), 626–630. ISSN 0022-3395.