



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra zootechnických věd

Bakalářská práce

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

Autorka práce: Marie Marková

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

Konzultant práce: doc. Ing. Roman Konečný, Ph.D.

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 17.3.2022

.....
Podpis

Abstrakt

Cílem této práce bylo sledovat a zaznamenat, jaký vliv má infekce žaludečními druhy rodu *Cryptosporidium* na vlastnosti žaludku svých hostitelů. Pro sérii experimentálních infekcí byl použit druh *Cryptosporidium proliferans*, jako experimentální zvířata byly použity tři typy modelových hostitelů – myši typu BALB/c, C57Bl6 a mastomyši (*Mastomys coucha*). Standardními parazitologickými, specificky barvicími a molekulárními metodami byly detekovány oocysty v trusu infikovaných zvířat a byl popsán průběh infekce a patogenita daného druhu *Cryptosporidium*. Skupiny zvířat zahrnující 1-3 kusy byly humánně zabíjeny v sedmidenních intervalech až do 70 dnů po infekci. Bylo zjištěno, že *C. proliferans* má u vybraných typů hostitelů přímý vliv na změnu pH, kdy dochází k jeho zvýšení ve vrcholu infekce a v závislosti na typu hostitele buďto k jeho zvyšování do konce experimentu, anebo v případě samovyléčení k jeho postupnému návratu na fyziologické hodnoty. Histologickými metodami byly v průběhu infekce zaznamenány patologické změny sliznice žaludku, kterými bylo její zesílení a zvýšená tvorba hlenu, dále přítomnost zánětlivých infiltrátů a intenzita infekce, a to v různém rozsahu napříč vybranými hostiteli a průběhem infekce. Zjistili jsme, že i v případě krátkodobé infekce u BALB/c a C57Bl6 myši dochází ke zvětšení i zesílení sliznice, přestože u těchto typů myši patologické změny nejsou tak rozsáhlé, jako v případě mastomyši, u nichž nedochází k samovyléčení.

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

Abstract

The aim of this study was to observe and record the effect of infection with gastric species of the genus *Cryptosporidium* on the gastric characteristics of their hosts. The species *Cryptosporidium proliferans* was used for a series of experimental infections, and three types of model hosts – BALB/c mice, C57Bl6 mice and multimammate mice (*Mastomys coucha*) – were used as experimental animals. Oocysts were detected in the faeces of infected animals by standard parasitological, specific staining and molecular methods and the course of infection and pathogenicity of the *Cryptosporidium* species were described. Groups of animals comprising of 1-3 animals were humanely euthanized at seven-day intervals up to 70 days after infection. *C. proliferans* was found to have a direct effect on pH change in selected host types, with an increase in pH at the peak of infection and, depending on the host type, either an increase until the end of the experiment or, in the case of self-healing, a gradual return to physiological values. Pathological changes of the gastric mucosa during the course of the infection were recorded by histological methods, which were its thickening and increased mucus production, as well as the presence of inflammatory infiltrates and the intensity of the infection, to varying degrees across the selected hosts and the course of the infection. We found that even with short-term infection in BALB/c and C57Bl6 mice, there is both mucosal enlargement and thickening, although the pathological changes in these types of mice are not as extensive as in multimammate mice, which do not self-heal.

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

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu prof. Ing. Martinu Kváčovi za jeho odborné vedení mé práce, podnětné rady a obdivuhodnou ochotu. Dále bych chtěla poděkovat konzultantu doc. Ing. Romanu Konečnému, Ph.D. za pomoc při zpracování 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 zpracování této práce věnovali, i mé rodině za podporu při studiu.

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

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Úvod..... | 8 |
| 2 | Literární přehled..... | 9 |
| 2.1 | Rod <i>Cryptosporidium</i> | 9 |
| 2.1.1 | Historie – žaludeční kryptosporidie savců..... | 9 |
| 2.1.2 | Taxonomie..... | 10 |
| 2.1.1 | Vývojový cyklus..... | 10 |
| 2.1.2 | Hostitelská a tkáňová specifita..... | 11 |
| 2.2 | Žaludeční kryptosporidie..... | 12 |
| 2.2.1 | Druhy žaludečních kryptosporidií..... | 12 |
| 2.2.2 | Klinické a histopatologické příznaky..... | 13 |
| 2.2.3 | Patogenita žaludečních kryptosporidií savců..... | 14 |
| 3 | Cíle práce..... | 15 |
| 4 | Materiál a metody..... | 16 |
| 4.1 | Zdroj oocyst..... | 16 |
| 4.2 | Experimentální zvířata..... | 16 |
| 4.3 | Purifikace oocyst..... | 16 |
| 4.3.1 | Čištění na sacharózovém gradientu (Arrowood a Sterling 1987)..... | 16 |
| 4.3.2 | Čištění na cesium chloridovém gradientu (Arrowood a Donaldson 1996) | 17 |
| 4.4 | Infekční dávka..... | 18 |
| 4.5 | Barvení oocyst..... | 18 |
| 4.5.1 | Barvení oocyst dle Miláčka a Vítovce (Miláček a Vítovec 1985)..... | 18 |
| 4.6 | Ověření identity izolátu..... | 18 |
| 4.6.1 | Izolace DNA..... | 18 |
| 4.6.2 | Polymerázová řetězová reakce (PCR)..... | 19 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.6.3 | Gelová elektroforéza..... | 20 |
| 4.6.4 | Genotypizace | 21 |
| 4.7 | Design experimentu | 21 |
| 4.8 | Intenzita kryptosporidiové infekce | 21 |
| 4.9 | Měření pH | 22 |
| 4.10 | Histologické zpracování vzorků a analýza histologických řezů | 22 |
| 4.11 | Hodnocení patogenity a intenzity infekce na histologických řezech | 23 |
| 4.12 | Statistické zpracování..... | 24 |
| 5 | Výsledky | 25 |
| 5.1 | Identita izolátu | 25 |
| 5.2 | Infektivita izolátu..... | 25 |
| 5.3 | Vliv infekce na změnu pH v žaludku..... | 27 |
| 5.4 | Patologické změny sliznice žaludku v důsledku infekce <i>Cryptosporidium proliferans</i> | 28 |
| 6 | Diskuze | 35 |
| 7 | Závěr..... | 38 |
| 8 | Použití literatura..... | 39 |

1 Úvod

Rod *Cryptosporidium* je tvořen celosvětově rozšířenými, jednobuněčnými parazity, kteří infikují epitelové buňky zejména gastrointestinálního traktu svých hostitelů, kterými jsou zástupci všech tříd obratlovců. Jednotlivé druhy tohoto rodu se od sebe liší svými biologickými vlastnostmi. Mezi nejčastěji sledované parametry patří morfologie a morfometrie oocyst, místo infekce (žaludeční a střevní druhy), hostitelská specifita a patogenita. V rámci rodu lze na základě velikosti oocyst odlišit pouze žaludeční a střevní druhy. Rozdíly ve velikosti oocyst uvnitř skupin jsou příliš malé, aby je bylo možné použít pro rutinní diferenciaci. Místo infekce je specifické pro daný druh kryptosporidie a hostitel nemá na lokalizaci vliv. Co se týká hostitelské specifity, některé druhy napadají více druhů hostitelů (*C. parvum*, *C. muris* nebo *C. baileyi*) a některé infikují pouze jeden hostitelský druh (*C. hominis*, *C. wrairi*, *C. tyzzeri*). Ne všechny druhy kryptosporidií představují pro své hostitele nebezpečí. Zástupci tohoto rodu způsobují onemocnění zvané kryptosporidíóza a příznaky se objevují podle imunitního stavu postiženého jedince. Mezi typické projevy patří úbytek hmotnosti, průjem, nevolnost a více než 50 % pacientů s tímto onemocněním trpí například plynatostí, zvýšenou teplotou (38 °C), zimnicí a bolestí hlavy (MacKenzie *et al.* 1994; Mathieu *et al.* 2004). Patogenita a klinický průběh infekce také závisí na hostiteli. U řady druhů kryptosporidií, které jsou adaptovány na své hostitele, probíhá infekce bezpříznakově s minimálními patologickými změnami zasažených epitelů. Většina publikovaných prací zabývajících se patogenitou a funkčními změnami infikovaných orgánů byla zaměřena na studium druhů, které jsou medicínsky nebo veterinárně významné, tedy převážně druhy osidlující střevní epitel a způsobující život ohrožující průjmy. Druhy, jejichž infekce není spojována s klinickými příznaky a mezi něž patří i žaludeční kryptosporidie, byly na okraji zájmu.

Nicméně řada předchozích studií poukázala na výrazné změny epitelu žaludku infikovaného kryptosporidiiemi a na možný vliv infekce na funkční změny v trávicí soustavě s dopadem na užitkovost a zdraví infikovaných jedinců. Proto jsme se v této práci rozhodli zabývat se vlivem infekce *C. proliferans* na funkční a patologické změny v žaludku modelových organismů.

2 Literární přehled

2.1 Rod *Cryptosporidium*

2.1.1 Historie – žaludeční kryptosporidie savců

První rozpoznání a popis parazita nacházejícího se v žaludečních žlázách laboratorních myší (*Mus musculus*) a jeho vývojových stádií učinil Ernest Edward Tyzzer (Tyzzer 1907). Ve své pozdější práci z roku 1910 navrhl pro nový rod název *Cryptosporidium* a pro nový, typový druh název *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1910). V této práci též nastínil domněnku, že hostitel může být sporozoity z oocyst ze žaludečních žláz autoinfikován. K popsání dalšího druhu došlo v roce 1912 opět Tyzzerem. Druh vyskytující se v tenkém střevě a s menšími oocystami, než jaké mají jedinci druhu *C. muris*, byl pojmenován *C. parvum* a dnes patří mezi jeden z nejprozkoumanějších druhů tohoto rodu (Tyzzer 1912).

Až v roce 1976 byly zaznamenány první infekce u dvou lidí. Oba pacienti žili na farmách s dobyt看kem a trpěli vodnatými průjmy (Nime *et al.* 1976; Meisel *et al.* 1976). Zájem o onemocnění způsobené tímto rodem vzrostl zejména při propuknutí epidemie v Milwaukee (Wisconsin, USA) 1993, kdy vodou kontaminovanou oocystami, které bez poškození prošly i přes funkční filtrační systém, bylo infikováno přibližně 403 000 lidí (Mac Kenzie *et al.* 1994).

Až o několik let později byl popsán další z druhů kryptosporidií s žaludeční lokalizací, vyskytující se běžně ve slezu skotu – *Cryptosporidium andersoni*. Oocysty tohoto druhu získané z trusu infikovaného skotu jsou morfologicky podobné oocystám *C. muris*, jsou však větší, než oocysty *C. parvum* (Lindsay *et al.* 2004). Tento druh byl až do roku 2000 uváděn jako *C. muris*-like bovinní izolát. Anderson (1991) uvádí, že z 95 874 náhodně vybraných jedinců skotu na území USA 1,4 % vylučuje ve svých výkalech oocysty *C. andersoni*. Taktéž uvádí, že prevalence je u mléčného skotu přibližně dvojnásobně větší než u krav bez tržní produkce mléka. U skotu bylo zjištěno zduření sliznice vnitřního povrchu slezu se změněnou strukturou sliznice vyvolanou otevřením vývodů infikovaných žláz (Kváč a Vítovec 2003).

V roce 2016 popsal Kváč *et al.* (2016) další druh žaludeční kryptosporidie savců a pojmenoval ho *Cryptosporidium proliferans*. Tento druh byl do té doby známý jako *C. muris* kmen TS03. Stejný tým autorů vyslovil domněnku, že v rámci žaludečních kryptosporidií savců (*C. muris* a *C. andersoni*) jsou skryty další samostatné druhy žaludečních kryptosporidií, jež se od sebe liší biologickými vlastnostmi. Nicméně žádné

další práce, které by potvrdily, že se izoláty z velbloudů nebo myši liší, nebyly provedeny.

2.1.2 Taxonomie

Rod *Cryptosporidium* zahrnuje intracelulární parazity patřící do kmene Apicomplexa, jehož zástupci se vyznačují apikálním komplexem složeným z polárních prstenců, koinoidu, rhoptrií a mikronemů sloužících k průniku do hostitelské buňky (Fayer a Xiao 2008). Kvůli své morfologické podobnosti a podobnosti vývojového cyklu byly kryptosporidie dříve řazeny mezi kokcidie. Výsledky molekulárních analýz odhalily jejich blízkost ke gregarinám (Carreno *et al.* 1999). Přesto nelze přesně určit, zda se z gregarin přímo vyvinuly, anebo jsou jen jejich sesterským rodem (Leander *et al.* 2003).

2.1.1 Vývojový cyklus

Zástupci rodu *Cryptosporidium* procházejí vývojem vázaným pouze na jednoho hostitele. Takové parazity označujeme jako parazity jednohostitelské, neboli monoxenní.

Vývojový cyklus kryptosporidií se skládá ze čtyř hlavních fází, kterými jsou: excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie.

Fáze excystace začíná pozřením infekční oocysty. Po pozření oocyst vhodným hostitelem dochází k uvolnění sporozoitů z oocyst. Infekční sporozoiti jsou pohybliví a napadají potencionální hostitelské buňky nejen trávicího traktu, který je pro vývoj parazita typický, ale i buňky dalších tkání (plíce, žlučník, ledviny) (Current a Garcia 1991). Uvolnění sporozoitů je ovlivněno vystavením oocyst různým podnětům v těle hostitele. Mezi známé faktory patří vystavení změně teploty, pH prostředí a přítomnosti trávicích enzymů (Fayer a Leek 1984). K excystaci dochází v místě infekce. Druhy infikující žaludek excystují v žaludku a druhy infikující střeva excystují v příslušných částech střeva. Po připojení sporozoita na buňku dochází k prodlužování mikrovilární vrstvy a tvorbě parazitoforní vakuoly obklopující parazita, která splývá s membránou hostitelské buňky a tvoří tak rozhraní mezi ní a parazitem. Parazit však není v přímém kontaktu s cytoplazmou buňky (Huang *et al.* 2004).

Přichycení sporozoiti se mění na jednojaderné trofozoity, jejichž jádro se následně dělí.

Merogonie je fází nepohlavního (asexuálního) množení, při níž rozdělením jader trofozoitů vznikají meronti dvou typů (typ I a II). Meronti typu I se dělí a z 6–8 jader vzniká 6–8 merozoitů. Zralí merozoiti I typu uvolnění z merontů I typu infikují další buňky a dávají vzniknout merontům I nebo II typu. Meronti typu II obsahují 4 jádra,

z nichž vznikají 4 merozoiti II typu. Předpokládá se, že pouze typ II iniciuje sexuální rozmnožování ve fázi gametogonie (Fayer a Xiao 2008). Meronti II typu dávají vzniknout mikrogamontům (samčí) a makrogamontům (samičí) a začíná fáze **gametogonie**. Pohyblivé mikrogamety (16) uvolněné z mikrogamontů splývají s makrogamonty a vzniká jediné diploidní stádium (2N), kterým je zygota (Melicherová *et al.* 2014), následně se vyvíjející v oocystu.

Oocysty ve fázi **sporogonie** sporulují *in situ*, po dozrání obsahují 4 sporozoity a jsou dvojího typu – tenkostěnné a silnostěnné. Oocysty s tenkými stěnami uvolňují sporozoity uvnitř těla stejného hostitele, dochází tak k jeho opakovanému nakažení (autoinfekci). Silnostěnné oocysty tělo hostitele opouštějí, jsou vylučovány do okolí a infikují hostitele jiné (Fayer a Xiao 2008).

2.1.2 Hostitelská a tkáňová specifita

Hostitelskou specifitu zástupců rodu *Cryptosporidium* lze rozdělit do tří kategorií. Většina zástupců má úzkou hostitelskou specifitu, kdy dochází k infekci jednoho či pouze omezeného počtu hostitelů. Do této kategorie patří například *C. erinacei* parazitující u ježků (Kváč *et al.* 2014), anebo *C. ditrichi* parazitující pouze u myšice, (Čondlová *et al.* 2018), s výjimkou několika málo případů, kdy se stal hostitelem člověk. Do druhé kategorie spadají druhy a genotypy parazitující u nepříbuzných skupin hostitelů. *Cryptosporidium muris*, napadající hlavně myši domácí, anebo *C. andersoni*, parazitující u skotu, hlodavců i sudokopytníků, spadají právě do této kategorie. Třetí kategorií jsou druhy s širokou hostitelskou specifitou, které jsou schopny infikovat vícero hostitelů, ať už savce či ptáky. Hlavními zástupci této skupiny jsou druhy *C. parvum* a *C. baileyi*.

Primární oblastí, v níž kryptosporidie parazitují, je gastrointestinální trakt. Dvěma většími skupinami jsou kryptosporidie žaludeční a střevní. Střevní kryptosporidie jsou charakteristické menšími, kulatými oocystami a afinitou ke střevním buňkám – enterocytům. K excystaci dochází až ve střevě, kde jsou oocysty aktivovány účinkem žluče, trypsinu a proteolytických enzymů (Widmer *et al.* 2007). Tato skupina je početnější a řadíme do ní např. *C. bovis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. parvum*, *C. hominis*. Některé z druhů – typicky *C. avium* – mají afinitu kromě střeva i k ledvinám, kloace a močovodu (Holubová *et al.* 2016), anebo parazitují pouze v dýchací soustavě – *C. baileyi* (Current *et al.* 1986).

2.2 Žaludeční kryptosporidie

Skupina kryptosporidií infikujících žaludek svého hostitele není tak početná, jako skupina kryptosporidií s afinitou ke střevním buňkám. Oocysty žaludečních druhů jsou větší a oválného tvaru.

2.2.1 Druhy žaludečních kryptosporidií

Druhy parazitující v žaludku ryb nejsou příliš prozkoumány, zejména kvůli malému množství biologických dat a dalších informací. V současné době jsou platně popsány tři druhy kryptosporidií parazitující v žaludku ryb. *Cryptosporidium bollandi* je druh, který byl popsán u sladkovodních ryb (Bolland *et al.* 2020). *Cryptosporidium huwi* je druh, který byl nalezený ve sladkovodní rybě živorodce duhové (*Poecilia reticulata*) (Ryan *et al.* 2015). U mořských ryb byl pozorován druh osidlující hluboké vrstvy žaludečního epitelu pojmenovaný *Cryptosporidium molnari* (Alvarez-Pellitero a Sitjà-Bobadilla 2002).

Cryptosporidium fragile bylo popsáno v žaludku ropuch černých (Jirků *et al.* 2008). Kromě tohoto popisu není o výskytu a prevalenci této kryptosporidie nic známo a tento druh nebyl u žádných jiných hostitelů detekován, což může souviset i s velmi malým počtem studií provedených na obojživelnících.

Cryptosporidium serpentis, druh vyskytující se v žaludku u plazů, pojmenoval Norman D. Levine (Levine 1980) na základě informací o hypertrofické gastritidě u čtyř hadů, které popsal Brownstein *et al.* (1977).

U ptáků byly dosud popsány dva druhy žaludečních kryptosporidií. První kryptosporidie nalezená ve žláznatém žaludku ptáků byla pojmenována *Cryptosporidium galli* a byla nalezena v drůbeži (Pavlásek 1999). V roce 2019, byl popsán další druh, *Cryptosporidium proventriculi*, který postihuje žláznatý i svalnatý žaludek papoušků (Holubová *et al.* 2019).

V rámci savců známe pouze tři druhy infikující žláznatý žaludek. *Cryptosporidium muris* byl popsán jako první zástupce tohoto rodu nalezený v žaludečních žlázách myši (viz. kapitola 2.1.1). Další druh, *C. andersoni*, byl původně mylně identifikován jako *C. muris* (viz. kapitola 2.1.1). Až na základě molekulárních analýz a lokalizaci vývojových stádií ve slezu skotu byl uznán jako samostatný druh (Lindsay *et al.* 2004). Další z druhů infikujících žaludek je *C. proliferans*, dříve označováno jako *C. muris* kmen TS03. Tyto druhy byly odlišeny za pomoci molekulárních a biologických

kých metod. Klinické příznaky a průběh infekce těchto tří druhů žaludečních kryptosporidií jsou poměrně dobře zmapovány, přičemž druh *C. proliferans* patří mezi druhy způsobující významné patologické změny infikovaných tkání (Kváč *et al.* 2016). Tento druh je charakteristický pro hlodavce a doba vylučování oocyst (patentní perioda) může trvat nejen několik dní a měsíců, ale i několik let. Oproti tomu doba od pozření infekční oocysty po dobu začátku vylučování oocyst nově vzniklých (prepatentní perioda) bývá v rozmezí 6-21 dní, což je delší interval, než v případě prepatentní periody u *C. muris* (Kváč *et al.* 2016; Melicherová *et al.* 2014).

2.2.2 Klinické a histopatologické příznaky

Infekce střevního epitelu, zejména v oblasti tenkého střeva je často spojována s charakteristickým vodnatým průjmem, naopak infekce žaludečními druhy nedoprovází většinou žádné klinické příznaky. To ovšem neznamená, že by infekce žaludečními kryptosporidii nebyla spojena s patogenními změnami. Anderson (1998) popsal, že chronické infekce skotu vyvolané druhem *C. andersoni* vedou ke zbytnění sliznice slezu a dochází až k trojnásobnému zvětšení hmotnosti slezu oproti zvířatům bez infekce. Dále byl v souvislosti s infekcí *C. andersoni* popsán pokles mléčné produkce až o 13 % a pokles přírůstků až o 0,5 kg (Anderson 1998). Obdobné zvětšení žaludku bylo pozorováno i u SCID myši a mastomyši infikovaných druhem *C. muris* izolátem TS03, respektive *C. proliferans* (Matsubayashi *et al.* 2010; Kváč *et al.* 2015). V případě infekce druhem *C. muris* nebyly takovéto výrazné makroskopické změny dosud pozorovány.

U myši po 1. týdnu infekce nedošlo k žádným histopatologickým změnám, imunofluorescenční barvení protilátkou proti kryptosporidiím odhalilo parazity v žaludeční sliznici a ve vrchních částech některých foveol.

U myši po 2–4 týdnech po infekci byla pozorována až trojnásobně zvětšená výška sliznice v některých oblastech žaludku, a to zejména v okolí žaludečních žláz. V dutinách žláz byla pozorována vývojová stádia kryptosporidií.

U myši po 12. týdnu infekce byla výška sliznice zvětšená až pětinasobně, některé žlázy byly naplněny parazity. U těchto myši byly pozorovány tři typy lézí.

U **I. typu** byla výška sliznice zvětšená, ale obsah neutrálního polysacharidu byl nízký. U **II. typu** byla sliznice atrofovaná, neboť paraziti dosáhli dna foveol, následoval kolaps epitelárních buněk včetně buněk hlenového krčku způsobený uvolněním merozoitů nebo oocyst, což mohlo být důvodem snížení obsahu neutrálního hlenu na žaludeční sliznici. Matsubayashi *et al.* (2010) předpokládá, že tyto změny odhalí

kyselému prostředí trávicích enzymů a kyselin nejen parazity, ale i samotnou sliznici, u které následně dochází k atrofii. Obsah kyselého mukopolysacharidu byl zvýšený, paraziti byli nalezeni jen v některých žlázách. U **III. typu** byla výška sliznice jen mírně znásobená, byla pozorována přítomnost pohárkových buněk vylučujících mucin, což svědčilo o intestinální metaplazii. Nebyli pozorováni žádní paraziti.

Na žaludeční sliznici nebyla pozorována žádná vývojová stádia parazitů, přestože jich mnoho bylo nalezeno v dutinách žláz. Na tento jev by mohly mít vliv obranné mechanismy, kterými jsou produkce pepsinu žaludečními žlázami, produkce kyseliny chlorovodíkové parietálními buňkami a produkce žaludečního hlenu. Právě žaludeční hlen chrání sliznici žaludku před agresivními, kyselými faktory a zajišťuje neutrální gradient bikarbonátových a vodíkových iontů vylučovaných z epitelu (Flemström 1986; Allen *et al.* 1993; Flemström a Isenberg 2001), což paraziti mohou využívat k vyhnutí se stresu z intenzivně kyselého prostředí.

U myši po 1.-12. týdnu infekce nebyly detekovány žádné zánětlivé buňky.

2.2.3 Patogenita žaludečních kryptosporidií savců

Oproti infekcím způsobeným střevními druhy kryptosporidií infekce způsobené žaludečními druhy nedoprovází průjmová onemocnění. Jsou charakteristické absencí klinických příznaků, ojediněle byl zaznamenán pokles mléčné užitkovosti a přírůstků a ztráta tělesné kondice (Anderson 1998; Pospischil *et al.* 1987; Esteban a Anderson 1995).

Již v roce 1910 popsal Tyzzer (1910) histopatologické změny, kterých si všiml u infikovaných myši. Pozoroval rozšířené žaludeční žlázy a nepříliš velké nahromadění lymfatických buněk, které však nedoprovázel akutní zánět. Výskyt eosinofilů v oblasti *lamina propria* byl taktéž nízký (Kváč a Vítovec 2003). Vývojová stádia byla nalezena pouze ve žláznaté části žaludku. U infikovaných skupin myši žaludečními druhy kryptosporidií dochází k výrazné dilataci žaludečních žláz a k jejich vyplnění nekrotickým materiálem, hlenem a vývojovými stádii parazitů. Epitel výrazně proliferuje do lumen žaludku a tvoří papilární struktury (Kváč *et al.* 2016). Dochází též ke zvýšení hmotnosti žaludku – Kváč *et al.* (2016) zjistil, že v případě infekce *C. muris* HZ206 se hmotnost žaludku zvýšila 1,5×, oproti tomu v případě infekce *C. proliferans* HZ206 se zvýšila až 5,7×. Na zvýšení hmotnosti se významně podílel nárůst sliznice, zatímco podslizniční a seróza se významně nezměnily.

Nezánětlivé histopatologické změny jsou blíže popsány v kapitole 2.2.2.

3 Cíle práce

Cílem této práce je za pomoci série experimentálních infekcí vyvolaných druhem *Cryptosporidium proliferans* popsat patogenitu tohoto druhu, změnu pH žaludku a průběh infekce u různých typů modelových hostitelů a histologickými metodami charakterizovat vzniklé patologické změny sliznice žaludku v průběhu infekce.

4 Materiál a metody

4.1 Zdroj oocyst

Pro účely práce byl použit druh žaludeční kryptosporidie – *Cryptosporidium proliferans*, původně pocházející z přirozeně infikovaného hlodouna východoafrického (*Tachyorectes splendens*), který je dlouhodobě udržován ve SCID myších v laboratořích Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i, a druh *C. andersoni* získaný z přirozeně infikovaného skotu bez tržní produkce mléka.

4.2 Experimentální zvířata

Pro experimenty byly použity dva kmeny laboratorních inbredních myší (*Mus musculus*) BALB/c a C57Bl6 a mastomyši (*Mastomys coucha*) ve věku 8 týdnů. Všechna zvířata byla umístěna v jednotlivých plastových boxech ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i. v Českých Budějovicích.

Krmena byla granulovanou komerční směsí pro hlodavce s vodou dostupnou *ad libitum*. Podestýlána byla dřevěnými pilinami. Zdravotní stav zvířat, krmivo a napájecí voda byly kontrolovány 2× denně. Podestýlka byla vyměňována 2× týdně nebo častěji, bylo-li potřeba.

4.3 Purifikace oocyst

Za účelem standardizace experimentálních infekcí bylo potřeba získat čistou suspenzi oocyst.

4.3.1 Čištění na sacharózovém gradientu (Arrowood a Sterling 1987)

Použité roztoky a jejich příprava:

- Sheaterův roztok: 295 ml deionizované H₂O + 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 práce:

- V třecí misce zhomogenizovat s deionizovanou vodou vzorek trusu a zbavit jej příměsí přecezením přes sítko (velikost ok 250 μm).
- Plastovou Pasteurovou pipetou navrstvit do skleněných nádobek gradient v následujícím pořadí:

1. vrstva: 30 ml Sheaterův roztok 1:2
 2. vrstva: 30 ml Sheaterův roztok 1:4
 3. vrstva: 15 ml zhomogenizovaného vzorku
- Po vyvážení zkumavek centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C.
 - Odsát vrchní zbarvenou vrstvu vývěvou a zbylý supernatant přenést do čistých zkumavek.
 - Doplnit objem zkumavek deionizovanou vodou.
 - Centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C.
 - Odsát ½ objemu zkumavek vývěvou a zbytek objemu doplnit deionizovanou vodou.
 - Centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C.
 - Sedimenty zhomogenizovat v deionizované vodě a přenést do čistých zkumavek, uchovávat při 4 °C.

4.3.2 Čištění na cesium chloridovém gradientu (Arrowood a Donaldson 1996)

Použité chemikálie: roztok cesium chloridu (CsCl; 1,15 g/ml), PBS (0,025 M; pH 7,2), dH₂O

Postup práce:

- Vzorek po přečištění na sacharózovém gradientu centrifugovat 10 minut při 1450 g a 4 °C.
- Odebrat supernatant a přidat 0,5 ml PBS a zhomogenizovat.
- Do nové mikrozkušavky napipetovat 1 ml CsCl.
- Na vrstvu CsCl přidat 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
- Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C.
- Odebrat supernatant a přepipetovat jej do čisté 50 ml centrifugační zkumavky, zbylý sediment vyhodit.
- Obsah zkumavky doplnit dH₂O.
- Centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C.
- Odsát supernatant vodní vývěvou na objem 5 ml.
- Doplnit obsah zkumavky dH₂O a zvortexovat, centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C.
- Předchozí krok opakovat 3–4× pro lepší účinnost promytí.
- Uchovávat oocysty v dH₂O při 4 °C.

4.4 Infekční dávka

Oocysty kryptosporidií vyčištěné dle metod popsaných výše (3.3) byly použity pro perorální infekce laboratorních hlodavců. Byly použity oocysty ne starší 4 týdnů a před infekcí byla ověřena životaschopnost oocyst dle dříve publikované metodiky (Kváč *et al.* 2007). Počet oocyst v infekční dávce byl spočítán v Bürkerově komůrce dle návodu výrobce.

4.5 Barvení oocyst

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

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

Postup práce:

- Vytvořit tenký nátěr vzorku trusu na podložní sklo.
- Vzorek na podložním sklíčku ponořit do methanolu a zafixovat plamenem.
- Sklíčko vložené do stojánku ponořit do roztoku methylvioleti na 30 minut.
- Opláchnout pod tekoucí vodou a následně i se stojánkem ponořit do 2% kyseliny sírové na 2 minuty.
- Oplachovat pod tekoucí vodou a barvit v roztoku tartrazinu po dobu 3–5 minut.
- Oplachovat pod tekoucí vodou.
- Vzorek nechat oschnout při laboratorní teplotě a prohlížet světelným mikroskopem při 1 000 násobném zvětšení za použití imerzního oleje.

4.6 Ověření identity izolátu

Před zahájením a v průběhu experimentů byla ověřována identita izolátů použitých kryptosporidií.

4.6.1 Izolace DNA

Pro izolaci celkové genomové DNA (gDNA) z čistých oocyst použitých pro inokulaci a ze žláznaté části žaludku prokazatelně infikovaných zvířat byl použit komerční kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN).

Použité chemikálie (součástí kitu): ATL pufr, proteináza K, AL pufr, EtOH, AW1 pufr, AW2 pufr, AE pufr.

Postup práce:

- Nastříhat asi 10 mg tkáně, vložit do mikrozkušavky a přidat malé skleněné kuličky (0,5 mm; cca 100 μ l) a 1 velkou skleněnou kuličku (2 mm).
- Připipetovat 180 μ l ATL pufru a zvortexovat.
- Rozbít za pomoci přístroje FastPrep®24 Instrument MP – 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
- Centrifugovat 10 sekund při 6 000 g.
- Připipetovat 20 μ l proteinázy K.
- Inkubovat po dobu 1 hodiny při 56 °C, během této doby pravidelně míchat.
- Centrifugovat 10 sekund při 6 000 g.
- Připipetovat 200 μ l AL pufru a vzorek zvortexovat.
- Připipetovat 200 μ l 96% EtOH a vzorek zvortexovat.
- Centrifugovat 45 sekund při 14 000 g.
- Veškerý supernatant přepipetovat na kolonku Mini spin, centrifugovat 3 minuty při 8 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetovat 500 μ l AW1 pufru, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetovat 500 μ l AW2 pufru, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Vyhodit sběrné zkumavky a nahradit je novými mikrozkušavkami.
- Na membránu kolony napipetovat 200 μ l AE pufru, inkubovat po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě.
- Centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.
- Získanou DNA skladovat při teplotě -20 °C v mikrozkušavce.

4.6.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

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

Jako negativní kontrola byla použita PCR voda a jako pozitivní kontrola byla použita gDNA *Cryptosporidium tyzzeri*.

PCR reakce byla provedena ve 20 μ l – k 10 μ l komerčně dodávaného HS-Taq premix (GenAll, Korea) obsahující 2U HS-Taq DNA polymerázy, 200 μ M dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, loading dye a stabilizátor bylo přidáno 7 μ l PCR vody, 0,5 μ l 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.

Primery

Primery pro primární reakci (forward a reverse primer):

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

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

Primery pro sekundární reakci (forward a reverse primer):

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

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

Amplifikace byla prováděna v termocykleru při tomto programu:

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

4.6.3 Gelová elektroforéza

Produkty vzniklé sekundární PCR byly nanесeny na 1% agarózový gel, do něž byl přidán ethidium-bromid (EtBr). Po doběhnutí elektroforézy byl produkt vizualizován UV transiluminátorem.

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

Postup práce:

- V Erlenmayerově baňce smíchat 1× TAE pufr s odváženou agarózou v poměru dle velikosti nosiče, směs vložit do mikrovlnné trouby po takovou dobu, dokud nevznikne homogenní směs.
- Ochladit baňku pod tekoucí vodou, přidat do směsi 1 µl EtBr.
- Do vhodně velkého nosiče vylít obsah baňky, dle počtu vzorků vybrat hřeben a ten vložit do nosiče.

- Směs nechat v nosiči zatuhnout.
- Hřeben vyjmout a gel vložit do elektroforetické vany obsahující TAE pufr.
- Nanášet dle schématu: první jamka – 10 µl 100 bp DNA Ladder; následující jamky – 20 µl produktů získaných po sekundární PCR.
- Nastavit napětí na 90 V a nechat fragmenty separovat (cca 30–50 minut).
- Zobrazit fragmenty pomocí UV transiluminátoru.

4.6.4 Genotypizace

Sekundární produkty PCR byly z gelu vyizolovány pomocí Gen Elute kitu (Sigma) podle doporučení výrobce a získané fragmenty byly sekvenovány v komerčních laboratořích pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a za použití sekundárních primerů. Každý vzorek byl sekvenován z obou konců.

Získané nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí programu Chromas-Pro a byly porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank. Referenční sekvence a sekvence získané v rámci této práce byly seřazeny pomocí MAFFT verze 7 online server s automatickým výběrem seřazovací strategie (Maffit, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) a následně ručně doopraveny v programu BioEdit. Byla porovnána identita použitých izolátů s izoláty získanými z experimentálně infikovaných zvířat.

4.7 Design experimentu

Pro účely pokusu byla použita 8týdenní mláďata vybraných druhů myši (viz. kapitola 4.2). Každé zvíře bylo infikováno jícnovou sondou infekční dávkou obsahující 1×10^6 oocyst v 10 µl dH₂O.

Zvířata byla usmrcována vylučněná, po 7denních intervalech ve skupinách obsahujících 1–3 zvířata a to humánním způsobem uspáním isofluranem s následným zlomením vazů. Zvířata sloužící jako kontroly byla usmrcována den nultý.

Po otevření břišní dutiny byl vyjmut žaludek, který byl podélně rozstříhnut a rozevřen. Bylo změřeno pH vnitřní stěny a žláznatá část byla odebrána na histologické vyšetření (viz. kapitoly 4.9 a 4.10) a na vyšetření přítomnosti DNA kryptosporidií použitím nested PCR (viz. kapitola 4.6.2).

4.8 Intenzita kryptosporidiové infekce

Všechna experimentálně inokulovaná zvířata byla od 4. dne po infekci (DPI) vyšetřována na přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu. Trus byl odebírán individuálně. Byl proveden nátěr trusu na podložní sklo, byla zjištěna hmotnost trusu (v gramech) jako

rozdíl hmotnosti preparátu (trusu natřeného na sklíčku před fixací a barvením) a hmotnosti čistého sklíčka. Nátěry byly obarveny metodou dle Miláčka a Vítovce (1985) a prohlíženy světelným mikroskopem (Olympus IX 70) při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Při nízké intenzitě infekce byly počítány všechny oocysty nalezené na skle, při vysoké intenzitě infekce byl počítán počet oocyst ve 30 náhodných zorných polích a následně byla intenzita infekce přepočtena. Ze zjištěných údajů (hmotnost trusu, počet zorných polí a počet oocyst na sklíčku) byla vypočítána intenzita infekce a vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu (OPG, oocysts per gram) (Kváč *et al.* 2007).

4.9 Měření pH

Měření pH vnitřní stěny žaludku bylo prováděno dotykovou kombinovanou pH elektrodou Theta 90 typu HC 163-FES, která byla kalibrována dle kalibračních roztoků pH 4 a pH 7 při laboratorní teplotě.

4.10 Histologické zpracování vzorků a analýza histologických řezů

Vzorky žaludeční tkáně odebrané dle designu experimentu byly fixovány v neutrálním pufrovaném formalínu. Po dostatečném prefixování byly vzorky tkání přikrojeny a prosyceny parafinem pomocí tkáňového procesoru KOS (99% histoalkohol – 35 minut, isopropylalkohol – 1,15 hodin, histowax – 1,5 hodin). Prosycené vzorky byly zality do bloků a následně z nich vytvořeny histologické řezy o síle 5 µm. V řezech byl proveden průkaz polysacharidů metodou PAS (Periodic-Acid-Schiff), jejíž metodika je zobrazena v Tabulce 1. Obarvené řezy byly zamontovány do Pertexu a prohlíženy světelným mikroskopem (Olympus IX70) s vhodným zvětšením. Výsledky pozorování byly porovnány s neinfikovanými tkáněmi, které byly vyšetřeny stejným postupem.

Tabulka 1: Postup barvení Periodic-Acid-Schiff.

| Pořadí | Chemikálie | Čas (min.) |
|--------|-------------------------------------|------------|
| 1 | Xylen | 5 |
| 2 | Xylen | 5 |
| 3 | Xylen | 5 |
| 4 | Xylen:100% ethanol (1:1) | 5 |
| 5 | 100% ethanol | 5 |
| 6 | 100% ethanol | 5 |
| 7 | 96% ethanol | 5 |
| 8 | 96% ethanol | 5 |
| 9 | 80% ethanol | 5 |
| 10 | 70% ethanol | 5 |
| 11 | 50% ethanol | 5 |
| 12 | Kohoutková H ₂ O | 5 |
| 13 | Deionizovaná H ₂ O | 5 |
| 14 | Inkubace 60 °C, 2% kyselina jodistá | 3 |
| 15 | Destilovaná H ₂ O | 1 |
| 16 | Inkubace 30 °C Schiffovo reagens | 3 |
| 17 | Teplá kohoutková H ₂ O | 10 |
| 18 | Oplach destilovaná H ₂ O | 1 |
| 19 | Hematoxylin dle Kodouska | 8 |
| 20 | Teplá kohoutková H ₂ O | 3 |
| 21 | Studená kohoutková H ₂ O | 5 |
| 22 | 80% ethanol | 3 |
| 23 | 96% ethanol | 3 |
| 24 | 96% ethanol | 3 |
| 25 | 100% ethanol | 5 |
| 26 | Xylen | 5 |
| 27 | Pertex | |

4.11 Hodnocení patogenity a intenzity infekce na histologických řezech

Na histologických řezech byly hodnoceny následující parametry:

- Výška sliznice.** Byla měřena průměrná výška sliznice (μm) na 10 různých místech řezu.
- Přítomnost hlenu.** Hodnoceno dle polohy hlenu v žaludečních žlázách: 1 – hlen jen na povrchu žaludečních jamek, 2 – hlen v $\frac{1}{2}$ žlázy, 3 – hlen v $\frac{1}{3}$ žlázy.
- Intenzita infekce.** Bylo hodnoceno procento infikovaných žláz. Hodnoceno 10 žláz na 10 různých místech řezu.
- Přítomnost zánětlivých infiltrátů.** Byla hodnocena v 10 různých místech řezu. 0 – bez zánětlivých infiltrátů, 1 – přítomnost infiltrátů na bázi žaludečních žláz, 2 – přítomnost infiltrátů na bázi žaludečních žláz a ve střední vrstvě, 3 – přítomnost infiltrátů v celé výšce sliznice.

4.12 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.

5 Výsledky

5.1 Identita izolátu

Výsledky molekulárních analýz prokázaly, že sekvence SSU získané z izolátů *C. proliferans* použitých pro experimentální infekce a v případě úspěšných infekcí byly mezi sebou vzájemně identické a současně identické se sekvencemi příslušných druhů uložených v GenBank (*C. proliferans* – KR090615).

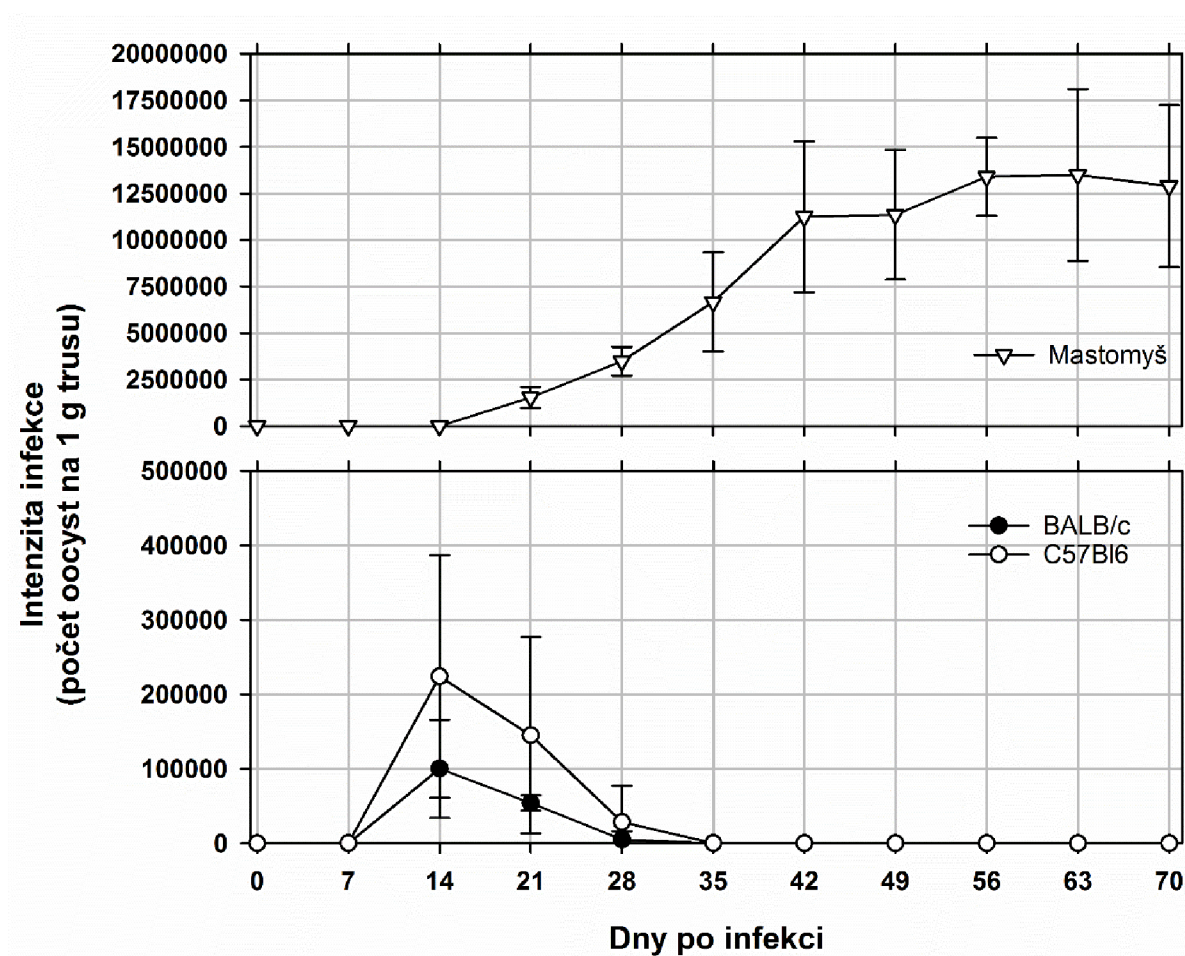
5.2 Infektivita izolátu

Výsledky mikroskopického vyšetření trusu zvířat perorálně inokulovaných dávkou 1 000 000 oocyst *C. proliferans* prokázaly detekovatelné množství oocyst u mastomysí a myši kmenů BALB/c a C57Bl6. Mastomysí infikované *C. proliferans* začaly vylučovat oocysty od 3. týdne po infekci, zatímco oba kmeny laboratorních myši začaly vylučovat oocysty *C. proliferans* od 2. týdne po infekci ($P < 0,05$). Mastomysí infikované *C. proliferans* vylučovaly oocysty po celou dobu experimentů, u myši infikovaných tímto druhem kryptosporidie došlo k poklesu infekce pod detekovatelnou hranici pomocí světelné mikroskopie v průběhu 5 týdnů (Tabulka 2), nicméně specifická DNA *C. proliferans* byla detekovatelná u všech skupin hostitelů až do konce experimentu (Tabulka 2).

Tabulka 2: Přítomnost oocyst a specifické DNA *Cryptosporidium proliferans* u experimentálně infikovaných laboratorních hlodavců detekované pomocí specifického barvení anilin-karbol-methyl violetí a PCR. Zelená barva značí přítomnost oocyst/DNA v trusu u vyšetřovaného zvířete, oranžová barva značí negativní výsledek vyšetření.

| DPI | Mikroskopické vyšetření | | | | | | | | | Detekce specifické DNA | | | | | | | | |
|-----|-------------------------|---|---|--------|---|---|--------|---|---|------------------------|---|---|--------|---|---|--------|---|---|
| | Mastomys | | | BALB/c | | | C57Bl6 | | | Mastomys | | | BALB/c | | | C57Bl6 | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 0 | Orange | | | Orange | | | Orange | | | Orange | | | Orange | | | Orange | | |
| 7 | Orange | | | Orange | | | Orange | | | Orange | | | Green | | | Orange | | |
| 14 | Orange | | | Green | | | Green | | | Orange | | | Green | | | Green | | |
| 21 | Green | | | Green | | | Green | | | Green | | | Green | | | Green | | |
| 28 | Green | | | Green | | | Green | | | Green | | | Green | | | Green | | |
| 35 | Green | | | Orange | | | Orange | | | Green | | | Green | | | Green | | |
| 42 | Green | | | Orange | | | Orange | | | Green | | | Green | | | Green | | |
| 49 | Green | | | Orange | | | Orange | | | Green | | | Orange | | | Green | | |
| 56 | Green | | | Orange | | | Orange | | | Green | | | Green | | | Green | | |
| 63 | Green | | | Orange | | | Orange | | | Green | | | Orange | | | Orange | | |
| 70 | Green | | | Orange | | | Orange | | | Green | | | Green | | | Green | | |

Průběh infekce BALB/c a C57Bl6 myši byl obdobný ($P > 0,05$). Maximální intenzita infekce byla pozorována 28 DPI. Zatímco BALB/c myši vylučovaly v průměru okolo 10 000 oocyst na gram trusu (OPG), u C57Bl6 myši byla maximální intenzita infekce okolo 22 000 OPG ($P < 0,05$). Intenzita infekce u mastomyši byla v porovnání s kmeny myši statisticky výrazně vyšší ($P < 0,05$). Již 21 DPI vylučovaly mastomyši okolo 2 000 000 OPG a v průběhu experimentu došlo k výraznému zvýšení množství vylučovaných oocyst. Maximálních hodnot bylo dosaženo 56 DPI a od této doby se intenzita infekce výrazně neměnila (Graf 1).

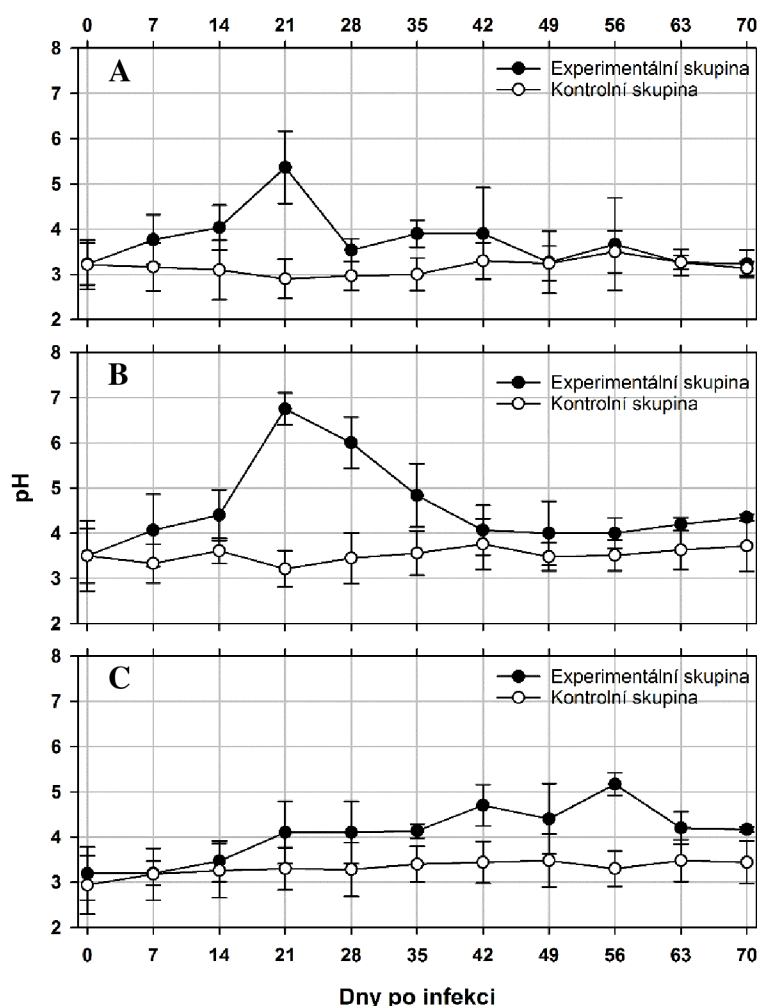


Graf 1: Průběh infekce *Cryptosporidium proliferans* u experimentálně infikovaných laboratorních hlodavců v závislosti na dnech po infekci. Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců \pm směrodatná odchylka.

5.3 Vliv infekce na změnu pH v žaludku

V průběhu experimentu bylo u kontrolních (neinfikovaných) BALB/c, C57Bl6 myši a mastomyši, zjištěno pH žaludku $3,22 \pm 0,54$, $3,50 \pm 0,78$ respektive $2,94 \pm 0,65$.

U všech experimentálně infikovaných skupin laboratorních hlodavců došlo v důsledku infekce *C. proliferans* ke zvýšení pH žaludečního obsahu. U experimentální skupiny BALB/c myši došlo v důsledku infekce ke zvýšení pH (v průměru na 3,77) již 7 dní po infekci. Hodnota pH žaludku se u této skupiny myši zvyšovala až do 21 DPI, kdy průměrné pH dosahovalo hodnoty 5,37 ($P < 0,05$). Od tohoto dne došlo k postupnému snižování pH a 49 DPI byly zjištěny hodnoty odpovídající kontrolním jedincům (Graf 2).



Graf 2: Vliv infekce *Cryptosporidium proliferans* na změnu pH v žaludku u A) BALB/c myši, B) C57Bl6 myši a C) mastomyši. Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců \pm směrodatná odchylka.

U infikované skupiny myši C57Bl6 došlo vlivem infekce ke zvýšení pH také 7 dní po infekci (pH 4,07). Hodnota pH žaludku se zvyšovala i u tohoto druhu myši do 21 DPI, kdy průměrné pH dosahovalo hodnoty 6,75 ($P < 0,05$). Poté docházelo k postupnému snižování pH, které však bylo pozvolnější, než u myši skupiny BALB/c (Graf 2).

U experimentálně infikované skupiny mastomyši došlo ke zvýšení pH (v průměru na 3,77) až 21 DPI. pH žaludku se zvyšovalo až do ukončení experimentu (70 DPI), kdy průměrné pH dosahovalo 4,18. Největší zvýšení pH, v porovnání s kontrolní skupinou, nastalo 56 DPI, kdy průměrná hodnota pH byla 5,17 ($P < 0,05$).

5.4 Patologické změny sliznice žaludku v důsledku infekce *Cryptosporidium proliferans*

Při pozorování histologických řezů vytvořených ze skupin myši infikovaných *Cryptosporidium proliferans* byly hodnoceny faktory uvedené v kapitole 4.11.

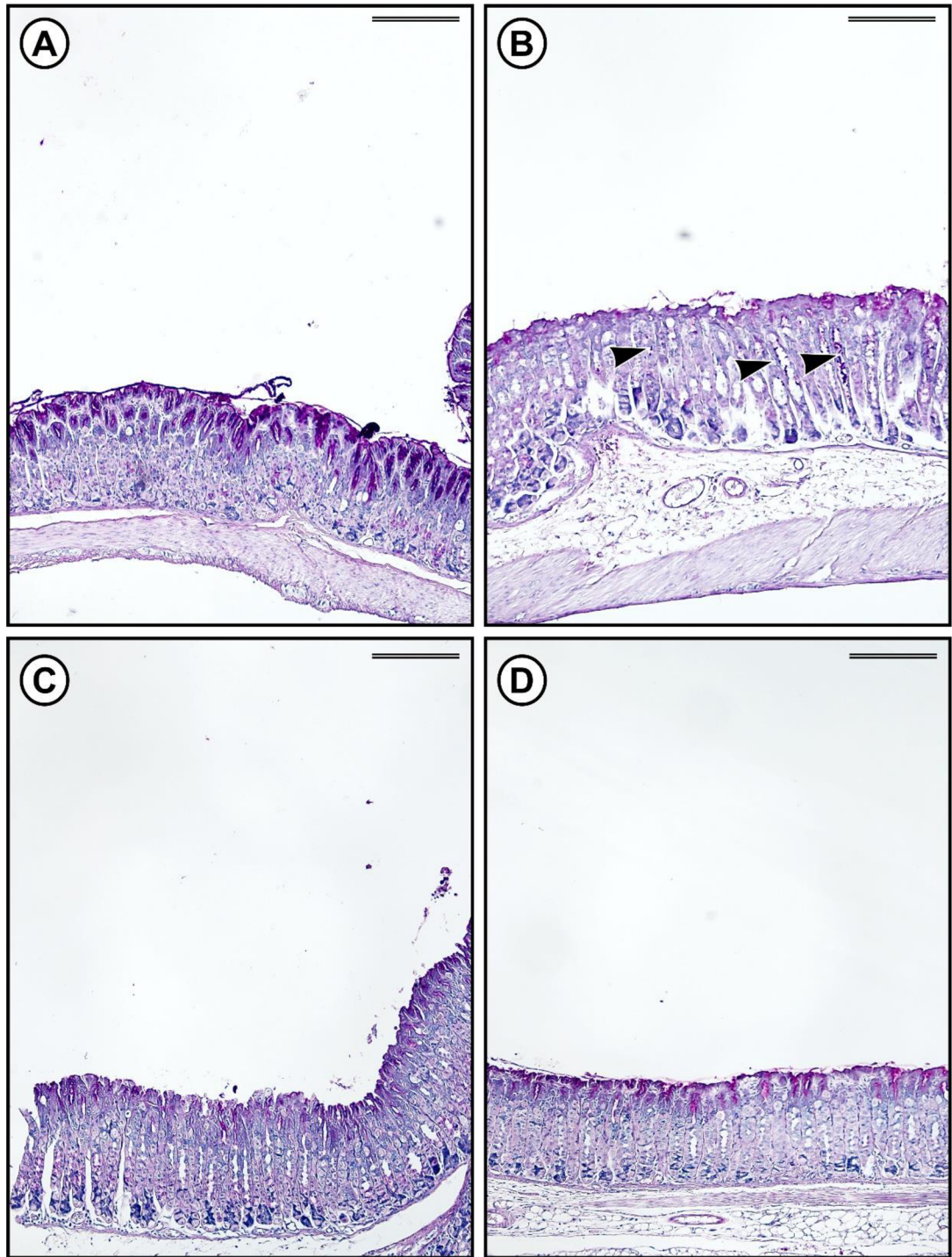
U experimentální skupiny myši BALB/c byl pozorován nejmenší vliv infekce na zesílení žaludeční sliznice. Od 7 DPI bylo pozorováno postupné zesílení sliznice v žaludku s maximálním zesílením 21 DPI, kdy sliznice dosahovala síly 167,1 μm , zatímco u kontrolních skupin dosahovala sliznice průměrné výšky 113,8 μm ($P < 0,05$). Od 21 DPI došlo k postupnému snižování síly sliznice až na průměrnou sílu 125,9 μm 70 DPI, kdy byl experiment ukončen (Graf 3). Nejvyšší intenzita infekce měřená počtem vývojových stádií detekovaných ve žlázách žaludeční sliznice byla zjištěna 14 DPI, kdy bylo procento infikovaných žláz 60 %. Zánětlivé infiltráty byly v tento kontrolní den přítomny pouze ojediněle, nejvíce jich bylo pozorováno 28 DPI.

U experimentální skupiny myši C57Bl6 bylo pozorováno masivnější zesílení sliznice i rozsáhlejší přítomnost zánětlivých infiltrátů oproti experimentální skupině BALB/c myši. Největší zesílení sliznice v žaludku bylo zjištěno 28 DPI, kdy výška sliznice dosahovala 227,5 μm ($P < 0,05$). Od tohoto dne bylo pozorováno postupné snižování výšky sliznice až na průměrnou výšku 178,2 μm 70 DPI. Průměr výšky sliznice u kontrolní skupiny byl 132,5 μm (Graf 3). Vrchol intenzity infekce u C57Bl6 myši byl pozorován 14 DPI, procento infikovaných žláz bylo v průměru 45 %. Přítomnost zánětlivých infiltrátů byla nejvyšší 14 a 21 DPI, jak znázorňují oblasti vyznačené hvězdičkou na Obrázku 2, části C) a D).

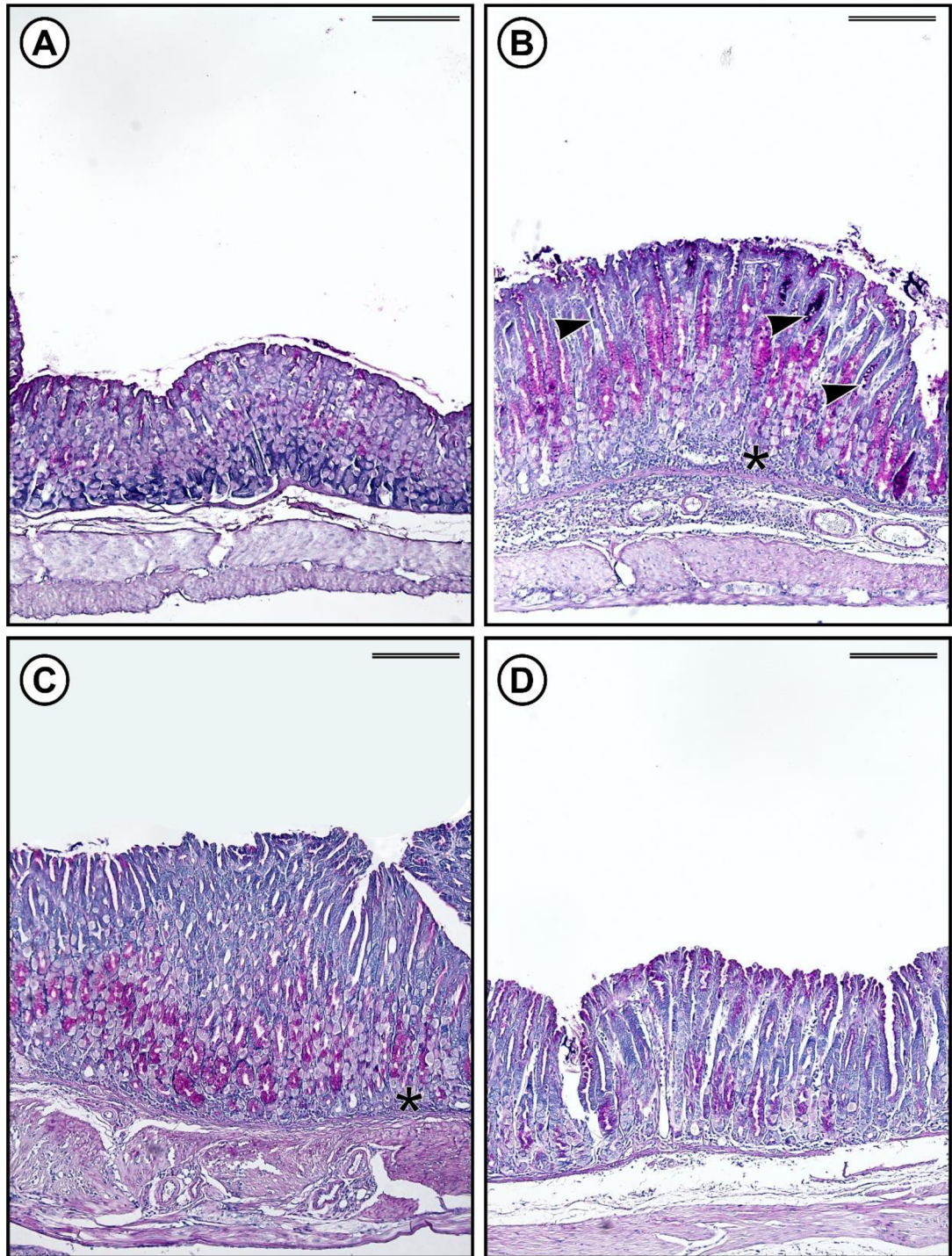
U experimentální skupiny mastomyši byl nárůst sliznice, intenzita infekce i přítomnost zánětlivých infiltrátů nejrozsáhlejší. Výška sliznice průběžně rostla v průběhu

experimentu až do jeho konce. Nejvyšší hodnota síly sliznice byla naměřena 63 DPI, kdy průměrná síla sliznice byla 493,6 μm . U kontrolní skupiny zvířat se výška sliznice pohybovala v průměru 138,7 μm ($P < 0,05$; Graf 3). Vrchol intenzity infekce nastal již 14 DPI, kdy procento infikovaných žláz tvořilo 100 %, a v průběhu experimentu až do jeho konce byl tento průměr téměř konstantní, neklesl pod 96 %. Zánětlivé infiltráty se ve zvýšeném množství začaly objevovat 14 DPI a jak je možno pozorovat i na Obrázku 3, částech C) a D), po dobu infekce nedošlo k žádné změně v tomto sledovaném parametru.

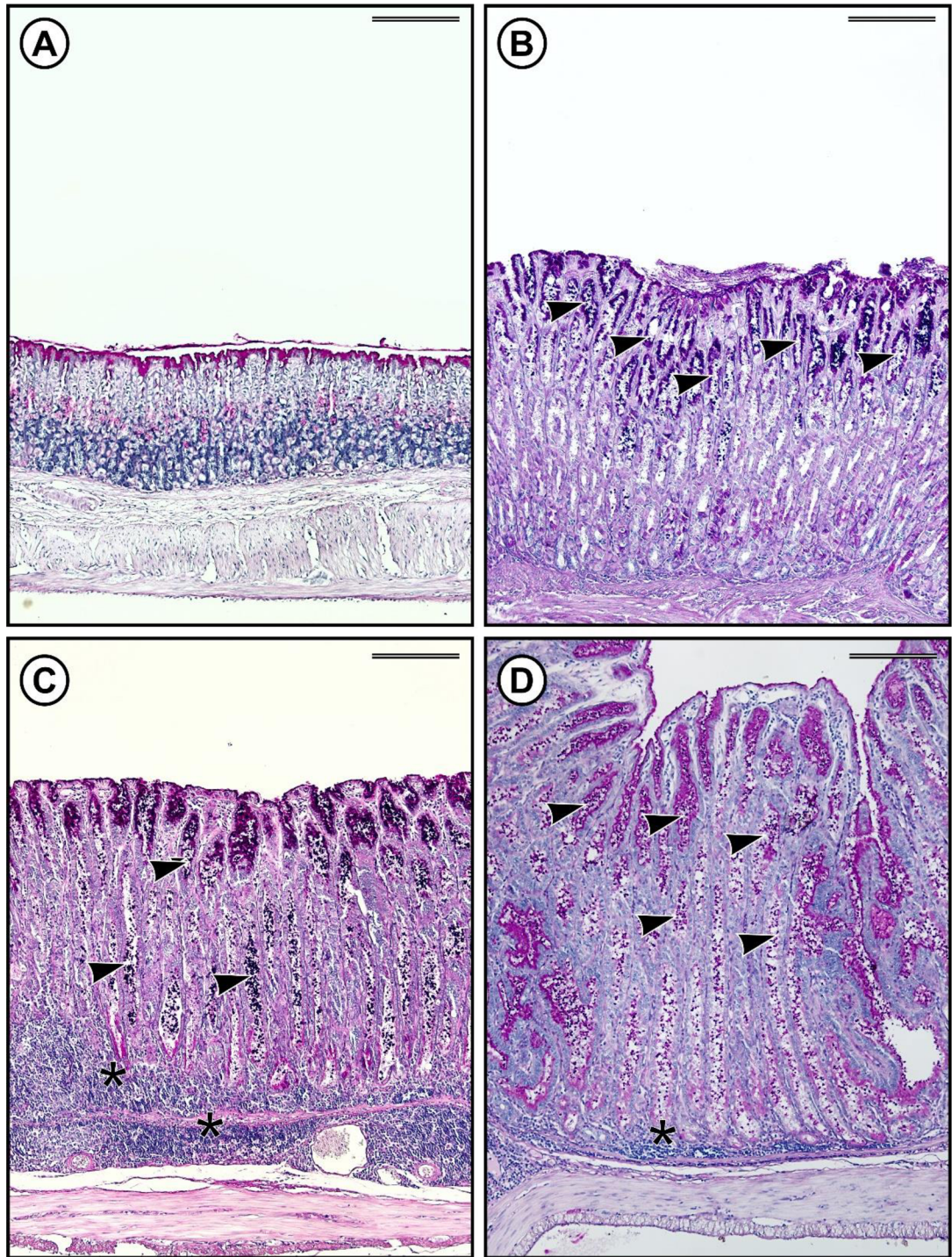
U kontrolních skupin byla zjištěna přítomnost hlenu pouze na povrchu žaludečních jamek. U experimentálně nakažených mastomysí byla od 7. DPI pozorována přítomnost hlenu kromě povrchu jamek i v hlubších částech sliznice, konkrétně v oblasti $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{3}$ žlázy. U infikované skupiny myší C57Bl6 došlo k výraznější produkci hlenu v oblasti $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{3}$ žlázy od 14. DPI. U infikovaných BALB/c myší byl hlen pozorován kromě povrchu i v oblasti $\frac{1}{3}$ žlázy 7 DPI, oblasti $\frac{1}{2}$ žlázy hlen dosahoval až 21 DPI. Jak znázorňuje Graf 4, hlen u experimentální skupiny BALB/c a C57Bl6 myší postupně z hlubších částí žláz ustupoval, oproti tomu u infikovaných mastomysí byl hlen v oblasti $\frac{1}{3}$ žlázy pozorován až do konce experimentu 70 DPI.



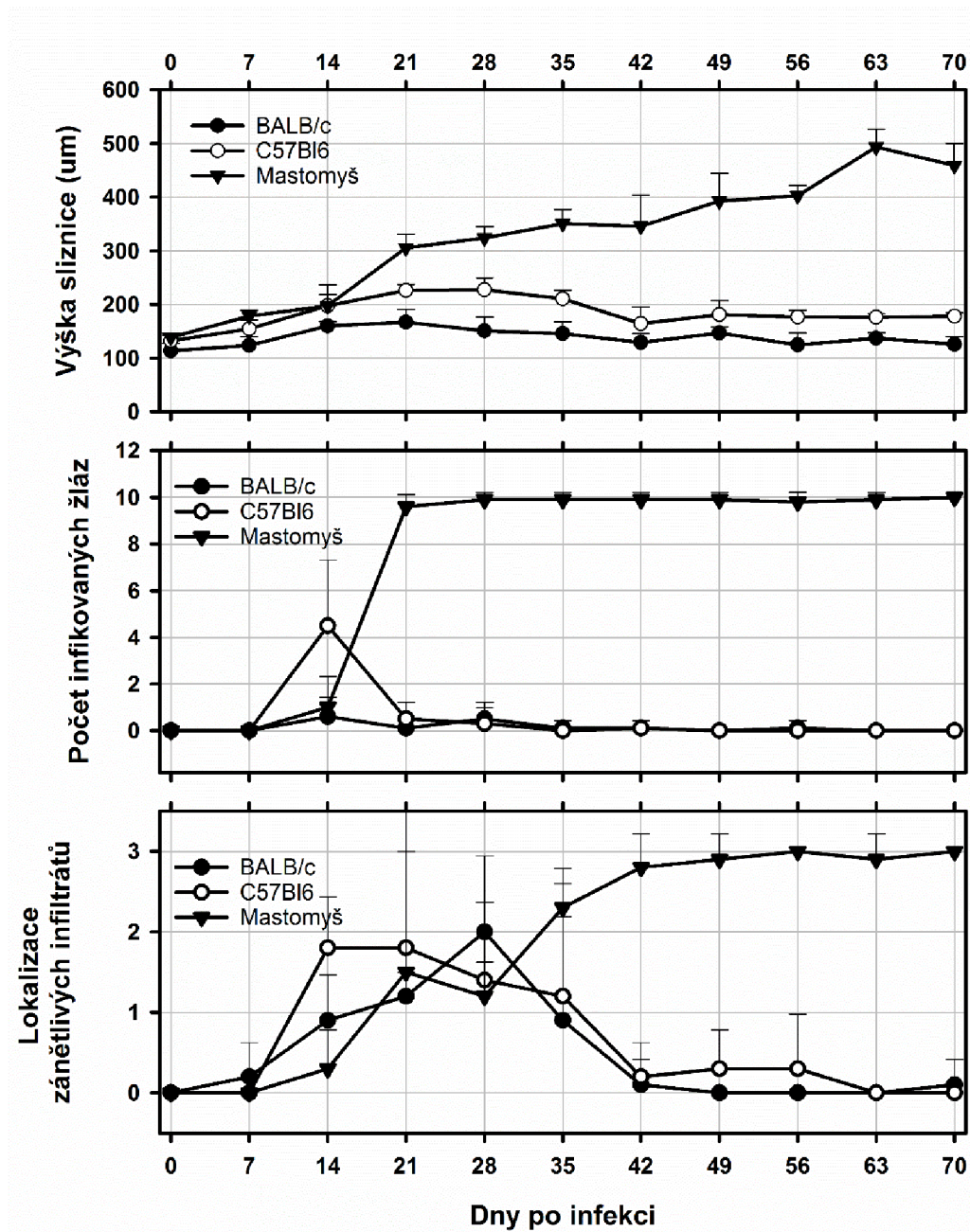
Obrázek 1: Průběh infekce *Cryptosporidium proliferans* u myši typu BALB/c v **A)** 0 DPI, **B)** 14 DPI, **C)** 21 DPI a **D)** 42 DPI. Histologické řezy žláznatého žaludku infikovaných myší, zpracované metodou popsanou v kapitole 4.10. DPI – dny po infekci. Šipky poukazují na přítomnost vývojových stádií *C. proliferans*. Měřítko = 20 μm .



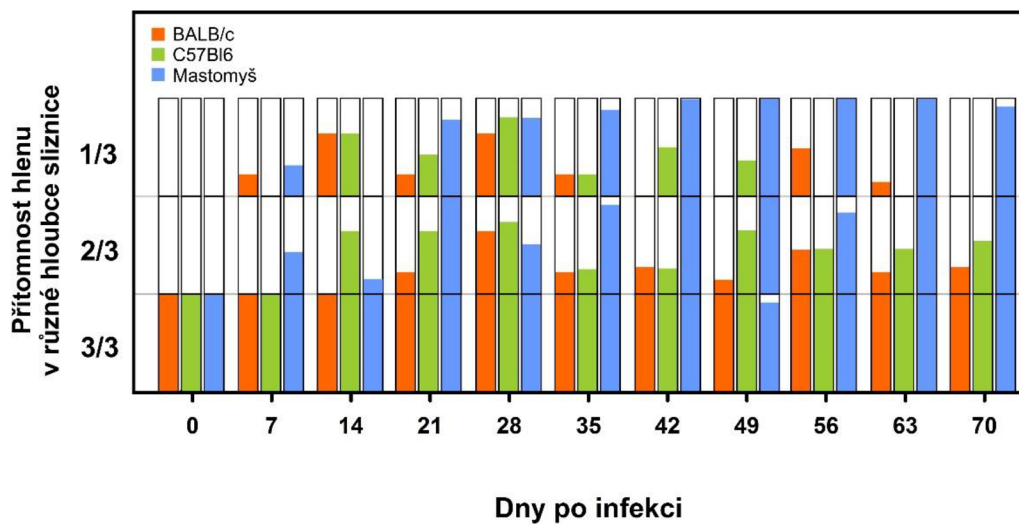
Obrázek 2: Průběh infekce *Cryptosporidium proliferans* u myši typu C57Bl6 v **A)** 0 DPI, **B)** 14 DPI, **C)** 21 DPI a **D)** 42 DPI. Histologické řezy žláznatého žaludku infikovaných myši, zpracované metodou popsanou v kapitole 4.10. DPI – dny po infekci. Šipky poukazují na přítomnost vývojových stádií *C. proliferans*; * znázorňuje zánětlivé infiltráty. Měřítka = 20 μm .



Obrázek 3: Průběh infekce *Cryptosporidium proliferans* u mastomyší v **A)** 0 DPI, **B)** 14 DPI, **C)** 35 DPI a **D)** 63 DPI. Histologické řezy žláznatého žaludku infikovaných myší, zpracované metodou popsanou v kapitole 4.10. DPI – dny po infekci. Šipky poukazují na přítomnost vývojových stádií *C. proliferans*; * znázorňuje zánětlivé infiltráty. Měřítko = 20 μ m.



Graf 3: Vývoj patologických změn (výška sliznice, počet infikovaných žláz a lokalizace zánětlivých infiltrátů) v průběhu infekce u myši BALB/c, C57BI6 a mastomyši. Zobrazené hodnoty představují průměrnou hodnotu ze tří jedinců ± směrodatná odchylka.



Graf 4: Přítomnost hleny v různé hloubce sliznice v průběhu infekce u myši BALB/c, C57Bl6 a mastomys. Výška sloupce znázorňuje množství hleny v jednotlivých třetinách výšky sliznice. Bíle vyplněné místo ukazuje, že hlen v dané části žlázy nebyl přítomen.

6 Diskuze

Na změnu hodnoty pH žaludku zvířat infikovaných žaludečními druhy kryptosporidií poukázal již v roce 1998 Anderson. U skotu nakaženého žaludečním druhem *Cryptosporidium andersoni* pozoroval zvýšení pH slezu na hodnoty v rozmezí 4,5–5, přičemž fyziologická hodnota pH slezu u zdravých zvířat se pohybuje v rozmezí 3,5–4. (Anderson 1998). Obdobný vliv infekce *C. proliferans* na změnu pH u infikovaných hlodavců jsme prokázali v naší práci. Zatímco Anderson se nezmiňuje o reverzibilní změně po samovyléčení infekce, naše experimenty prokázaly, že zvýšení pH v důsledku infekce žaludeční kryptosporidií je jen dočasné. Po vyléčení infekce dochází k pozvolnému návratu k fyziologickým hodnotám. Příčina, proč se Anderson o tomto fenoménu nezmiňuje, může být zapříčiněna tím, že experimenty na skotu v takovémto rozsahu nebyly provedena a navíc infekce *C. andersoni* u skotu je často celoživotní (Enemark *et al.* 2002; Ralston *et al.* 2003; Olson *et al.* 1997).

Detekce specifické DNA *C. proliferans* metodou PCR zjistila přítomnost parazitů u BALB/c a C57Bl6 myši již 7 DPI, což odpovídá prepatentní periodě v rozmezí 6–8 DPI zjištěné Kváčem *et al.* (2016). Oproti tomu mikroskopické vyšetření odhalilo přítomnost parazitů až 14 DPI, což je také v souladu s dříve publikovanými daty (Kváč *et al.* 2016; Melicherová *et al.* 2014). Prepatentní perioda o délce 21 DPI u mastomyši zjištěná v této práci odpovídá údajům popsáným Kváčem *et al.* (2016) při popisu tohoto druhu a také zjištěním Melicharové *et al.* (2014), která studovala průběh infekce a popis vývojového cyklu *C. proliferans*. Zatímco u dvou předchozích skupin myši BALB/c a C57Bl6 dochází v případě kryptosporidiózy po 21 DPI k postupnému samovyléčení (Jalovecká *et al.* 2010), pro mastomyši samovyléčení typické není a infekce u nich dlouho přetrvává (Kváč *et al.* 2016; Melicherová *et al.* 2014). Přetrvávající infekci od jejího detekovaného počátku v 21 DPI u mastomyši potvrdilo jak mikroskopické vyšetření, tak detekce specifické DNA metodou PCR.

Kromě změny pH ve slezu skotu pozoroval Anderson (1998) i jeho makroskopické změny. U chronicky nemocných zvířat byla sliznice slezu zbytnělá, čímž bylo způsobeno zvýšení hmotnosti slezu oproti zdravým zvířatům (Anderson 1998). Nezánetlivé histopatologické změny u infikovaných myši blíže popsal Matsubayashi *et al.* (2010). Obdobné změny popsal i Kváč a Vítovec ve své práci z roku 2003, ve které se zabývali patologickými změnami slezu mladého masného skotu přirozeně infikovaného *C. andersoni*. Na rozdíl od *C. andersoni* nebo *C. muris* infekce popsal Kváč *et*

al. (2016) výrazné zesílené sliznice žaludku infikovaného *C. proliferans* u mastomyší, zatímco u myší toto zesílení nebylo markantní. Výsledky této práce, které přímo navazují na výše zmíněný výzkum, potvrdily publikované údaje. Stejně jako v předchozích studiích, v naší studii došlo k výraznému zesílení sliznice u infikovaných mastomyší (Kváč *et al.* 2016; Melicherová *et al.* 2014). Přestože jsme v rámci naší práce nevážili hmotnost žaludku, došlo v průběhu infekce k jeho výraznému zvětšení. Nové zjištění, které tato práce přinesla je, že k obdobnému zvětšení i zesílení sliznice dochází i v případě krátkodobých infekcí u BALB/c a C57Bl6 myší. Je zřejmé, že zesílení sliznice přímo souvisí s délkou infekce (Anderson 1998; Kváč *et al.* 2016; Melicherová *et al.* 2014). Obdobné změny byly pozorovány i v případě myší infikovaných *C. andersoni* (Matsubayashi *et al.* 2010), kdy došlo až k trojnásobnému zvětšení výšky sliznice.

Výsledky naší práce odpovídají zjištění Jalovecké *et al.* (2010). Stejně jako Jalovecká a kol. nepozorovali přítomnost žádných T-lymfocytů v lyzátu žaludeční sliznice neinfikovaných myší, také v naší práci jsme nedetekovali žádné infiltráty buněk imunitního systému ve sliznici žaludku u skupiny kontrolních myší. U BALB/c myší došlo k postupnému zvyšování množství zánětlivých infiltrátů až do 28 DPI. To odpovídá výsledkům Jalovecké *et al.* (2010), která v tomto období naměřila nevyšší množství migrujících a proliferujících CD4 a CD8 T-lymfocytů. Naše i dříve publikované výsledky ukazují, že k maximální imunitní odezvě BALB/c myší dochází jeden týden po maximální intenzitě infekce (Jalovecká *et al.* 2010). V případě C57Bl6 myší došlo k rychlejší imunitní odezvě hostitele na infekci s maximálním výskytem zánětlivých infiltrátů 14 a 21 DPI, přestože maximální intenzita infekce byla pozorována 21 DPI. S brzkým výskytem zánětlivých infiltrátů může souviset velké množství infikovaných žláz již 14 DPI, jemuž však neodpovídal počet vylučovaných oocyst. Lze se domnívat, že časná imunitní odpověď mohla znamenat omezení infekce, která se neprojevila vyšším množstvím vylučovaných oocyst. Masivní infekce sliznice 14 DPI byla pravděpodobně způsobena nepohlavními stádii. U mastomyší byl pozorován postupný nárůst zánětlivých infiltrátů tak, jak docházelo k postupnému zvyšování počtu infikovaných žláz. Zatímco u BALB/c myší a C57Bl6 myší byl výskyt zánětlivých infiltrátů pouze při *lamina propria* nebo maximálně ve 2/3 výšky sliznice, u mastomyší byl výskyt od 42 DPI ve všech vrstvách sliznice. Tento rozdíl lze vysvětlit přetrvávající masivní infekcí v celé sliznici žaludku.

Hlenotvorné (mucinózní) buňky produkují hlenovou vrstvu silnou asi 60 μm , která chrání sliznici před chemickými a mechanickými účinky. Tvorba hlenu je závislá na správném prokrvení žaludeční stěny (Vernygorodskiy 2013). Zatímco infekce žaludku vyvolaná bakterií *Helicobacter pylori* má za následek nižší produkci hlenu a snížení jeho tloušťky (Clyne a May 2019; Byrd a Bresalier 2000), u všech hostitelů infikovaných *C. proliferans* jsme pozorovali postupné zvýšení tvorby hlenu, a to nejen v povrchové části, ale i v místech infekce ve střední a spodní části sliznice. Příčina této nadprodukce je zjevně zapříčiněna interakcí hostitele a kryptosporidie. Další studie by měly být zaměřeny na typ hlenu, který je nadprodukován, a jeho efekt na průběh infekce.

7 Závěr

Infekce způsobená *C. proliferans* u myši a mastomyši má přímý vliv na změnu pH v žaludku hostitele a zvýšení migrace buněk imunitního systému do sliznice žaludku. Hostitel na infekci reaguje zvýšenou tvorbou hlenu a proliferací sliznice, což má za následek zesílení sliznice a zvýšení hmotnosti žaludku. Po samovyléčení dochází k postupnému návratu morfologie a fyziologických funkcí žaludku na normální hodnoty.

8 Použití literatura

ALLEN, A, FLEMSTRÖM, G., GARNER, A. a KIVILAAKSO, E., 1993. Gastroduodenal Mucosal Protection. *Physiological Reviews*. **73**(4), 823-857. ISSN 0031-9333.

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. Prevalence of *Cryptosporidium muris*-like oocysts among cattle populations of the United States: preliminary report. *The Journal of Protozoology*. **38**(6), 14S-15S. ISSN 0022-3921.

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.

BLAGBURN, B. L., LINDSAY, D. S., HOERR, F. J., ATLAS, A. L. a TOIVIO-KINNUCAN, M., 1990. *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian Diamond Firetail Finch (*Staganoplura bella*: Passeriformes, Estrildidae). *Avian Diseases*. **34**(4), 1027-1030. ISSN 0005-2086.

BOLLAND, S. J., ZAHEDI, A., OSKAM, Ch., MURPHY, B. a RYAN, U., 2020. *Cryptosporidium bollandi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) 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 FORTN, J., 1977. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. *Veterinary Pathology*. **14**(6), 606-617. ISSN 0300-9858.

BYRD, J. C. a BRESALIER, R. S., 2000. Alterations in gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*. **6**(4), 475-482. ISSN 1007-9327.

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.

CASEMORE, D. P., 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Tropical Parasitology*. **8**(1), 2-7. ISSN 2229-5070.

CLYNE, M. a MAY, F. E. B., 2019. the Interaction of *Helicobacter pylori* with TFF1 and Its Role in Mediating the Tropism of the Bacteria Within the Stomach. *International Journal of Molecular Sciences*. **20**(18), 4400. ISSN 1422-0067.

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.

ČONDLOVÁ, Š., HOŘČIČKOVÁ, M., SAK, B., KVĚTOŇOVÁ, D., HLÁSKOVÁ, L., KONEČNÝ, R., STANKO, M., McEVOY, J. a KVÁČ, M., 2018. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Apodemus spp. *European Journal of Protistology*. **63**, 1-12. ISSN 0932-4739.

ENEMARK, H. L., AHRENS, P., LOWERY, C. J., THAMSBORG, S. M., ENEMARK, J. M., BILLE-HANSEN, V. a LIND, P., 2002. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterisation. *Veterinary Parasitology*. **107**(1-2), 37-49. ISSN 0304-4017.

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.

FLEMSTRÖM, G., 1986. Gastroduodenal mucosal secretion of bicarbonate and mucus. *The American Journal of Medicine*. **81**(2A), 18-22. ISSN 0002-9343.

FLEMSTRÖM, G. a ISENBERG, J. I., 2001. Gastroduodenal mucosal alkaline Secretion and mucosal protection. *News in Physiological Sciences*. **16**, 23-28. ISSN 0886-1714.

HOLUBOVÁ, N., SAK, B., HOŘČIČKOVÁ, M., HLÁSKOVÁ, L., KVĚTOŇOVÁ, D., MENCHACA, S., McEVOY, J. a KVÁČ, M., 2016. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitology Research*. **115**(6), 2243-2251. ISSN 1432-1955.

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., 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*. **06**(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.

KING, B. J., KEEGAN, A. R., MONIS, P. T. a SAINT, Ch. P., 2005. Environmental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(7), 3848-3857. ISSN 0099-2240.

KVÁČ, M. a VÍTOVEC, J., 2003. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. **50**(9), 451-457. ISSN 0931-1793.

KVÁČ, M., ONDRÁČKOVÁ, Z., KVĚTOŇOVÁ, D., SAK, B., VÍTOVEC, J., 2006. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology*. **143**(3-4), 229-233. ISSN 0304-4017.

KVÁČ, M., SAK, B., KVĚTOŇOVÁ, D., DITRICH, O., HOFMANNOVÁ, L., MODRÝ, D., VÍTOVEC, J. a XIAO, L., 2008. Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Veterinary Parasitology*. **153**(3-4), 363-367. ISSN 0304-4017.

KVÁČ, M., HOFMANNOVÁ, L., HLÁSKOVÁ, L., KVĚTOŇOVÁ, D., VÍTOVEC, J., McEVOY, J. a SAK, Bohumil, 2014. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehog. *Veterinary Parasitology*. **201**(1-2), 9-17. ISSN 0304-4017.

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).

LEANDER, B. S., CLOPTON, R. E. a KEELING, P. J., 2003. Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and β -tubulin. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**(Pt 1), 345-354. ISSN 1466-5026.

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.

MATHIEU, E., LEVY, D. A., VEVERKA, F., PARRISH, M., SARISKY, J., SHAPIRO, N., JOHNSTON, S., HANDZEL, T., HIGHTOWER, A., XIAO, L., LEE, Y.,

YORK, S., ARROWOOD, M., LEE, R. a JONES, J. L., 2004. Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **71**(5), 582-589.

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.

MATSUI, T., FUJINO, T., KAJIM, J. a TSUJI, M., 2000. Infectivity and oocyst excretion patterns of *Cryptosporidium muris* in slightly infected mice. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **63**(3), 319-320. ISSN 0916-7250.

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., 2013. 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.

MORGAN, U. M., CONSTANTINE, C. C., FORBES, D. A. a THOMPSON, R. C. A., 1997. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *The Journal of Parasitology*. **83**(5), 825-830. ISSN 0022-3395.

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

OLSON, M. E., THORLAKSON, C. L., DESELLIERS, L., MORCK, D. W. a McALLISTER, T. A., 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Veterinary Parasitology*. **68**(4), 375-381. ISSN 0304-4017

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

POSPISCHIL, A., STIGLMAIR-HERB, M. T., VON HEGEL, G. a WIESNER, H., 1987. Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelies. *Veterinary Record*. **121**(16), 379-380. ISSN 2042-7670.

RALSTON, B. J., COCKWILL, C. L., GUSELLE, N. J., VAN HERK, F. H., McALLISTER, T. A. a OLSON, M. E., 2003. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium andersoni* and their effects on performance in feedlot beef cattle. *Canadian Journal of Animal Science*. **83**(1), 153-159. ISSN 83984.

RYAN, U., XIAO, L., READ, C., SULAIMAN, I. M., MONIS, P., LAL, A. A., FAYER, R. a PAVLÁSEK, I., 2003. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *The Journal of Parasitology*. **89**(4), 809-813. ISSN 0022-3395.

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.

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

VERNYGORODSKYI, S., 2013. Immunohistochemical evaluation of mucin expression in precancerous tissue of stomach. *Experimental Onkology*. **35**(2), 114-117. ISSN 1812-9269.

WIDMER, G. a SULLIVAN, S., 2012. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunology*. **34**(2-3), 61-71. ISSN 1365-3024.

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.