

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Agroekologie

Katedra: Katedra zootechnických a veterinárních disciplín a kvality produktů

Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Prevalence a diverzita kryptosporidií infikujících veverky
(Sciuridae)**

Biology and diversity of *Cryptosporidium* infecting squirrels
(Sciuridae)

Vypracoval: **Bc. Pavel Barvůř**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.**

Abstract

V období mezi lety 2010 až 2013 bylo odebráno 399 vzorků trusu od třech druhů veverek čeledi Sciuridae (*Sciurus vulgaris*, *Sciurus carolinensis* a *Callosciurus finlaysonii*), odchycených na severu Itálie. Všechny tyto vzorky byly následně vyšetřeny na přítomnost kryptosporidií, která byla pomocí molekulárního vyšetření prokázána u 18 vzorků (4,5%). Sekvenční analýzou bylo zjištěno, že z 18 pozitivních vzorků, bylo 12 vzorků pozitivních na *Cryptosporidium ferret* genotype, 3 na *Cryptosporidium* skunk genotype, 1 na *Cryptosporidium* chipmunk genotype I a 2 vzorky na *Cryptosporidium ubiquitum*. Více než 90 % vyšetřených jedinců bylo adultních. Bylo prokázáno, že juvenilní jedinci veverek čeledi Sciuridae jsou častěji infikováni kryptosporidii než adultní jedinci. V rámci druhů nebyl pozorován vliv věku a pohlaví na výskyt kryptosporidií.

Klíčová slova: *Cryptosporidium*; Sciuridae; epidemiologie; PCR; fylogenetika

Summary

In total 399 samples from three species of squirrels (*Sciurus vulgaris*, *Sciurus carolinensis* and *Callosciurus finlaysonii*) were collected from 2010 to 2013. All samples were examined for the presence of *Cryptosporidium* using by molecular methods, which demonstrated by presence of *Cryptosporidium* specific DNA in 18 samples (4.5%). Out of them 12 samples were positive on *Cryptosporidium* ferret genotype, 3 on *Cryptosporidium* skunk genotype, 1 on *Cryptosporidium* chipmunk genotype I and 2 samples on *Cryptosporidium* *ubiquitum*. Statistical analyses did not reveal any influence of gender on the occurrence of *Cryptosporidium*. Juvenile individuals of squirrels from the family Sciuridae are more often infected by *Cryptosporidium* than the adult animals.

Key words: *Cryptosporidium*; Sciuridae; epidemiology; PCR; phylogenetic

Touto cestou bych rád poděkoval celému kolektivu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i. za ochotu a přátelské jednání, především pak mému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za odborné vedení mé práce a cenné rady. Dále pak chci poděkovat svým rodičům za podporu a vytvoření vhodných podmínek pro studium. Rovněž chci poděkovat všem, kdo mi byli nápomocni při odběru vzorků.

Tato práce byla finančně podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LH11061) a grantovou agenturou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (011/2013/Z).

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce na téma: **Prevalence a diverzita kryptosporidií infikujících veverky (Sciuridae)**, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby tutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů

.....

Pavel Barvíř

V Českých Budějovicích dne 25. 4. 2014

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Literární přehled.....	9
2.1 Historie kryptosporidií	9
2.2 Taxonomie	9
2.3 Způsob přenosu a průběh infekce	10
2.4 Vývojový cyklus	11
2.5 Hostitelská specifita	11
2.6 Klinické příznaky	12
2.7 Terapie.....	12
2.8 Kryptosporidie a kryptosporidióza hlodavců z čeledi Sciuridae....	12
2.8.1 <i>Cryptosporidium muris</i>	13
2.8.2 <i>Cryptosporidium parvum</i>	13
2.8.3 <i>Cryptosporidium ubiquitum</i>	13
2.8.4 <i>Cryptosporidium ferret</i> genotype	14
2.8.5 <i>Cryptosporidium chipmunk</i> genotype I	14
2.8.6 <i>Cryptosporidium chipmunk</i> genotype II	14
2.8.7 <i>Cryptosporidium chipmunk</i> genotype III.....	14
2.8.8 <i>Cryptosporidium deer mouse</i> genotype III	14
2.8.9 <i>Cryptosporidium skunk</i> genotype	14
2.8.10 Další genotypy	15
3. Cíle.....	16
4. Metodika a materiál.....	17
4.1 Charakteristika lokalit	19
4.2 Metody	21
4.2.1 Barvení oocyst kryptosporidií podle Miláčka a Vítovce (1985)	21
4.2.2 Izolace DNA.....	21
4.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	22
4.2.4 Gelová elektroforéza	23
4.2.5 Izolace gelu	24

4.2.6	Sekvenace.....	24
4.2.7	Fylogenetická analýza.....	24
4.2.8	Statistická analýza.....	25
5.	Výsledky.....	26
5.1	Mikroskopické vyšetření.....	26
5.2	Molekulární analýzy.....	26
5.2.1	Vliv druhu hostitele na výskyt kryptosporidií u sledovaných zvířat.....	26
5.2.2	Vliv pohlaví na výskyt kryptosporidií u sledovaných zvířat	27
5.2.3	Vliv věku na výskyt kryptosporidií u sledovaných zvířat.....	27
5.3	Genotypizace.....	28
6.	Diskuze	31
7.	Závěry.....	33
8.	Seznam literatury	34

1. Úvod

Paraziti z rodu *Cryptosporidium* jsou celosvětově rozšíření prvoci infikující široké spektrum hostitelů od plazů, ryb, ptáků přes savce až po člověka. Onemocnění způsobované těmito parazity se nazývá kryptosporidióza. Infekce těmito parazity se s velkou pravděpodobností vyskytuje u všech druhů savců (Tzipori at Ward 2002). Hostitelská specifita zástupců rodu *Cryptosporidium* se liší v závislosti na druhu. Jako hostitelé bylo popsáno mnoho druhů domestikovaných i volně žijících živočichů včetně hlodavců (Feng 2008).

Infekční stádia kryptosporidií jsou velice odolná a dlouho přežívají ve vnějším prostředí, ve vhodných podmínkách, jako je vlhká půda nebo voda, jsou schopni přežít i několik měsíců. Při teplotách okolo 20 °C jsou oocysty schopné přežít a zůstat infekce schopné po dobu šesti měsíců (Fayer et al. 1998). Například oocysty *C. parvum* zůstávají při zmrazení na -10° C infekce schopné až jeden týden (Fayer et al. 1996; 1998). Oocysty jsou přenášeny fekálně-orální cestou. Nezřídka se vyskytují případy zoonotických infekcí a přenosy infekce z člověka na člověka (O'Donoghue 1995). Kryptosporidióza je klasifikována jako vodou přenášené onemocnění infekční též pro člověka (Jiang et al. 2005b; Ryan et al. 2005). Oocysty kryptosporidií jsou odolné vůči desinfekčním prostředkům, které se běžně užívají při hygienickém zabezpečení pitné vody, v důsledku toho se staly velkým problémem v oblasti veřejného zdraví (Xiao et al. 2000).

Je známo mnoho případů, kdy došlo k infekci lidí kryptosporidiemi z kontaminované vody a z potravin po celém světě (Smith and Rose 1998; Fayer et al. 2000). K nejrozsáhlejší epidemii došlo v roce 1993 v Milwaukee v USA, kde bylo kryptosporidiemi infikováno více než 400 tisíc lidí (MacKenzie et al. 1994).

Sundberg et al. (1982) poprvé informovali o výskytu kryptosporidií u veverek rodu *Sciurus*, když našly oocysty *C. parvum* ve vzorcích trusu veverky šedé (*Sciurus carolinensis*). Kryptosporidióza zástupců čeledi Sciuridae je vyvolána různými druhy a genotypy kryptosporidií, a to jak žaludečními, tak i střevními (Matsui et al. 2000, Perz and Blancq 2001, Bertolino et al. 2003, Hůrková et al. 2003, Atwill et al. 2004, Feng et al. 2007; Kváč et al. 2008).

2. Literární přehled

2.1 Historie kryptosporidií

První zmínka o kryptosporidiích pochází již z počátku 20. století, přesněji z roku 1907, kdy lékař a parazitolog jménem Ernest Edward Tyzzer našel prvoka parazitujícího v žaludku laboratorních myši a pojmenoval jej *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). O pět let později Tyzzer popsal další druh kryptosporidií vyskytující se u myši a infikující tenké střevo, který pojmenoval *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). Tyzzer detekoval parazita velmi se podobajícího *C. parvum* u kuřat (Tyzzer 1929). Až v roce 1995 byl popsán třetí druh kryptosporidií u krůt - *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955).

V roce 1976 byly detekovány první případy výskytu kryptosporidií u lidí (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976). O tuto problematiku nebyl do té doby příliš velký zájem, až do chvíle, kdy bylo zjištěno, že kryptosporidie představují smrtelné nebezpečí pro pacienty nakažené HIV s rozvinutým AIDS. Tímto okamžikem lékařský zájem o epidemiologii, diagnostiku a terapii kryptosporidiózy velmi vzrostl (Fayer et al. 1986). Další zásadní zlom ve studiu kryptosporidií a kryptosporidiových infekcí představovala dosud největší epidemie kryptosporidiózy v roce 1993 ve městě Milwaukee, nacházejícím se na jihu státu Wisconsin v USA, kdy bylo nakaženo více než 400 tisíc lidí (MacKenzie et al. 1994).

První zmínka o výskytu kryptosporidií u zástupců čeledi Sciuridae pochází z roku 1982, kdy byl u veverky šedé (*Sciurus carolinensis*) zaznamenán výskyt *Cryptosporidium parvum* (Sundberg et al. 1982). Později byly kryptosporidie detekovány u veverky liščí (*Sciurus niger*), veverky létající a sysla (Current 1989). U červené veverky (*Sciurus vulgaris*) byla přítomnost *Cryptosporidium parvum* poprvé detekována v roce 2001 (Bertolino et al. 2003). U tohoto druhu veverky byly později detekovány také dva genotypy kryptosporidií, a to *Cryptosporidium ferret* a chipmunk genotype (Kváč et al. 2008).

2.2 Taxonomie

Paraziti z rodu *Cryptosporidium* jsou jednobuněční eukaryotní prvoci, což znamená, že většina jejich DNA je obsažena v jádru, které je obklopeno dvojíou membránou (Fayer et al. 2008).

Kryptosporidie byly díky jejich vývoji v gastrointestinálním traktu nejprve nepřesně řazeny mezi kokcidie, zejména z rodu *Sarcocystis* spp. (Fayer et al. 1997). K záměnám docházelo z důvodu, že mnoho druhů sarkocyst obsahuje stejně jako oocysty kryptosporidií čtyři sporozoity (Xiao et al. 2004). Dle prvotního taxonomického zařazení patřily tedy kryptosporidie do kmene Apicomplexa, třídy Sporozoasida, podtřídy Coccidiasina, řádu Eucoccidiorida, podřádu Eimeriorina a rodu *Cryptosporidium* (Levine, 1985; Tzipori et Griffiths, 1998). Později bylo pomocí molekulárních analýz prokázáno, že kryptosporidie jsou si blíže podobné s gregarinami, než s kokcidiemi (Carreno et al. 1999). Dle současné taxonomie jsou kryptosporidie řazeny do domény Eukaryota, říše Chromalveolata, nadkmenu Alveolata, kmene Apicomplexa, třídy Coccidea, řádu Eucoccidiorida, čeledi Cryptosporidiidae a rodu *Cryptosporidium* (Fayer et Xiao 2008).

2.3 Způsob přenosu a průběh infekce

Paraziti rodu *Cryptosporidium* nejčastěji napadají trávicí trakt, ale zejména u ptáků může být infikována dýchací soustava nebo Fabriciova bursa (Plutzer et Karanis 2009). Přestože většina kryptosporidií infikuje převážně různé části střev svých hostitelů, bazální druhy a genotypy kryptosporidií infikují žaludeční sliznici (Abubakar et al. 2007). U imunokompetentních jedinců může docházet i ke generalizované kryptosporidióze.

Fekálně-orální cestou tedy dojde k přenosu infekce z infikovaného jedince na vnímavého hostitele. Infekce může být přenášena přímým kontaktem mezi osobami, popřípadě při sexuálních aktivitách, přenosem ze zvířete na zvíře, ze zvířete na člověka, pitnou i jinou vodou, potravou a popřípadě vzduchem (Dupont et al. 1995). K infekci hostitele dochází nejčastěji pozřením oocyst s kontaminovanou potravou či vodou (Atwill et al. 2002; Da Silva et al. 2003; Fayer 2004; Kváč et al. 2008; Santín et al. 2005). Infekční dávka se liší v závislosti na vnímavosti a odolnosti konkrétního hostitele. U odolných jedinců je zapotřebí pozření většího množství oocyst než například u jedinců s oslabenou imunitou, kdy i pozření pouhých deseti oocyst může způsobit infekci a vyvolat onemocnění (Okhuysen et al. 1999).

2.4 Vývojový cyklus

Všichni paraziti z rodu *Cryptosporidium* dokončují veškerá svá vývojová stádia v jednom hostiteli (Reduker et al. 1985). Všechny druhy kryptosporidií jsou obligátní epicelulární paraziti. Po perorálním pozření dochází k excystaci, při které se z jedné oocysty uvolní čtyři sporozoiti schopní pohybu a napadající epitelové buňky především gastrointestinálního traktu (Fayer 2004). Následuje merogonie, čili asexuální množení, při kterém vznikají dva typy merontů, meronti typu I a meronti typu II (Hijjawi et al. 2004). Meronti typu I obsahují 6-8 merozoitů, kteří následně opakují asexuální množení. Meronti typu II produkují 4 merozoity, z kterých následně vznikají mikro a makrogametocyty a nastává sexuální fáze vývoje zvaná gametogonie (Sunnotel et al. 2006).

Při gametogonii vznikají samčí a samičí gamonti, samčí mikrogamonti a samičí makrogamonti, z nich následně vznikají mikro a makrogamety. Po oplození makrogamet mikrogametami vzniká oplozená zygota, uvnitř které následně vznikají čtyři sporozoiti (Xiao et Fayer 2008; Liu et al. 2009). Tento proces nazýváme sporogonie.

2.5 Hostitelská specifita

Jeden druh nebo jeden genotyp kryptosporidií obvykle infikuje pouze jeden konkrétní druh hostitele, nebo skupinu příbuzných živočichů. Přenos kryptosporidií mezi různými skupinami zvířat je obvykle omezen, ale v případě, že druhy obývají podobné lokality a parazit je biologicky uzpůsoben infikovat více druhů hostitelů, je tento přenos možný. Příkladem může být *Cryptosporidium* skunk genotype a *Cryptosporidium ubiquitum*. *Cryptosporidium* skunk genotype byl detekován v trusu skunka pruhovaného, mývala severního, veverek a vačíc (Feng et al. 2007). *Cryptosporidium ubiquitum* bylo detekováno v trusu domácích a volně žijících přežvýkavců například u ovce, muflona a jelena, dále u hlodavců jako jsou veverky, bobři a myši, z masožravců pak u mývala severního a z primátů u lemurů a lidí (Perz et Le Blancq, 2001; Ong et al. 2002; da Silva et al, 2003; Ryan et al, 2003; Ryan et al, 2005; Blackburn et al. 2006; Feltus et al. 2006; Leoni et al., 2006; Nichols et al, 2006; Soba et al, 2006; Trotz-Williams et al, 2006; Feng et al, 2007).

2.6 Klinické příznaky

Kryptosporidióza je častou příčinou gastroenteritidy, která může být v mnoha případech život ohrožující, zvláště u imunokompromitovaných jedinců (Abubakar et al. 2007). Klinický průběh a závažnost infekce se může značně lišit od jedince k jedinci, kdy důležitou roli hraje především stav imunitního systému. Infikovaní jedinci vykazují známky onemocnění především vodnatými průjmy s občasou přítomností hlenu, krev se ve stolici vyskytuje vyjimečně. Doprovázejícími příznaky kryptosporidiózy může být nechutenství, dýchací obtíže, nevolnost, únava, hubnutí, křečovitá bolest břicha a horečka (Jokipii et Jokipii 1986). U hospodářských a domácích zvířat se nákaza projevuje obdobně jako u lidí, nejvýznamnějším projevem kryptosporidiózy je tedy i u zvířat vodnatý průjem. Klinické příznaky byly zaznamenány například u skotu, ovcí, koz a farmově chovaných jelenů (Angus 1990).

2.7 Terapie

V současné době nejsou známa žádná účinná chemoterapeutika k léčbě onemocnění způsobených kryptosporidiiemi (Fayer et al. 2000). Z antibiotických léčiv užívaných proti kryptosporidióze se infikovaným pacientům může podávat například Paromomycin, který mírně účinkuje při infekci způsobené *Cryptosporidium parvum* (Griffiths et al. 1998). Poměrně dobrých výsledků při léčbě lze dosáhnout použitím kombinace léčiv Paromomycin a Azithromycin (Smith et al. 1998). Na hlodavcích byla například testována probiotika, kdy při experimentálních studiích se čerstvě narozená mláďata potkanů, jimž byl lék podán, rychleji zbavila infekce (Guitard et al. 2006).

Proběhlo již několik pokusů o léčbu kryptosporidiózy, ale výsledky nejsou příliš přesvědčivé, například Maggi et al. (2000) léčili HIV pozitivní pacienty, kteří byli pozitivní na kryptosporidie za pomoci antiretrovirotik. Úspěšnost léčby dosahovala pouhých 28 %. Proto je nutné důkladně porozumět přenosové dynamice těchto parazitů (Ryan et al. 2003).

2.8 Kryptosporidie a kryptosporidióza hlodavců z čeledi Sciuridae

Kryptosporidie jsou běžní paraziti různých druhů obratlovců. Bylo popsáno 30 druhů kryptosporidií a více než 100 genotypů (Plutzer at Karanis 2009; Kváč et al. 2013). Některé z druhů a genotypů, jako jsou například *C. muris*,

Cryptosporidium skunk genotype nebo chipmunk genotype I, jsou přirození paraziti hlodavců. Jiní, jako například *C. parvum* nebo *C. ubiquitum* mohou hlodavce využít pouze jako rezervoárového hostitele (Xiao et Fayer 2008; Xiao et Fen, 2008; Feng et al. 2011).

2.8.1 *Cryptosporidium muris*

Tento parazit byl poprvé nalezen v žaludku laboratorních myší (Tyzzer 1907). Velikost oocyst $8,4 (7,5-9,8) \times 6,3 (5,5-7,0) \mu\text{m}$ (Iseki 1986). První zmínka o výskytu *C. muris* u zástupců čeledi Sciuridae pochází z roku 2003, kdy byl za pomoci molekulárního vyšetření zjištěn výskyt *C. muris* ve vzorcích od burunduka páskovaného (*Eutamias sibiricus*) dovezených z jihovýchodní Asie (Hůrková et al. 2003). V USA byl tento parazit detekován v New Yorku u jednoho jedince *Sciurus carolinensis* (Feng et al. 2007).

2.8.2 *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium parvum bylo poprvé popsáno v laboratorních myších (Tyzer 1912). Později byl nalezen u hrabošů a myší po celém světě (Morgan et al. 1999; Bajer et al. 2003). Velikosti oocyst *C. parvum* se pohybuje v rozmezí $4,2 (4,2-5,8) \times 4,8 (3,5-5,0) \mu\text{m}$ (Hijjawi et al. 2002). Sundberg et al. (1982) poprvé informovali o výskytu *C. parvum* v USA u zástupců čeledi Sciuridae, když detekovali tohoto parazita ve vzorcích od veverek šedých (*Sciurus carolinensis*). U vzorků syslů veveričích (*Spermophilus beecheyi*) z Kalifornie byla zjištěna molekulárním vyšetřením prevalence jedinců vylučujících oocysty *C. parvum* 16 % (Atwill et al. 2001). Feng et al. (2007) detekovali tohoto parazita v jednom vzorku od veverky šedé (*Sciurus carolinensis*) v New Yorku.

2.8.3 *Cryptosporidium ubiquitum*

C. ubiquitum dříve označované jako *Cryptosporidium cervine* genotype bylo zjištěno například u 2 jedinců čipmanka východního (*Tamias striatus*), 3 jedinců veverek šedých (*Sciurus carolinensis*) a 1 jedince veverky červené (*Sciurus vulgaris*) vyšetřených v New Yorku (Feng et al. 2007). Velikost oocyst *C. ubiquitum* se pohybuje v rozmezí $4,1 - 5,3 \times 4,3 - 5$ (Fayer et al. 2010).

2.8.4 *Cryptosporidium ferret* genotype

Velikost oocyst *Cryptosporidium ferret* genotype detekovaných ze vzorků od červených veverek (*Sciurus vulgaris*) je 5,5 (4,9–6,0) × 5,1 (4,7–5,6) μm. Zjištěná prevalence tohoto genotypu u vyšetřených vzorků červených veverek z Itálie byla 21,15 % (Kváč et al. 2008).

2.8.5 *Cryptosporidium chipmunk* genotype I

Velikost oocyst *Cryptosporidium chipmunk* genotype I detekovaných u veverek červených (*Sciurus vulgaris*) v Itálii se pohybuje v rozmezí 5,8 (5,3–6,6) × 5,4 (4,7–5,9) μm (Kváč et al. 2008).

O výskytu tohoto parazita u hlodavců není zatím příliš známo. Jsou zmínky o výskytu *C. chipmunk* genotype I u veverky šedé (*Sciurus carolinensis*) a myši (*Peromyscus maniculatus*) v New Yorku (Feng et al. 2007). Infekce způsobená tímto parazitem byla také zjištěna u lidí a to u HIV pozitivního pacienta ve Francii (Anofel 2010) a u dvou pacientů ze Švédska (Lebbad et al. 2013).

2.8.6 *Cryptosporidium chipmunk* genotype II

Výskyt toho genotypu byl zaznamenán v New Yorku a to u jednoho jedince čipmanka východního (*Tamias striatus*) (Feng et al. 2007).

2.8.7 *Cryptosporidium chipmunk* genotype III

Chaochao et al. (2009) poprvé detekovali tento genotyp v Číně u jednoho jedince burunduka páskovaného (*Eutamias sibiricus*).

2.8.8 *Cryptosporidium deer mouse* genotype III

O tomto genotypu je doposud známo velice málo informací. Ze zástupců čeledi Sciuridae byl výskyt tohoto parazita zaznamenán u 5 jedinců veverky šedé (*Sciurus carolinensis*) v New Yorku (Feng et al. 2007).

2.8.9 *Cryptosporidium skunk* genotype

Ziegler et al. (2007) detekovali *Cryptosporidium skunk* genotype u veverek šedých (*Sciurus carolinensis*) v New Yorku. Tento genotyp byl obdobně jako *Cryptosporidium chipmunk* genotype I zjištěn také u lidských pacientů a to u 25 leté ženy ve Velké Británii (Robinson et al. 2008).

2.8.10 Další genotypy

Je znám výskyt ještě několika dalších genotypů, které byly detekovány u různých druhů zvířat, ale doposud je o těchto genotypech příliš málo informací.

Patří mezi ně například *Cryptosporidium* genotype Sbey03a, Sbey03b a Sbey03c, které byly detekovány v USA u zemních veverek druhu *Spermophilus beecheyi*. Tyto sekvence se nejlépe shodují s prasečími kryptosporidii *C. parvum* a to 96 % a s *C. wrairi* 97 % (Atwill et al. 2004). Pereira et al. (2010) informovali o výskytu genotypů kryptosporidií Sby03a, Sby03c a Sby05c u pozemních veverek druhu *Spermophilus beecheyi*, dále Sbld05a a Sbld05c u pozemních veverek druhu *Uracitellus beldingi* (Pereira et al. 2010).

3. Cíle

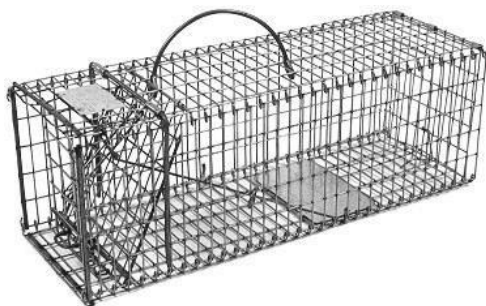
- Vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikujících volně žijící veverky na území Itálie.
- Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp kryptosporidií.
- Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů.
- V případě silných infekcí popsat morfologii a morfometrii oocyst.

4. Metodika a materiál

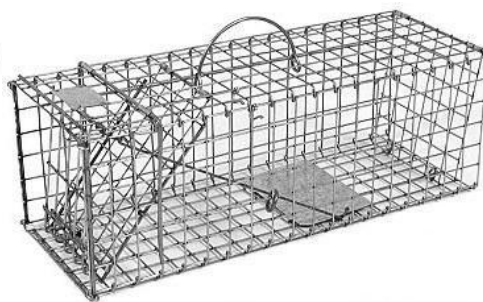
V období od roku 2009 do roku 2013 byly odebírány vzorky trusu od tří druhů veverek (*Sciurus vulgaris*, *Sciurus carolinensis* a *Callosciurus finlaysonii*). Veverky byly odchyťávány živé za pomoci lapacích drátěných pastí Tomahawk model 201 a Tomahawk model 202 (obrázky 1. a 2.), v 38 lokalitách na severu Itálie (tabulka 1. a 2.)

Po odchytu byl u zvířat určen věk, pohlaví a hmotnost a zvířata byla opět vypuštěna zpět do přírody. Z pasti byl odebrán trus a umístěn do lahvičky s obsahem 2,5% vodného roztoku dichromanu draselného ($K_2Cr_2O_7$) a skladován při teplotě 4 °C.

Obrázky 1. a 2. Modely lapacích pastí sloužící pro odchyt hlodavců použité při odchytu veverek

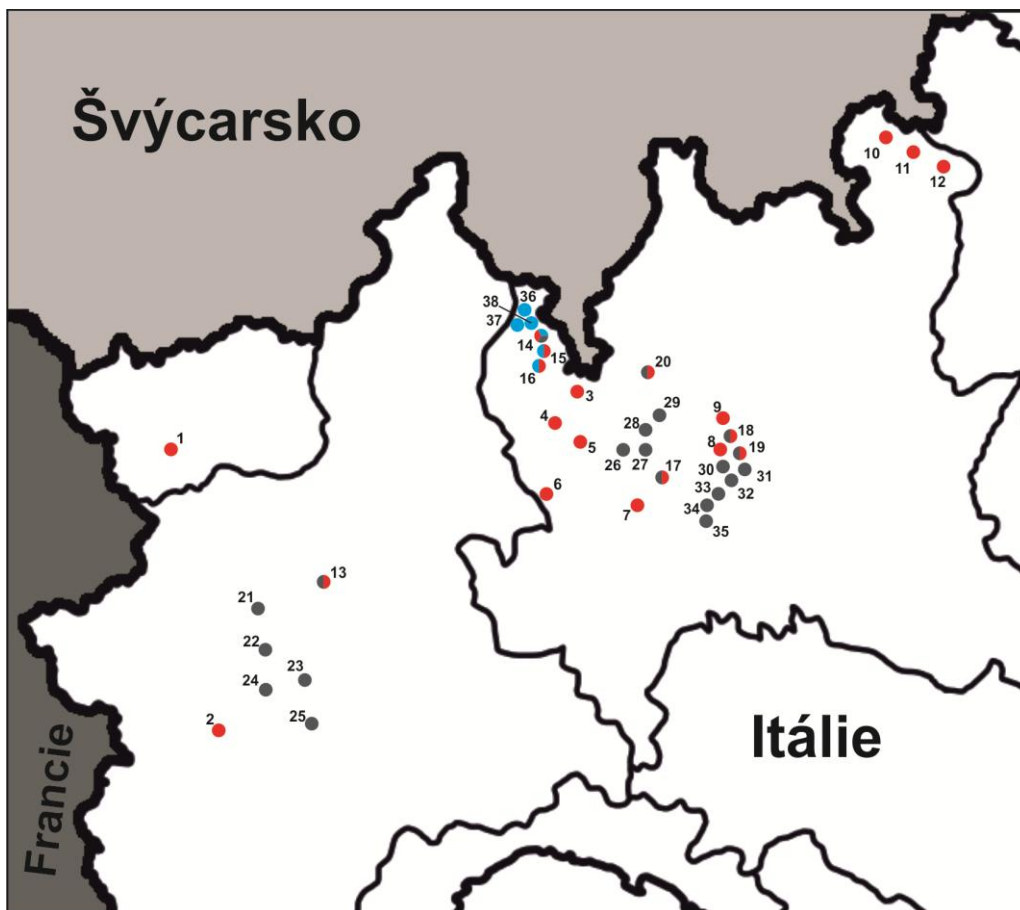


Tomahawk 201



Tomahawk 202

Obrázek 3. Mapa lokalit odběru vzorků ve sledované oblasti na severu Itálie. Červená barva označuje lokality, kde byly odebrány vzorky od *Sciurus vulgaris*, šedá barva označuje lokality odběru vzorků od *Sciurus carolinensis*. Modrá barva označuje lokality odběru *Callosciurus finlaysonii*. Každá lokalita má přiřazené své identifikační číslo (1-38), čísla přiřazená k jednotlivým lokalitám jsou zobrazeny v prvním sloupci v tabulkách 1 a 2.



4.1 Charakteristika lokalit

Tabulka 1. Seznam lokalit odchyty se souřadnicemi a druhy odchycených zvířat (část1.)

Číslo	Lokalita (zkratka)	Druh	Souřadnice	
			N	E
1.	Cogne (COGNE)	<i>S. vulgaris</i>	45°36'43.99"N	7°20'17.88"E
2.	Staffarda	<i>S. vulgaris</i>	44°42'50.09"N	7°25'10.02"E
3.	Castelnuovo bozzente (PIN-	<i>S. vulgaris</i>	45°45'27.70"N	8°56'46.57"E
4.	Tradate (PIN- RONCO)	<i>S. vulgaris</i>	45°42'43.50"N	8°55'52.44"E
5.	Lurago Marinone (PIN-	<i>S. vulgaris</i>	45°42'17.78"N	8°58'10.83"E
6.	Magenta (TI- FAG)	<i>S. vulgaris</i>	45°25'58.57"N	8°49'40.82"E
7.	TIC	<i>S. vulgaris</i>	45°28'20.31"N	9°5'13.321"E
8.	CALUSCO	<i>S. vulgaris</i>	45°40'50.16"N	9°27'37.33"E
9.	Adda-Cornate	<i>S. vulgaris</i>	45°39'08.46"N	9°28'59.98"E
10.	Valdidentro (FRA)	<i>S. vulgaris</i>	46°33'19.13"N	10°15'13.80"E
11.	Bormio (BOR)	<i>S. vulgaris</i>	46°26'35.14"N	10°25'20.22"E
12.	S. Antonio Valfurva (VAL)	<i>S. vulgaris</i>	46°25'57.04"N	10°26'57.21"E
13.	Sal - Passat	<i>S. vulgaris</i> + <i>S.</i> <i>carolinensis</i>	45°00'56.08"N	7°47'36.09"E
14.	BREZZO	<i>Callosciurus finlaysonii</i> + <i>S. vulgaris</i> + <i>S.</i> <i>carolinensis</i>	45°57'58.68"N	8°43'58.08"E
15.	C04-08	<i>Callosciurus finlaysonii</i> + <i>S. vulgaris</i>	45°56'46.32"N	8°45'02.52"E
16.	C04-09	<i>Callosciurus finlaysonii</i> + <i>S. vulgaris</i>	45°55'47.28"N	8°46'24.24"E
17.	LC_01	<i>S. vulgaris</i> + <i>S.</i> <i>carolinensis</i>	45°39'55.22"N	9°16'49.81"E
18.	Trezzo sull'Adda	<i>S. vulgaris</i> + <i>S.</i> <i>carolinensis</i>	45°37'6.24"N	9°29'56.85"E
19.	Vaprio d'Adda (ADDA-CB)	<i>S. vulgaris</i> + <i>S.</i> <i>carolinensis</i>	45°35'21.29"N	9°31'53.37"E

Tabulka 2. Seznam lokalit odchyty se souřadnicemi a druhy odchycených zvířat (část 2.)

Číslo	Lokalita (zkratka)	Druh	Souřadnice	
			N	E
20.	LS_03	<i>S. vulgaris</i> + <i>S. carolinensis</i>	45°49'21.79"N	9°15'33.93"E
21.	Stupinigi	<i>S. carolinensis</i>	44°58'58.22"N	7°34'39.95"E
22.	Piobesi Torinese (Piobesi)	<i>S. carolinensis</i>	44°55'53.63"N	7°36'39.98"E
23.	Caramagna Piemonte (BC)	<i>S. carolinensis</i>	44°47'38.25"N	7°42'46.93"E
24.	Racconigi (BERRONI)	<i>S. carolinensis</i>	44°47'23.48"N	7°39'00.30"E
25.	Cavallermaggiore (SANGIAC)	<i>S. carolinensis</i>	44°42'41.79"N	7°43'51.29"E
26.	LC_02	<i>S. carolinensis</i>	45°40'23.92"N	9°15'53.68"E
27.	LC_03	<i>S. carolinensis</i>	45°40'28.73"N	9°16'20.52"E
28.	C01-04	<i>S. carolinensis</i>	45°40'30.49"N	9°16'34.21"E
29.	C01-06	<i>S. carolinensis</i>	45°40'58.19"N	9°16'40.26"E
30.	Vaprio dep	<i>S. carolinensis</i>	45°33'43.35"N	9°31'24.99"E
31.	VAPRIO ACQUATI	<i>S. carolinensis</i>	45°34'28.64"N	9°31'43.06"E
32.	Vaprio d'Adda (ADDA 03)	<i>S. carolinensis</i>	45°34'25.14"N	9°31'46.75"E
33.	Vaprio d'Adda (ADDA 02)	<i>S. carolinensis</i>	45°33'52.16"N	9°31'34.92"E
34.	Vaprio d'Adda (ITALGEN)	<i>S. carolinensis</i>	45°33'43.35"N	9°31'24.99"E
35.	ADDA 05	<i>S. carolinensis</i>	45°33'52.16"N	9°31'34.92"E
36.	C04-05	<i>Callosciurus finlaysonii</i>	45°58'58.44"N	8°43'20.64"E
37.	C04-10	<i>Callosciurus finlaysonii</i>	45°58'17.40"N	8°43'05.52"E
38.	C04-07	<i>Callosciurus finlaysonii</i>	45°58'28.20"N	8°44'07.08"E

4.2 Metody

4.2.1 Barvení oocyst kryptosporidií podle Miláčka a Vítovce (1985)

Zásobní roztoky

1. Roztok methyl-violeti
 - 0,6 g methylvioleti
 - 1 ml anilinu
 - 1 g fenolu
 - 30 ml 96% alkoholu
 - 70 ml deionizované vody
2. Roztok tartrazinu
 - 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové
3. 2% kyselina sírová

Pracovní postup

- Špejlí rozetřít trus na podložní sklíčko.
- Sklo s nátěrem fixovat metanolem v plameni.
- Barvit roztokem methylvioleti po dobu 30 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 2 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Dobarvit v roztoku tartrazinu po dobu 4 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Nechat uschnout při laboratorní teplotě a prohlížet mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

4.2.2 Izolace DNA

Pracovní postup

- Vzorek trusu (200 mg) vložit do mikrozkuřavky (Safe-Lock-Tube), přidat skleněné kuličky o průměru 0,5 mm.
- Připipetovat 1,0 ml Lysis Buffer P a rozbít 1 minutu ve FastPrep-24 při rychlosti 5,5 m/s.
- Inkubovat v termobloku po dobu 10 minut při teplotě 95 °C.
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.

- Přenést veškerý supernatant do mikrozkušavek (Invi-Adsorb-Tube), homogenizovat a inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě.
- Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
- Supernatant napipetovat do čistých 1,5 µl mikrozkušavek a centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
- Do čistých mikrozkušavek napipetovat 25 µl Proteinase K a přidat 400 µl supernatantu, homogenizovat.
- Inkubovat v termobloku 10 minut při teplotě 70 °C.
- Připipetovat 400 µl Binding Buffer P, homogenizovat.
- Přepipetovat veškerý objem do Spin Filter + Tube (kolona se sběrnou mikrozkušavkou).
- Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě.
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, napipetovat na kolonu 500 µl Wash I, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, napipetovat na kolonu 800 µl Wash II, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek a znovu centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
- Kolonu vložit do 1,5 µl čisté mikrozkušavky, napipetovat 200 µl předehřátého Elution Buffer D na kolonu.
- Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minuty při 8 000 g.
- Skladovat v mrazicím boxu, při teplotě -20 °C.

4.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost specifické kryptosporidiové DNA ve vzorcích byla testována pomocí nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou ribosomální podjednotku (SSU) (Xiao et al. 1999; Jiang et al. 2005a). Sady použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 3. Úseky DNA byly amplifikovány v termocykleru (Bioer) za použití programu: počáteční denaturace 3 min při 94 °C, 35 cyklů zahrnujících denaturaci 45 s při 94 °C, nasedací teploty primerů 45 s při 55 °C, extenze 60 s při 72 °C, a finální extenze 10 min při 72 °C. Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity

2 μl primárního PCR produktu. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Cryptosporidium suis*. Reakční směsi jednotlivých PCR protokolů jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 3. Sety primerů pro amplifikaci genu kódujícího malou ribosomální podjednotku

SSU

Primární reakce

F1 TTCTAG AGCTAATACATGCG

R1 CCCATTCCTTCGAAACAGGA

Sekundární reakce

F2 GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG

R2 CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA

Tabulka 4. PCR protokol pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribosomální podjednotku

Primární reakce			Sekundární reakce		
H₂O	-----	12,30 μl	H₂O	-----	13,10 μl
MgCl₂	25 mM	1,20 μl	MgCl₂	25 mM	1,20 μl
10\times buffer	-----	2,00 μl	10\times buffer	-----	2,00 μl
dNTP	10 mM	0,40 μl	dNTP	10 mM	0,40 μl
Forvard primer	10 μM	0,40 μl	Forvard primer	10 μM	0,40 μl
Reverse primer	10 μM	0,40 μl	Reverse primer	10 μM	0,40 μl
BSA	10 mg/ ml	0,80 μl	-----	-----	-----
Taq	1 U/ μl	0,50 μl	Taq	1 U/ μl	0,50 μl
DNA	-----	2,00 μl	DNA	-----	2,00 μl
celkem		20,00 μl	celkem		20,00 μl

4.2.4 Gelová elektroforéza

Výsledné produkty ze sekundární PCR byly vizualizovány elektroforézou na 1% agarózovém gelu s přidavkem 5 μl ethidium-bromidu.

Chemikálie

- 50 \times TAE pufr (242 g tris báze, 47,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,00)
- agaróza
- ethidium bromid

- 100 bp ladder

Pracovní postup

- Smíchat agarózu s TAE pufrem.
- Nechat rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit na teplotu cca 50 °C pod tekoucí vodou.
- Přidat ethidium-bromid.
- Nalít gel do formy, vložit hřeben a nechat ztuhnout.
- Po ztuhnutí vyjmout hřeben a vložit gel do elektroforetické vany s 1 × TAE pufrem.
- Do jamek vzniklých po vyjmutí hřebenu nanést všechny produkt sekundární PCR.
- Spustit elektroforézu při napětí 70 V na dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA (cca 50 min.).
- Vizualizovat DNA fragmenty za pomoci UV transilumátoru.

4.2.5 Izolace gelu

- Vyříznout fragmenty DNA z gelu skalpelem a vložit do mikrozkušavky 1,5 ml.
- Poté vyizolovat DNA pomocí kitu QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) dle návodu uvedeného výrobcem.

4.2.6 Sekvenace

Sekundární produkty z PCR byly sekvenovány za použití sekundárních primerů. K sekvenaci byl použit ABI BigDye Terminator v 3. 1. Cycle Sequencing kit a sekvenátor ABI3130. Získané sekvence byly ručně upraveny pomocí programu ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) a porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GeneBank pomocí programu ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>).

4.2.7 Fylogenetická analýza

Fylogenetické vztahy jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií byly vypočteny Neighbor-Joining metodou (Saitou et Nei 1987) založenou na 2-parametrickém distančním modelu dle Kimury (Kimura 1980). Bootstrapový

konsenzus výsledného stromu byl získán na základě 1000 opakování. Pro konstrukci stromů byl použit program TREECON verze 1.3b.

4.2.8 Statistická analýza

Vliv druhu, věku a pohlaví hostitele byl statisticky vyjádřen za pomoci programu Epi Info (TM) 7.1.3.3 (Centers for Disease Controls and Prevention, USA). Z výsledných údajů byl použit rizikový faktor (OR) a pravděpodobnost (p).

Při statistických výpočtech je řešen vliv věku na výskyt kryptosporidií. Jedinci jsou rozděleni podle věku do dvou skupin a to na juvenilní (mladí) a adultní (dospělí).

5. Výsledky

Mezi lety 2010 – 2013 bylo odebráno 399 vzorků trusu od veverek odchycených na severu Itálie. Z celkového počtu 399 odebraných vzorků bylo 166 vzorků odebráno od druhu *Sciurus vulgaris*, 162 od *Sciurus carolinensis* a 71 od *Callosciurus finlaysonii*.

5.1 Mikroskopické vyšetření

Za pomoci mikroskopického vyšetření byli paraziti z rodu *Cryptosporidium* detekováni u 12 jedinců (3 %) z celkového počtu 399 vyšetřených. Z 12 mikroskopicky pozitivních vzorků pocházely 3 vzorky od *Sciurus carolinensis* a 9 vzorků od *Sciurus vulgaris*. Všechny vzorky *Callosciurus finlaysonii* byly při mikroskopickém vyšetření negativní.

5.2 Molekulární analýzy

Metodou nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU) byla detekována přítomnost specifické DNA kryptosporidií u 18 (4,5 %) vzorků veverek.

U dvou zvířat, která byla molekulárními metodami pozitivní na přítomnost specifické DNA kryptosporidií nebyly zjištěny informace o věku a pohlaví jedinců. Z těchto důvodů je s těmito vzorky počítáno pouze u celkového porovnání náchylnosti k infekci kryptosporidiózy. Další statistické výpočty jsou provedeny bez těchto dvou vzorků, tedy je počítáno s celkovým počtem 397 vyšetřených vzorků místo 399.

5.2.1 Vliv druhu hostitele na výskyt kryptosporidií u sledovaných zvířat

Z celkového počtu 166 vyšetřených vzorků od *Sciurus vulgaris* bylo 12 pozitivních a ze 162 vyšetřených vzorků od *Sciurus carolinensis* bylo 6 pozitivních. Z toho vyplývá, že zástupci druhu *S. vulgaris* byli 2,03× častěji infikováni kryptosporidiemi než zástupci druhu *S. carolinensis*, s pravděpodobností ($p = 0,12$). Všech 71 vzorků od *Callosciurus finlaysonii* bylo na kryptosporidie negativních.

5.2.2 Vliv pohlaví na výskyt kryptosporidií u sledovaných zvířat

Statistická analýza neprokázala vliv pohlaví na výskyt kryptosporidií u sledovaných zvířat ($p = 0,59$). Z celkového počtu 200 a 197 vyšetřených samic, respektive samců bylo 8, respektive 8 pozitivních. Všech 71 vzorků od *Callosciurus finlaysonii* bylo na kryptosporidie negativních.

Z celkového počtu 76 vyšetřených samců *S. carolinensis* byly 4 pozitivní na kryptosporidie (5,3 %). Z 82 vzorků získaných od samců *S. vulgaris* byly stejně jako u *S. carolinensis* pozitivní 4 vzorky (4,9 %). Statistická analýza neprokázala významný rozdíl v promořenosti samců různých druhů veverek ($p = 0,60$).

Od samic *S. vulgaris* bylo celkem vyšetřeno 83 vzorků, z nichž bylo 7 pozitivních na kryptosporidie. Od samic *S. carolinensis* bylo vyšetřeno 85 vzorků a z nich byl pouze jeden pozitivní na kryptosporidie. Z těchto výsledků je tedy patrné, že samice *S. vulgaris* jsou 7,74× častěji infikovány kryptosporidii než samice *S. carolinensis*, s pravděpodobností $p = 0,03$.

Ani v rámci druhu *S. carolinensis*, ani *S. vulgaris* nebyl prokázán rozdíl v prevalenci kryptosporidiových infekcí mezi samci a samicemi ($p = 0,15$ a $p = 0,27$, respektive; tabulka 5.).

5.2.3 Vliv věku na výskyt kryptosporidií u sledovaných zvířat

Z celkového počtu 397 vzorků, bylo pouze 38 jedinců juvenilních a 359 jedinců adultních. U juvenilních jedinců bylo zjištěno 6 pozitivních zvířat (15,8 %) na kryptosporidie, zatímco z 397 adultních jedinců bylo celkem 10 pozitivních (2,5 %). Z těchto údajů vyplývá, že juvenilní jedinci jsou 6,54× častěji infikováni kryptosporidii než adultní jedinci, s pravděpodobností ($p = 0,002$). Všech 71 vzorků od *Callosciurus finlaysonii* bylo na kryptosporidie negativních.

Zatímco z celkového počtu 19 juvenilních jedinců *S. vulgaris* bylo 5 pozitivních na kryptosporidie (26,3 %), juvenilní jedinci druhu *S. carolinensis* byly 6,43× méně častěji infikováni kryptosporidii (5,3 %; 1/19). Vzhledem k nízkému počtu sledování nebyl rozdíl mezi druhy statisticky významný ($p = 0,09$).

Od adultních jedinců *S. vulgaris* bylo celkem vyšetřeno 146 vzorků, z toho 6 vzorků bylo pozitivních na kryptosporidie (4,1 %). Od adultních jedinců *S. carolinensis* bylo vyšetřeno celkem 142 vzorků a z nich 4 byly pozitivní (2,8 %).

Statistická analýza neprokázala statisticky významný rozdíl v promoženosti adultních populací veverek rodu *Sciurus* ($p = 0,39$).

Zatímco statistická analýza neprokázala rozdíl v prevalenci kryptosporidií mezi juvenilními (1/19) a adultními (4/142) jedinci *S. carolinensis* ($p = 0,47$), juvenilní jedinci (5/19) *S. vulgaris* byly 8,21× častěji infikováni než adultní jedinci (6/146; $p = 0,004$)

Tabulka 5. Počet na kryptosporidie pozitivních a negativních jedinců adultních a juvenilních samců a samic jednotlivých druhů veverek

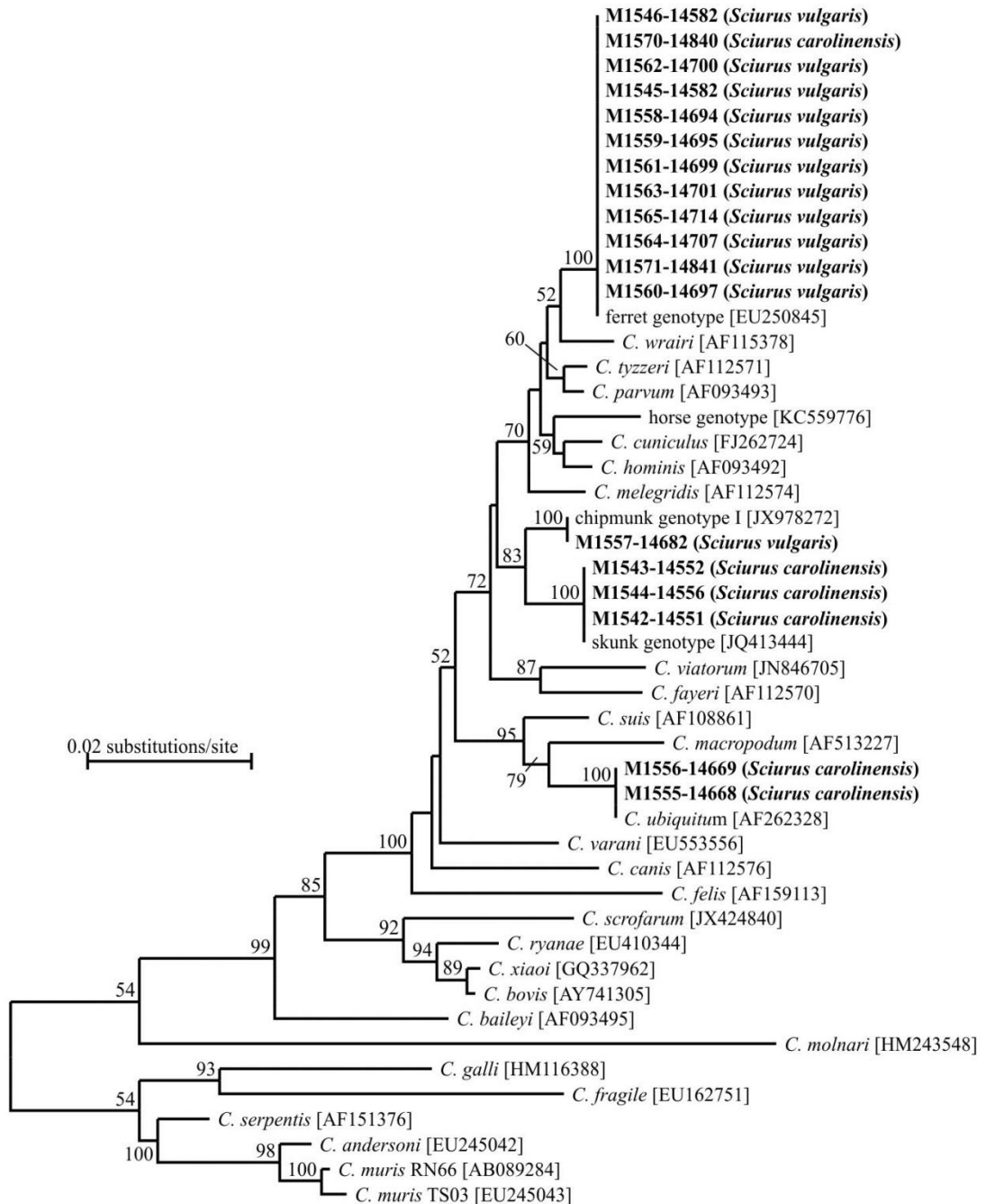
Druh	n	Pozitivní				Negativní			
		samci		samice		samci		samice	
		juv	ad	juv	ad	juv	ad	juv	ad
<i>S. vulgaris</i>	165	2	2	3	4	6	72	8	68
<i>S. carolinensis</i>	161	0	4	1	0	6	66	12	72
<i>C. finlaysonii</i>	71	0	0	0	0	0	39	0	32
Celkem	397	2	6	4	4	12	177	20	172

Juv – juvenilní; ad - adultní jedinci

5.3 Genotypizace

Sekvenační analýzou PCR pozitivních vzorků byl prokázán ve 12 případech výskyt *Cryptosporidium ferret* genotype, který se shodoval s genotypem *Cryptosporidium ferret* genotype uloženým v GenBank [EU250845], ve 3 případech se získané sekvence shodovaly s genotypem *Cryptosporidium skunk* genotype [JQ413444], ve 2 případech s druhem *Cryptosporidium ubiquitum* [AF262328] a u 1 vzorku byla získaná sekvence identická s genotypem *Cryptosporidium chipmunk* genotype I [JX978272] (obrázek 4). Počet infikovaných jedinců u jednotlivých druhů veverek je znázorněn v tabulce 6. Prevalence těchto detekovaných druhů je znázorněna v grafu 1.

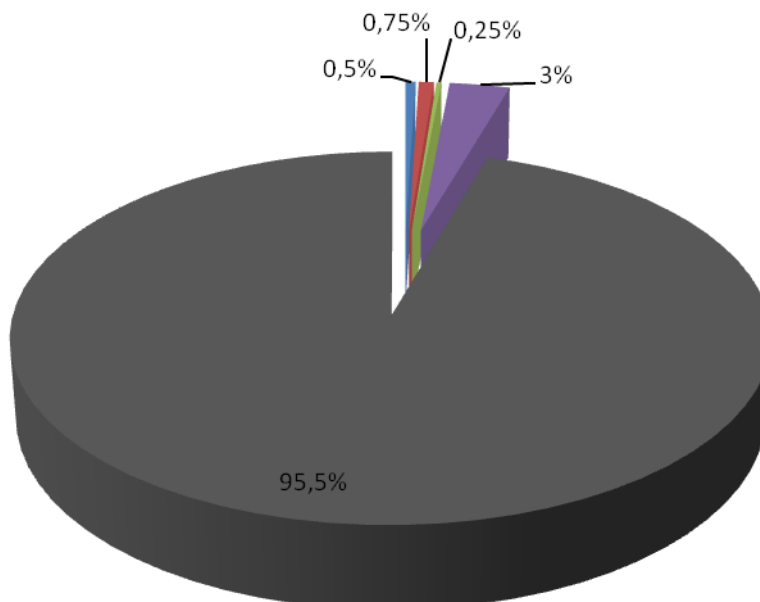
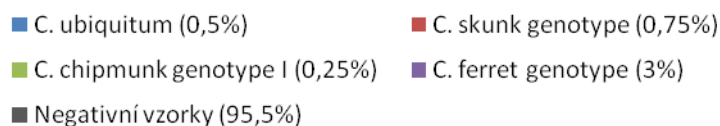
Obrázek 4. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií použitých v této studii (tučně zvýrazněno) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku vytvořený metodou neighbor-joining v programu Treecon; 1000× bootstrap; znázorněny hodnoty podpory větví více než 50 %.



Tabulka 6. Počet infikovaných jedinců u jednotlivých druhů veverek, plus procentuelní vyjádření

Parazit	Počet vyšetřených/pozitivních jedinců (%)		
	<i>S. vulgaris</i>	<i>S. caroline nsis</i>	<i>C. finlaysonii</i>
<i>C. ubiquitous</i>	166/0 (0,0)	162/2 (1,2)	71/0 (0,0)
<i>Cryptosporidium skunk genotype</i>	166/0 (0,0)	162/3 (1,9)	71/0 (0,0)
<i>Cryptosporidium chipmunk genotype</i>	166/1 (0,6)	162/0 (0,0)	71/0 (0,0)
<i>Cryptosporidium ferret genotype</i>	166/11 (6,6)	162/1 (0,6)	71/0 (0,0)

Graf 1. Prevalence jednotlivých druhů kryptosporidií detekovaných ve vzorcích trusu veverek



6. Diskuze

Problematice epidemiologie zástupců čeledi Sciuridae není věnována příliš velká pozornost. O infekčnosti a hostitelské specifitě kryptosporidií u těchto zvířat se toho zatím mnoho neví.

U veverek čeledi Sciuridae bylo zjištěno již vícero druhů a genotypů kryptosporidií v různých částech světa. Výskyt kryptosporidií u čeledi Sciuridae byl popsán například v USA (Sundberg et al. 1982; Atwill et al. 2001; Zielgler et al. 2007), v Itálii (Kváč et al. 2008; Bertolino et al. 2003) a v Asii (Hůrková et al. 2003; Chaochao et al. 2009).

Celková prevalence kryptosporidií u veverek čeledi Sciuridae zjištěná v této práci činila 4,5 %. Tato prevalence je poměrně nízká oproti prevalenci zjištěné v Itálii u veverek stejné čeledi, konkrétně druhu *Sciurus vulgaris*, kde byla zjištěna celková prevalence kryptosporidií 24,3 % (Kváč et al. 2008). V Číně pak byla u veverek zjištěna podobně vysoká prevalence 28,2 % (Chaochao et al. 2009). O něco nižší prevalence (12 %) byla zaznamenána u veverek druhu (*Spermophilus beecheyi*) v USA (Atwill et al. 2004). Poměrně vysoká prevalence kryptosporidií byla zaznamenána v New Yorku u hlodavců čeledi Sciuridae a to 37,5 % (Feng et al. 2007). Obecně lze tedy říct, že se prevalence u veverek čeledi Sciuridae pohybuje v rozmezí od 4,5 do 37,5 %.

V této práci bylo nejvíce jedinců infikováno *Cryptosporidium ferret* genotype. Celkem byl tento parazit detekován u 11 jedinců *Sciurus vulgaris* a u jednoho jedince *Sciurus carolinensis* z celkového počtu 399 vzorků, což znamená prevalenci výskytu *Cryptosporidium ferret* genotype 3 %. Mnohem vyšší prevalence byla zaznamenána u *Sciurus vulgaris* odchycených na severu Itálie, kde z vyšetřených veverek bylo 15 (21,15 %) pozitivních na *Cryptosporidium ferret* genotype (Kváč et al. 2008).

Oproti *Cryptosporidium ferret* genotype byla prevalence *Cryptosporidium chipmunk* genotype I zanedbatelná, tento genotyp byl v této práci detekován u jednoho jedince *Sciurus vulgaris* s prevalencí 0,25 %. Podobně nízká prevalence byla zjištěna též u *Sciurus carolinensis* (0,18 %) a u *Tamias striatus* (0,18 %) v New Yorku (Feng et al. 2007). Kváč et al. (2008) informovali o výskytu tohoto genotypu u dvou jedinců *Sciurus vulgaris* v Itálii.

Nízká prevalence *Cryptosporidium* skunk genotype (0,75 %) zjištěná v této práci odpovídá 0,18% prevalence zjištěná u *Sciurus carolinensis* v New Yorku (Feng et al. 2007). *Cryptosporidium* skunk genotype byl detekován také u jednoho lidského pacienta v Británii, je tedy pravděpodobné, že tento genotyp může být infekční také pro lidi.

U dvou jedinců veverek šedých (*Sciurus carolinensis*) byl zjištěn výskyt *Cryptosporidium ubiquitum* dříve známý jako cervine genotype. Prevalence výskytu tohoto parazita činila 0,5 %. Vyšší prevalence *C. ubiquitum* byla uvedena například ve Skotsku a činila 12,5 % (Nichols et al. 2010).

V závislosti na druhu hostitele bylo 12 pozitivních jedinců od *Sciurus vulgaris* a 6 od *Sciurus carolinensis*, z čehož vyplývá, že zástupci druhu *S. vulgaris* jsou 2,03× častěji infikováni než zástupci druhu *S. carolinensis*. Tento údaj nelze posoudit s jinými studiemi, protože se jiné studie vyšetřením a porovnáním obou těchto druhů navzájem doposud nezabývaly.

V této práci nebyl prokázán vliv pohlaví na výskyt kryptosporidií u sledovaných zvířat. Promořenost samců a samic byla téměř totožná. Obdobných výsledků bylo dosaženo v Itálii, kde prevalence parazitů u veverek byla zjištěna u samic 14,3 % a samců 10 % (Kváč et al. 2008). Odlišná prevalence kryptosporidií u samců a samic byla zjištěna například u veverek v USA, kde prevalence u samic činila 13 % a u samců 20 % (Atwill et al. 2001).

Statistickými výpočty byla v této práci zjištěna prevalence kryptosporidií u juvenilních jedinců 15,8 % a u adultních 2,5 %, z čehož vyplývá, že juvenilní jedinci jsou 6,54× častěji infikováni kryptosporidii než adultní jedinci. Je všeobecně známo, že mladší jedinci mají nedostatečnou imunitu a je tedy pravděpodobné, že budou také častěji infikováni. Což výsledky v této práci potvrzují. Opačný výsledek však byl zjištěn například v Itálii, kde zjištěná prevalence 13,3 % u juvenilních jedinců, byla nižší než prevalence u adultních (27,3 %) (Kváč et al. 2008).

Výsledky této práce ukázaly, že veverky čeledi Sciuridae jsou velice vnímavé k infekci *Cryptosporidium ferret* genotype, 61 % pozitivních jedinců bylo infikováno tímto genotypem kryptosporidií.

7. Závěry

- U veverek čeledi Sciuridae byla zjištěna prevalence kryptosporidií 4,5 %.
- Nízká celková prevalence naznačuje možnou odolnost těchto hostitelů vůči infekci kryptosporidiemi.
- Mikroskopickým vyšetřením byl prokázán výskyt oocyst kryptosporidií u 12 jedinců veverek čeledi Sciuridae.
- Molekulárním vyšetřením byl prokázán výskyt DNA kryptosporidií u 18 jedinců.
- Za pomoci sekvenční analýzy byl detekován celkem jeden druh kryptosporidie (*Cryptosporidium ubiquitum*) a 3 genotypy (*Cryptosporidium chipmunk* genotype, *Cryptosporidium ferret* genotype a *Cryptosporidium skunk* genotype).
- Juvenilní jedinci druhů *S. vulgaris* a *S. carolinensis* jsou častěji infikováni kryptosporidiemi než adultní.
- V rámci jednoho druhu nebyl zaznamenán vliv věku na výskyt kryptosporidií.
- Nebyl pozorován vliv pohlaví na výskyt kryptosporidií.

8. Seznam literatury

- Abubakar, I., Aliyu, S., H., Arumugam, C., Usman, N., K., Hunter, P., R., 2007.** Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. *Brit. J. Clin.Pharm.* 63, 387–393
- Angus, K., W., 1990.** Cryptosporidiosis in ruminants. In: Dubey, J., P., Speer, C., A., Fayer, R. (Eds.), *Cryptosporidiosis in Man and Animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 83–103
- Anofel Network, 2010.** Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006–2009. *Euro Surveillance* 15, 19642
- Atwill, E., R., Camaro, S., M., Phillips, R., Alonso, L., H., Tate, K., W., Jensen, W., A., Bennet, J., Little, S., Salmon, T., P., 2001.** Quantitative Shedding of Two Genotypes of *Cryptosporidium parvum* in California Ground Squirrels (*Spermophilus beecheyi*). *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2840–2843
- Atwill, E., R., Phillips, R., Pereira, M., D., Li, X., Mccowan B., 2004.** Seasonal shedding of multiple *Cryptosporidium* genotypes in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6748–6752
- Atwill, E., R., Phillips, R., Rulofson, F., 2002.** Environmental loading rates of the waterborne pathogenic protozoa *Cryptosporidium parvum* in certain domestic and wildlife species in California, p. 241–243. In R. M. Timm and R. H. Schmidt (ed.), *Proceedings of the 20th Vertebrate Pest Conference*, Reno, Nevada
- Bajer, A., Caccio, S., Bednarska, M., Behnke, J., M., Pieniazek, N., J., Sinski, E., 2003.** Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *J. Parasitol.* 89, 1053–1055
- Bertolino, S., Wauters, L., A., De Bruyn, L., Canestri-Trotti, G., 2003.** Prevalence of coccidia parasites (Protozoa) in red squirrels (*Sciurus vulgaris*): effects of host phenotype and environmental factors. *Oecologia* 137, 286–295
- Blackburn, B., G., Mazurek, J., M., Hlavsa, M., Park, J., Tillapaw, M., Parrish, M., Salehi, E., Franks, W., Koch, E., Smith, F., Xiao, L., Arrowood, M., Hill, V., da Silva, A., Johnston, S., Jones, J., L., 2006.** Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 684–686

- Carreno, R., A., Martin, D., S., Barta, J., R., 1999.** *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analyses of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85, 899–904
- Current, W., L., 1989.** *Cryptosporidium* spp. In: Walzer PD, Genta RM (eds) *Parasitic infections in the compromised host*. Dekker, New York, pp 281–341
- Da Silva, A., J., Caccio`, S., Williams, C., Won, K., Y., Nace, E., K., Whittier, C., Pieniazek, N., J., Eberhard, M., L., 2003.** Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. *Vet. Parasitol.* 111, 297–307
- Dupont, H., L., Chappell, C., L., Sterling, C., R., Okhuysen, P., C., Rose, J., B., Jakubowski, W., 1995.** The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 332, 855–859
- Fayer, R. 2004.** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126, 37–56
- Fayer, R. 2008.** The General Biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer, R., Xiao, L., editors. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 1–42
- Fayer, R., Morgan, U., M., Upton, S., J., 2000.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30, 1305–1322
- Fayer, R., Nerad, T. 1996.** Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 62, 1431–1433
- Fayer, R., Speer, C., A., Dubey J., P., 1997.** The general biology of *Cryptosporidium*. In: R. Fayer (Ed.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC press, Boca. Raton., 1–42
- Fayer, R, Trout, J., M., Jenkins, M., C., 1998.** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J Parasitol.* 84, 1165–1169
- Fayer, R., Ungar, B., L., P., 1986.** *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50, 458–483
- Fayer, R., Xiao, L., (2008).** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2. vyd. London: IWA Pub., 560 s. ISBN 14-200-5226-8

- Feltus, D., C., Giddings, C., W., Schneck, B., L., Monson, T., Warshauer, D., McEvoy, J., M., 2006.** Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4303–4308
- Feng, Y., 2008.** *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp. Parasitol.* 124, 128–137
- Feng, Y., Lal, A., A., Li, N., Xiao, L., 2011.** Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.* 127, 238–242
- Feng, Y., Aldersio, K., A., Yang, W., Blancero, L., A., Kuhne, W., G., Nadeski, C., A., Reid, M., Xiao, L. 2007.** *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6475–6483
- Griffiths, J., K., Balakrishnan, R., Widmer, G., Tzipori, S. 1998** Paromomycin and genecitin inhibit intracellular *C. parvum* without trafficking through the host cell cytoplasm: implications for drug delivery. *Infect. Immun.*, 66, 3874–3883
- Guitard, J., Menotti, J., Desveaux, A., Alimardani, P., Porcher, R., Derouin, F., Kapel, N., 2006.** Experimental study of the effects of probiotics on *C. parvum* infection in neonatal rats. *Parasitol. Res.* 99, 522–527
- Hijjawi, N., S., Meloni, B., P., Ng'anzo, M., Ryan, U., M., Olson, M., E., Cox, P., T., Monis, P., T., Thompson, R., C., A. (2004).** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int. J. Parasitol.* 34, 769–777
- Hijjawi, N., S., Meloni, B., P., Ryan, U., M., Olson, M., E., Thompson, R., C., A., 2002.** Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* 32, 1719–1726
- Hůrková, L., Hajdušek, O., Modrý, D., 2003.** Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian Chipmunks. *Wildl. Dis.* 39, 441–444
- Iseki, M., 1986.** Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Parasitol.*, 35, 521–526
- Jiang, J., Alderisio, K., A., Singh, A., Xiao, L., 2005a.** Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Appl. Environ. Microbiology.* 71, 1135–1141

- Jiang, J., Alderisio, K., A., Xiao, L., 2005b.** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from free watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4446–4454
- Jokipii, L., Jokipii, A., M. 1986.** Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *J. Med.* 315, 1643–1647
- Kimura, M., 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120
- Kváč, M., Hofmannová, L., Bertolino, S., Wauters, L., Tosi, G., Modrý, D., 2008.** Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitol.* 55, 95–99
- Kváč, M., Kestránová M., Pinková M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B. (2013a).** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet. Parasitol.* 31, 218–227
- Lebbad, M., Besser, J., Insulander, M., Karlsson, L., Mattsson, J., G., Svenungsson, B., Axén, Ch., 2013.** Unusual cryptosporidiosis cases in Swedish patients: extended molecular characterization of *Cryptosporidium viatorum* and *Cryptosporidium chipmunk* genotype I. *Parasitol.* 140, 1735–1740
- Leoni, F., Amar, C., Nichols, G., Pedraza-Diaz, S., McLauchlin, J., 2006.** Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.* 55, 703–707
- Levine, N., D., 1985.** Phylum II. Apicomplexa Levine, 1970. In: Lee, J.J., Hunter, S.H., Bovee, E.C. (Eds.), *An illustrated guide to the Protozoa*. Allen Press, Lawrence, KS, pp. 322–374
- Liu, Ch., Wang, L., Lancto, Ch., A., Abrahamsen, M., S. 2009.** Characterization of a *Cryptosporidium parvum* protein that binds single-stranded G-strand telomeric DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 165, 132–141
- Lv, Ch., Zhang, L., Wang, R., Jian, F., Zhang, S., Ning, Ch., Wang, H., Feng, Ch., Wang, X., Ren, X., Qi, M., Xiao, L., 2009.** *Cryptosporidium* spp. in Wild, Laboratory, and Pet Rodents in China: Prevalence and Molecular Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7692–7699

- MacKenzie, W., R., Hoxie, N., J., Proctor, M., E., Gradus, M., S., Blair, K., A., Peterson, D., E., Kazmierczak, J., J., Addiss, D., A., Fox, K., R., Rose, J., R., Davis, J., P., 1994.** A massive outbreak of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331, 161–167
- Maggi, P., Larocca, A., M., V., Quarto, M., Serio, G., Brandonisio, O., Angarano, G., Pastore, G., 2000.** Effect of Antiretroviral Therapy on Cryptosporidiosis and Microsporidiosis in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 213–217
- Matsui, T., Fujino T., Kajima, J., Tsuji, M., 2000.** Infectivity to experimental rodents of *Cryptosporidium parvum* oocysts from Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus*) originated in the People’s Republic of China. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 487–489
- Meisel, J., L., Perera, D., R., Meligro, C., Rubin, C., E., 1976.** Overwhelming watery diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70, 1156–1160
- Morgan, U., M., Sturdee, A., P., Singleton, G., Gomez, M., S., Gracenea, M., Torres, J., Hamilton, S., G., Woodside, D., P., Thompson, R., C., 1999.** The *Cryptosporidium* “mouse” genotype is conserved across geographic areas. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1302–1305
- Nichols, G., L., Chalmers, R., M., Sopwith, W., Regan, M., Hunter, C., A., Grenfell, P., Harrison, F., Lane, C., 2006.** Cryptosporidiosis: a report on the surveillance and epidemiology of *Cryptosporidium* infection in England and Wales. Drinking Water Directorate Contract Number DWI 70/2/201. Drinking Water Inspectorate, UK, pp. 142
- Nichols, R., A., B., Connelly, L., Sullivan, C., B., Smith, H., V., 2010.** Identification of *Cryptosporidium* Species and Genotypes in Scottish Raw and Drinking Waters during a One-Year Monitoring Period. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5977–5986
- 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, 592–598

- O'Donoghue, P., 1995.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. Int. J. Parasitol. 25, 139–195
- Okhuysen, P., C., Chappell, C., L., Crabb, J., H., Sterling, C., R., DuPont, H., L., 1999.** Virulence of free distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. J. Infect. Dis. 180, 1275–1281
- Ong, C., S., Eisler, D., L., Alikhani, A., Fung, V., W., Tomblin, J., Bowie, W., R., Isaac-Renton, J., L., 2002.** Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. Emerg. Infect. Dis. 8, 263–268
- Pereira, M., G., C., Li, X., McCowan, B., Phillips, R., L., Atwill, E., R., 2010.** Multiple Unique *Cryptosporidium* Isolates from Three Species of Ground Squirrels (*Spermophilus beecheyi*, *S. beldingi*, and *S. lateralis*) in California. Appl. Environ. Microbiol. 76, 8269–8276
- Perz, J., F., Le Blanq, S., M., 2001.** *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from Loir New York State. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1154–1162
- Plutzer, J., Karanis, P., 2009.** Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. Vet. Parasitol. 165, 187–199
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A., A., Pavlasek, I., 2003.** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4302–4307
- Ryan, U., Read C., Hawkins, P., Warnecke, M., Swanson, P., Griffith, M., Deere D., Cunningham, M., Cox, P. 2005.** Genotypes of *Cryptosporidium* from Sydney water catchment areas. J. Appl. Microbiol. 98, 1221–1229
- Saitou, N., Nei, M., 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425
- Santin, M., Dixon, B., R., Fayer, R., 2005.** Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from ringed seals (*Phoca hispida*) in northern Quebec, Canada. J. Parasitol. 91, 712–716
- Slavin, D., 1955.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). J. Comp. Pathol. 65, 262
- Smith, H., V., Rose, J., B., 1998.** Waterborne cryptosporidiosis: current status. Parasitol. Today 14, 14–22

- Smith, N., H., Cron, S., Valdez, L., M., Chappell, C., L. White, A., C., Jr., 1998.** Combination drug therapy for cryptosporidiosis in AIDS. *J. Infect. Dis.*, 178, 900-903
- Soba, B., Petrovec, M., Mioc, V., Logar, J., 2006.** Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 918–921
- Sundberg, J., Hill, D., Ryan, M., 1982.** Cryptosporidiosis in a gray squirrel. *JAVMA* 181, 1420–1422
- Trotz-Williams, L., A., Martin, D., S., Gatei, W., Cama, V., Peregrine, A., S., Martin, S., W., Nydam, D., V., Jamieson, F., Xiao, L., 2006.** Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitol. Res.* 99, 346–352
- Tyzzar, E., E., 1907.** A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 5, 12–13
- Tyzzar, E., 1912.** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protis.* 26, 394–412
- Tyzzar, E., E., 1929.** Coccidiosis in gallinaceous bird. *Am. J. Hyg.* 10, 269-271
- Tzipori, S., Griffiths, J., K., 1998.** Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* 40, 5–36
- Tzipori, S., Ward, H., 2002.** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microb. Inf.* 4, 1047–1058
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A., A., Montali, R., J., Fayer, R., Lal, A., A., 1999.** Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1578–1583
- Xiao, L., Fayer, R., 2008.** Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* 38, 1239–1255
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S., J., 2004.** *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Adv. *Imp. Pub. Heal.* 17, 72–97
- Xiao, L., Feng, Y., 2008.** Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Im. Med. Microbiol.* 52, 309–323

Xiao, L., Morgan, U., M., Fayer, R., Thompson, R., C., A., Lal, A., A., 2000.
Cryptosporidium systematics and implications for public health. *Parasitol.*
Today 16, 287–292