

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Diverzita kryptosporidií volně žijících
hlodavců rodu *Rattus***

Diplomová práce

Bc. Jana Ježková

Školitel: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

České Budějovice, 2017

Ježková J., (2017): Diverzita kryptosporidií volně žijících hlodavců rodu *Rattus* [Diversity of *Cryptosporidium* of wild-living rodents of genus *Rattus*, Mgr. Thesis, in Czech] – 60 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This study was focused on diversity of *Cryptosporidium* infecting wild-living rodents of genus *Rattus*. Presence of *Cryptosporidium* oocyst and specific DNA in faecal samples was screened by microscopy examination and molecular tools. Phylogenetic analyses were based on the small subunit of the rRNA and actin genes. Course of infection, infection intensity, oocyst morphology and localization of live cycle of selected *Cryptosporidium* spp. was described based on experimental infection, histological and electron microscopic examinations.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, 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 toutéž 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.

V Českých Budějovicích dne 7. dubna 2017

.....
Bc. Jana Ježková

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat zejména svému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za jeho trpělivost, odborné vedení, ochotu a cenné rady. Dále všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v. v. i. za jejich cenné rady a ochotu. Poděkování patří i mé rodině a přátelům za podporu při studiu a při psaní této práce.

Práce je součástí programu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem, GAČR 15-01090S (řešitel doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.) a GAJU 072/2017/Z (řešitel Ing. Michaela Horčíčková).

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1	Obecné rozdělení zástupců rodu <i>Cryptosporidium</i>	8
2.2	Historie	8
2.3	Vývojový cyklus	9
2.4	Hostitelská specifita.....	11
2.5	Klinické příznaky kryptosporidiových infekcí	12
2.6	Kryptosporidiové infekce hlodavců.....	12
2.7	Hlodavci rodu <i>Rattus</i>	13
2.7.1	Fylogeografie hlodavců rodu <i>Rattus</i>	14
2.7.2	Nemoci přenášené hlodavci rodu <i>Rattus</i>	15
2.7.3	Biologie rodu <i>Rattus</i>	16
2.8	Kryptosporidie a kryptosporidióza hlodavců rodu <i>Rattus</i>	17
3	CÍLE PRÁCE.....	21
4	MATERIÁL A METODIKA.....	22
4.1	Materiál.....	22
4.1.1	Zdroj biologického materiálu	22
4.1.2	Získání paraziti	22
4.1.3	Experimentální zvířata.....	22
4.2	Metody.....	22
4.2.1	Zpracování vzorku.....	22
4.2.2	Purifikace oocyst	22
4.2.3	Specifické barvení oocyst kryptosporidií	24
4.2.4	Hodnocení intenzity infekce.....	25
4.2.5	Izolace DNA	25
4.2.6	Genotypizace	26
4.2.7	Gelová elektroforéza.....	27
4.2.8	Izolace z gelu	28
4.2.9	Sekvenování a fylogenetické analýzy.....	29
4.2.10	Design experimentálních prací	29
4.2.11	Odběr vzorků orgánů a tkání	29

4.2.12	Příprava histologických preparátů	30
4.2.13	Barvení hematoxylin-eosinem	30
4.2.14	Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM).....	30
5	VÝSLEDKY	32
5.1	Prevalence kryptosporidií u hlodavců rodu <i>Rattus</i>	32
5.2	Biologické vlastnosti <i>Cryptosporidium</i> rat genotype I a IV	36
5.2.1	Morfometrie oocyst	36
5.3.1	Hostitelská specifita.....	37
5.3.2	Průběh infekce	37
5.3.3	Klinické příznaky a patogenita	38
6	DISKUSE.....	40
7	ZÁVĚRY	45
8	LITERATURA	46

1 ÚVOD

Zástupci rodu *Cryptosporidium* parazitují v tělech poikilotermních i homoiotermních obratlovců včetně člověka. Jedná se o jednohostitelské, jednobuněčné a epicelulární parazity (O'Donoghue 1995; Ziegler a kol. 2007). Kryptosporidie patří do kmene Apicomplexa. Dříve byly řazeny mezi kokcidie z důvodu jejich vývojového cyklu (Fayer a kol. 1997; Tyzzer 1910). Na základě molekulárních analýz byla zjištěna bližší příbuznost s gregarinami než s kokciemi (Carreno a kol. 1999). V současné době jsou kryptosporidie řazeny do třídy Gregarinomorpha, která zahrnuje skupiny Orthogregarinia, Cryptosporidiidae a Rhytidocystidae. Kryptosporidiím je nejpodobnější skupina Orthogregarinia, která zahrnuje řády Vermigregarida a Arthogregarida (Cavalier-Smith 2014). Mezi společné znaky gregarin a kryptosporidií patří morfologická stavba organel, které slouží k přichycení k hostitelské buňce (Valigurová a kol. 2007).

Vzhledem k tomu, že dle morfologie oocyst nelze přesně určit o jaký druh se jedná, k rozlišení jednotlivých druhů kryptosporidií se využívá molekulárních metod. Pro genotypizaci jsou používány rodově specifické primery amplifikující různé geny, nejčastěji gen kódující malou ribozomální podjednotku rRNA (Sulaiman a kol. 1999).

Tato práce se zabývá biologií a diverzitou kryptosporidií hlodavců rodu *Rattus*. U potkanů byly dosud detekovány jak známé druhy často spojované s lidskými infekcemi, tak i nové, hostitelsky specifické genotypy kryptosporidií (Paparini a kol. 2012; Silva a kol. 2013; Zhao a kol. 2015). Cílem této práce je popsat diverzitu a biologii kryptosporidií hostitelsky specifických genotypů za pomoci mikroskopických, histologických, molekulárních metod a experimentálních infekcí.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Obecné rozdělení zástupců rodu *Cryptosporidium*

Kryptosporidie jsou velmi odolní paraziti, kteří jsou kosmopolitně rozšířeni. Parazitují zejména v gastrointestinálním traktu svých hostitelů, ale byla popsána i další místa výskytu jako plíce, Fabriciova bursa, vzdušné vaky, ledviny, játra, slinivka, žlučník nebo žlučovod (Current a kol. 1986; Goodstein a kol. 1989; Holubová a kol. 2016; Xiao a kol. 2002). U imunodeficitních pacientů, zejména s rozvinutým syndromem AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) může dojít k rozšíření infekce téměř do všech tkání hostitele (Kváč, osobní sdělení; Macher 1988; Reina a kol. 2016; Weselowska a kol. 2016). Kryptosporidie se dělí do dvou monofyletických a morfologicky odlišitelných linií. Jedná se o žaludeční, infikující epitelální buňky žláznatého žaludku a střevní, které infikují tenké a tlusté střevo (Xiao a kol. 2002).

Oocysty střevních kryptosporidií jsou menší a kulaté, zatímco žaludeční kryptosporidie jsou větší a oválné (Fayer a kol. 2000; Kváč a kol. 2013a; Lindsay a kol. 2000; Robinson a kol. 2010; Tyzzer 1912). Velikost oocyst se u každého druhu více či méně liší. Velikost střevní kryptosporidie *C. parvum* je $5,00 \times 4,50 \mu\text{m}$ (Tyzzer 1912). Nejmenší oocysty byly zjištěny u *C. ryanae* a mají velikost $4,41 \times 2,94 \mu\text{m}$ (Fayer a kol. 2008). Velikost žaludeční *C. muris* je udávána $7,75 \times 5,55 \mu\text{m}$ (Katsumata a kol. 2000), *C. andersoni* jsou velké $7,40 \times 5,50 \mu\text{m}$ (Lindsay a kol. 2000) a *C. galli* měří $8,25 \times 6,30 \mu\text{m}$ (Ryan a kol. 2003).

2.2 Historie

Roku 1907 detekoval Tyzzer kryptosporidie ve žláznaté části žaludku u myši. Tento druh byl popsán jako *Cryptosporidium muris* a podrobněji byl popsán roku 1910 (Tyzzer 1910). Několik let před popisem *C. muris* Tyzzerem byl tento parazit s největší pravděpodobností detekován taktéž u myši a pojmenován *Coccidium falciforme* (Tyzzer 1910). Druhým popsáným druhem bylo *Cryptosporidium parvum* parazitující v tenkém střevě dospělých myši (Tyzzer 1912). V dalších letech bylo popsáno množství dalších druhů kryptosporidií s různým místem jejich lokalizace (Ryan a kol. 2015). Dnes je uznáváno 32 platných druhů kryptosporidií, přičemž potkani nejsou typickým hostitelem žádného z nich. Výčet všech druhů, které jsou popsány dle pravidel zoologické nomenklatury, je uveden v tabulce 1. První nález hostitelsky specifických kryptosporidií u potkanů detekovali Kimura a kol. (2007) v Japonsku.

Tabulka 1: Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*.

Druh	Reference	Hostitel	Lokalizace
<i>C. andersoni</i>	Lindsay a kol. 2000	skot	slez
<i>C. avium</i>	Holubová a kol. 2016	ptáci	střevo, vdušné vaky, ledviny
<i>C. baileyi</i>	Current a kol. 1986	drůbež	bursa Fabricii
<i>C. bovis</i>	Fayer a kol. 2005	skot	tenké střevo
<i>C. canis</i>	Fayer a kol. 2001	psi	tenké střevo
<i>C. cuniculus</i>	Robinson a kol. 2010	králík	střevo
<i>C. ducismarci</i>	Traversa 2010	želvy	střevo
<i>C. erinacei</i>	Kváč a kol. 2014	ježek	střevo
<i>C. fayeri</i>	Ryan a kol. 2008	klokani	střevo
<i>C. felis</i>	Iseki 1979	kočky	tenké střevo
<i>C. fragile</i>	Jirků a kol. 2008	obojživelníci	žaludek
<i>C. galli</i>	Ryan a kol. 2003	ptáci	žláznatý žaludek
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan a kol. 2002	člověk	tenké střevo
<i>C. huwi</i>	Ryan a kol. 2015	ryby	žaludek
<i>C. macropodum</i>	Power a Ryan 2008	klokani	střevo
<i>C. meleagridis</i>	Sréter a kol. 2000	krocan	tenké střevo
<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero a Sitjá-Bobadilla 2002	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. muris</i>	Tyzzer 1910	hlodavci	žaludek
<i>C. parvum</i>	Tyzzer 1912	savci	tenké střevo
<i>C. proliferans</i>	Kváč a kol. 2016	hlodavci	žaludek
<i>C. rubeyi</i>	Li a kol. 2015	veverka	střevo
<i>C. ryanae</i>	Fayer a kol. 2008	skot	střevo
<i>C. scrofarum</i>	Kváč a kol. 2013	prasata	střevo
<i>C. serpentis</i>	Levine 1980	plazi	žaludek
<i>C. suis</i>	Ryan a kol. 2004	prasata	žaludek, tlusté střevo
<i>C. testudinis</i>	Ježková a kol. 2016	želvy	střevo
<i>C. tyzzeri</i>	Ren a kol. 2012	myš	tenké střevo
<i>C. ubiquitum</i>	Li a kol. 2014	ovce, kozy	střevo
<i>C. varanii</i>	Pavlásek a Ryan 2008	plazi	střevo
<i>C. viatorum</i>	Elwin a kol. 2012	člověk	střevo
<i>C. wrairi</i>	Vetterling a kol. 1971	morčata	tenké střevo
<i>C. xiaoi</i>	Fayer a kol. 2009	ovce	střevo

2.3 Vývojový cyklus

Životní cyklus kryptosporidií je poměrně komplikovaný a zahrnuje čtyři fáze. Tyto fáze jsou excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie. Vývojový cyklus zahrnuje jednoho hostitele a dělí se na sexuální a asexuální fázi. Prvním krokem k úspěšnému vývojovému cyklu je pozření oocyst hostitelem. I velmi malé množství oocyst může vyvolat onemocnění zvané kryptosporidióza (Zambriski a kol. 2013).

Z oocyst, které v hostiteli excystují, se uvolní čtyři sporozoiti, kteří napadají buňky epitelu. Každý sporozoit obsahuje haploidní jádro s 8 chromozomy (Blunt a kol. 1997).

Kryptosporidie nejčastěji infikují gastrointestinální trakt, a to konkrétně žaludek nebo střevo. Jak již bylo popsáno výše, kryptosporidie byly detekovány i v jiných orgánech, a to zejména u ptáků, kdy se kryptosporidie vyskytují v dýchacím aparátu, případně u imunodeficitních jedinců (Current a kol. 1986; Lindsay a Blagburn 1990; Wang a kol. 2014).

U kostnatých ryb byl popsán odlišný vývojový cyklus. Jedná se o druhy *Cryptosporidium molnari* a *Cryptosporidium huwi*. Oocysty byly detekovány uvnitř žaludeční sliznice, případně uvnitř buněk střevního epitelu. Část vývojového cyklu těchto dvou druhů kryptosporidií probíhá uvnitř buněk, což je pro tyto druhy unikátní (Ryan a kol. 2015; Sunnotel a kol. 2006).

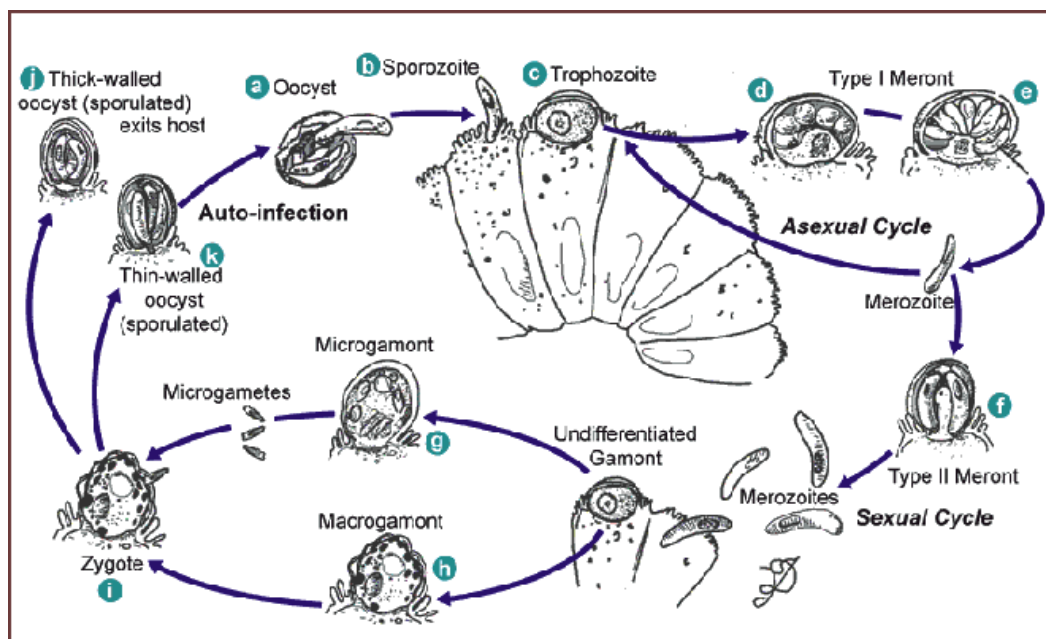
Životní cyklus začíná požitím infekce schopných oocyst, pro které je daný hostitel vnímavý. Množství pozřených životaschopných oocyst není pro infekci rozhodující (Melicharová a kol. 2014; Zambriski a kol. 2013).

Oocysty excystují v hostiteli v žaludku, respektive ve střevě. Obecně je předpokládáno, že žaludeční druhy jsou adaptovány na kyselé žaludeční pH, zatímco sporozoiti střevních druhů nejsou schopni při nízkém pH přežít (Widmer a kol. 2007). Nicméně Havrdová (2016) prokázala, že oocysty *C. parvum* nemusí být vystaveny prostředí žaludku, aby byla vyvolána infekce u vnímavého hostitele. Uvolnění sporozoiti z oocyst se aktivně pohybují, vyhledávají a napadají hostitelskou buňku (Wetzel a kol. 2005). Při kontaktu hostitelské buňky se sporozoitem dochází k vychlípění plazmatické membrány hostitelské buňky, membrána postupně obklopuje sporozoit až do vzniku parazitoforního vaku (Melicharová a kol. 2014; Valigurová a kol. 2007; Yoshikawa a Iseki 1991). S hostitelskou buňkou je sporozoit spojen pomocí tak zvané feeder organely (Goebel a Braendler 1982).

Další fází vývojového cyklu je merogonie, během které se jádro trofozoita asexuálně rozmnožuje. Vzniká meront I. typu, který obsahuje 6-8 merozoitů. Merozoiti I. typu napadají další buňky a opět dávají vzniknout merontům I. typu, případně merontům II. typu, kteří obsahují 4 merozoity (Aydin 1997). Pouze merozoiti II. typu se vyvíjí v samčí (mikrogamonty), respektive samičí (makrogamonty) stádia. Mikrogamonti se mnohonásobně dělí a vzniká z nich celkem až 16 pohyblivých mikrogamet. Makrogamont je jednojaderný a vyvíjí se v jednu makrogametu, která je vyhledávána mikrogametami. Mikrogameta penetruje do makrogamety a tím dochází k oplodnění. Oplodněná makrogameta se vyvíjí v oocystu (Current a kol. 1986; Current a Reese 1987; Fayer a Ungar 1986; Valigurová a kol. 2008).

Každá oocysta obsahuje velké reziduální tělísko a čtyři sporozoity (Uni a kol. 1987). U *Cryptosporidium parvum* byl prokázán vznik dvou typů oocyst. Tenkostěnné oocysty, které způsobují autoinfekci (Blunt a kol. 1997; Widmer 2007) a silnostěnné oocysty, které jsou vylučovány společně s trusem do vnějšího prostředí, kde jsou ihned schopné infikovat dalšího hostitele (Current a Reese 1987; Sunnotel a kol. 2006). Díky stavbě buněčné stěny jsou silnostěnné oocysty dobře adaptovány na přežití v nepříznivém prostředí (Jenkins a kol. 2010a).

Obrázek 1: Vývojový cyklus kryptosporidií (Current 1991; upraveno).



2.4 Hostitelská specifita

Každý parazit využívá určité rozmezí živočišných druhů jako své hostitele. Toto rozmezí je označováno jako hostitelská specifita. Kryptosporidie jsou úzce nebo široce hostitelsky specifické. Mezi nejméně hostitelsky specifické druhy patří *C. parvum* a *C. ubiquitum*, u kterých se předpokládá jejich infektivita pro všechny savce včetně člověka (DuPont a kol. 1995; Fayer 2004; Li a kol. 2014; Rašková a kol. 2013). Úzká hostitelská specifita je typická pro druhy *C. wrairi*, *C. ryanae*, *C. hominis*, *C. suis* nebo *C. scrofarum* (Ifeonu a kol. 2016; Kváč a kol. 2013a; Morgan-Ryan a kol. 2002). Nicméně i úzce hostitelsky specifické druhy mohou příležitostně parazitovat v nespecifickém hostiteli. Jako příklad lze uvést infekci imunokompetentního muže druhem *Cryptosporidium erinacei*, pro který je typickým hostitelem ježek (Kváč a kol. 2014).

2.5 Klinické příznaky kryptosporidiových infekcí

Infekce, která je vyvolaná kryptosporidiiemi, se nazývá kryptosporidióza. Klinické projevy u každého hostitele jsou úzce spjaty s jeho imunitním systémem a také závisí na lokalizaci parazita. Kryptosporidióza je studována u velkého spektra hostitelů z důvodu porozumění patogenitě těchto parazitů. Infikovaní jedinci mohou být postiženi silnými vodnatými průjmy a dochází u nich k poškození střevního epitelu (Sterling a kol. 1986), nicméně v řadě případů se vodnaté průjmy vůbec neobjevují (Houpte a kol. 2005; Turkcapar a kol. 2002). Mezi další příznaky patří například zvracení, nechutenství, bolesti břicha, únava, malátnost, nadměrné pocení a horečka (Fayer 2003; Rašková a kol. 2013; Thompson a kol. 2005).

Kryptosporidióza se nejčastěji vyskytuje u imunosuprimovaných osob a u dětí (Segura 2015). U imunokompetentního člověka trvá infekce průměrně 12 dní. Klinické příznaky se objevují nejčastěji v rozmezí 3–26 dní. V případě infekce tlustého střeva může infekce probíhat zcela asymptomaticky, stejně jako při infekci žaludečnými kryptosporidiiemi (Vítovec a kol. 2006). Pouze v ojedinělých případech došlo u postižených jedinců ke kachexii (Anderson 1987; Kváč a kol. 2013c, 2014; Pospischil a kol. 1987).

V zemích třetího světa je kryptosporidióza druhé nejčastější průjmové onemocnění, na které umírají nejčastěji děti do 5 let věku. Obvykle se nakazí z vody, ve které se nacházejí oocysty kryptosporidií. Ty se do vody dostaly z trusu hospodářských i volně žijících zvířat (Striepen 2013).

V posledních letech byla provedena řada studií a bylo zjištěno, že většina druhů kryptosporidií nezpůsobuje žádné klinické příznaky (Houpte a kol. 2005; Kváč a kol. 2013c, 2014; Ryan a Xiao 2014; Segura 2015; Turkcapar a kol. 2002; Vítovec a kol. 2006).

2.6 Kryptosporidiové infekce hlodavců

Hlodavci zahrnují přibližně 40 % savčí rozmanitosti. Jedná se o skupinu s více než 2 200 druhy. Obvykle je rozeznáváno 5 podřádů: Myomorpha (myši, krysy, pískomilové a jim příbuzní), Sciuromorpha (stromové veverka a jim příbuzní), Castorimorpha (bobři, pytlonoši a jim příbuzní), Anomaluomorpha (šupinatky a noháči) a Hystricomorpha (gundiové, kapybary a jim příbuzní). S takovou rozmanitostí zabírají hlodavci širokou škálu habitatů a zobecňování, týkající se jejich přirozené historie, je obtížné. Všichni hlodavci mají dva horní a dva dolní řezáky, které

rostou nepřetržitě (samy se obrušují), ale chybí jim špičáky. Většina druhů jsou býložravci, případně všežravci.

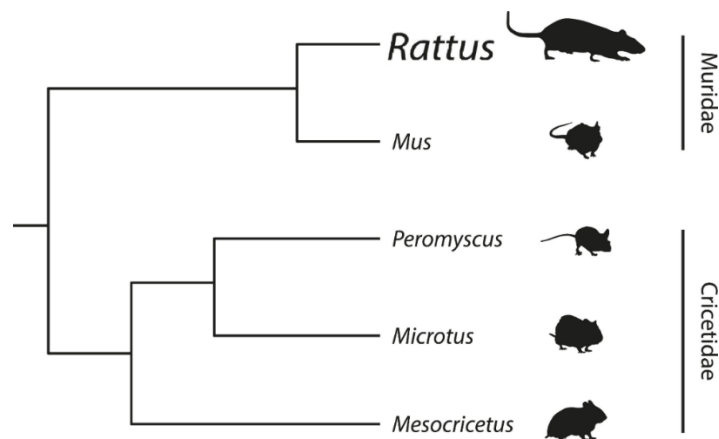
Myši a krysy starého světa jsou zahrnuty v čeledi Muridae. Do stejné skupiny patří i pískomilové, kteří jsou často využíváni jako laboratorní zvířata pro experimentální infekce kryptosporidii, jelikož jsou k těmto parazitům dobře vnímaví (Baishanbo a kol. 2005; Kváč a kol. 2009d).

Kryptosporidiiim hlodavců byly dosud věnovány stovky studií (PubMed, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Byly u nich popsány druhy jako *C. muris* (Tyzzer 1910), *C. tyzzeri* (Ren a kol. 2012) a u morčat *C. wrairi* (Vetterling a kol. 1971).

2.7 Hlodavci rodu *Rattus*

Hlodavci rodu *Rattus* jsou řazeni do říše Animalia, kmene Chordata, podkmene Vertebrata, třídy Mammalia, řádu Rodentia a čeledi Muridae. Příbuznost s dalšími drobnými hlodavci znázorňuje obrázek 2.

Obrázek 2: Fylogenetická příbuznost vybraných druhů hlodavců (Bedford a Hoekstra 2015; upraveno).



Nejznámější zástupci rodu *Rattus* jsou potkan (*Rattus norvegicus*) a krysa obecná (*Rattus rattus*), přičemž potkan je jediný druh rodu *Rattus*, který se označuje v češtině rodově jinak než krysa a to jako potkan obecný. Hlodavci rodu *Rattus* jsou téměř celosvětově rozšíření s výjimkou polárních oblastí (Reid 2006). Tito hlodavci jsou nejrozšířenější ze všech komenzálních zvířat a nejhorší ze všech škůdců (Lowe a kol. 2000).

2.7.1 Fylogeografie hlodavců rodu *Rattus*

Hlodavci rodu *Rattus sensu stricto* se poprvé objevili před ~7,5 – 5,5 miliony let. *Rattus sensu stricto* prodělal dvě intenzivní speciace. První byla před ~2,7 miliony let a vytvořilo se pět *Rattus* linií v období kratším než 0,3 milionu let. Druhá speciace začala před ~1,2 miliony let a stále pokračuje (Verneau 1998). K největší diverzifikaci v rodu *Rattus* došlo v době před ~3,5 miliony let. V tomto období se separoval endemický druh z Nové Guinei *Rattus praetor* a další linie zahrnovala druhy *R. norvegicus*, *R. exulans*, *R. rattus* a *R. tanezumi* (Robins 2008). V průběhu let došlo k rozpadu tzv. pravých krys a potkanů na přibližně 60 druhů. Výčet je uveden v tabulce 2. K celosvětovému výskytu napomohla těmto hlodavcům námořní doprava, která značně zasáhla do jejich přirozeného rozšíření (Aplin a kol. 2003; Verneau 1998).

Jako původní oblast výskytu potkana obecného je považována východní centrální Asie, včetně dnešní severní Číny a Mongolska (Hedrich 2000; Lin a kol. 2011; Lydekker 1896). Nedávné analýzy ovšem prokázaly, že ancestrální formy druhu *Rattus norvegicus* původně pochází z Jihovýchodní Číny z doby před ~1,6 – 1,2 miliony let (Jin a kol. 2008; Wu a Wang 2012). Zkoumání fosilních vzorků nalezených v jeskyni Choukoutien v severní Číně prokázalo, že se potkani do těchto míst dostali v době před ~0,4 miliony let a dále se rozšířili do většiny Číny a přilehlých Asijských zemí (~0,13 – 0,01 milionu let) (Wu a Wang 2012). Během 15. století byli potkani postupně introdukováni do celého světa. V Evropě je jejich výskyt zaznamenán poprvé začátkem 18. století.

Tabulka 2: Výčet druhů rodu *Rattus* (Musser a Carleton 1993).

Druh	Výskyt	Druh	Výskyt
<i>Rattus adustus</i>	Indonésie	<i>Rattus mindorensis</i>	Filipíny
<i>Rattus annandalei</i>	Indonésie, Malajsie	<i>Rattus mollicomulus</i>	Indonésie
<i>Rattus argentiventer</i>	JV Asie	<i>Rattus montanus</i>	Srí Lanka
<i>Rattus baluensis</i>	Malajsie	<i>Rattus mordax</i>	Papua Nová Guinea
<i>Rattus bontanus</i>	Indonésie	<i>Rattus morotaiensis</i>	Indonésie
<i>Rattus burrus</i>	Indie	<i>Rattus nativitatis</i>	Vánoční ostrov
<i>Rattus colletti</i>	Austrálie	<i>Rattus nitidus</i>	JV Asie
<i>Rattus detentus</i>	Papua Nová Guinea	<i>Rattus norvegicus</i>	Celosvětově
<i>Rattus elaphinus</i>	Indonésie	<i>Rattus novaeguineae</i>	Papua Nová Guinea
<i>Rattus enganus</i>	Indonésie	<i>Rattus osgoodi</i>	Vietnam
<i>Rattus everetti</i>	Filipíny	<i>Rattus palmarum</i>	Indie
<i>Rattus exulans</i>	JV Asie, ostrovy Pacifiku	<i>Rattus pelurus</i>	Indie
<i>Rattus feliceus</i>	Indonésie	<i>Rattus praetor</i>	Indonésie, Papua Nová Guinea
<i>Rattus foramineus</i>	Indonésie	<i>Rattus ranjiniae</i>	Indie
<i>Rattus fuscipes</i>	Austrálie	<i>Rattus rattus</i>	Celosvětově
<i>Rattus giluwensis</i>	Papua Nová Guinea	<i>Rattus sikkimensis</i>	JV Asie
<i>Rattus hainaldi</i>	Indonésie	<i>Rattus simalurensis</i>	Indonésie
<i>Rattus hoogerwerfi</i>	Indonésie	<i>Rattus sordidus</i>	Austrálie, Indonésie, Papua Nová Guinea
<i>Rattus jobiensis</i>	Indonésie	<i>Rattus steini</i>	Indonésie, Papua Nová Guinea
<i>Rattus koopmani</i>	Indonésie	<i>Rattus stoicus</i>	Indie
<i>Rattus korinchi</i>	Indonésie	<i>Rattus tanezumi</i>	JV Asie
<i>Rattus leucopus</i>	Austrálie, Indonésie, Papua Nová Guinea	<i>Rattus tawitawiensis</i>	Filipíny
<i>Rattus losea</i>	JV Asie	<i>Rattus timorensis</i>	Indonésie
<i>Rattus lugens</i>	Indonésie	<i>Rattus tiomanicus</i>	JV Asie
<i>Rattus lutreolus</i>	Austrálie	<i>Rattus tunneyi</i>	Austrálie
<i>Rattus macleari</i>	Vánoční ostrov	<i>Rattus turkestanicus</i>	Asie
<i>Rattus marmosurus</i>	Indonésie	<i>Rattus villosissimus</i>	Austrálie

2.7.2 Nemoci přenášené hlodavci rodu *Rattus*

Celosvětově nejrozšířenější hlodavec z rodu *Rattus* je *Rattus norvegicus* (potkan obecný). V České republice se vyskytuje na celém území včetně vysokých nadmořských výšek. Tento hlodavec patří mezi významné přenašeče parazitárních, bakteriálních i virových onemocnění. Z původců onemocnění přenosných na hospodářská a domácí zvířata případně na člověka jsou nejvýznamnější leptospiry, listerie, salmonely, rickettsie, *Mycobacterium tuberculosis*, *Francisella tularensis*, *Trichinella spiralis* a řada dalších (Evangelista 2010; Hilton a kol. 2002; Lecuit 2007; Webster a Macdonald 1995; Zhan a kol. 2009). Kromě výše uvedených původců zoonotických chorob, jsou hlodavci rodu *Rattus* zdrojem kryptosporidií.

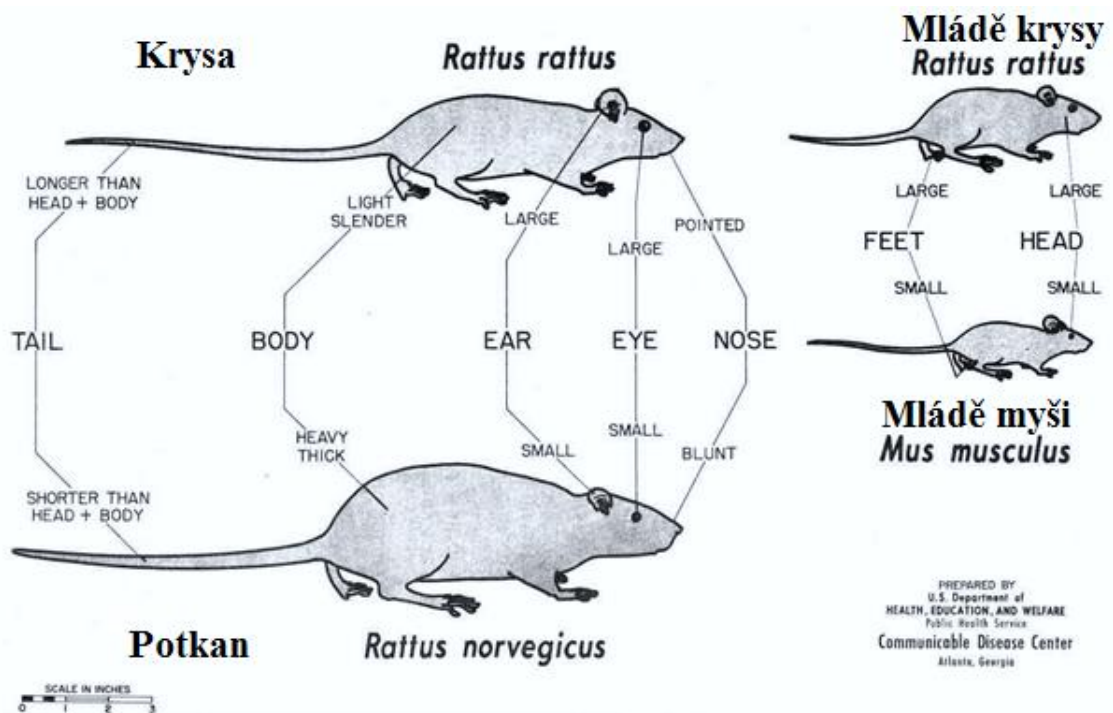
2.7.3 Biologie rodu *Rattus*

Hlodavci rodu *Rattus* jsou jedním z neúspěšnějších rodů v živočišné říši. Nachází uplatnění jako laboratorní zvířata, jelikož jsou významným modelovým organismem. Výhodou je rychlá generační doba a velký počet potomstva. Pohlavně dospívají v 50-60 dnech stáří a samice má v jednom vrhu až 12 mláďat.

Na druhou stranu divoké druhy rodu *Rattus* způsobují obrovské škody v zemědělství a to hlavně v jihovýchodní Asii. Přirozeně se vyskytují v zemědělských oblastech, při pobřeží, na pastvinách, v mokřadech, ruderálních a urbanizovaných plochách. Jejich výskyt je obvykle spojen s přítomností člověka. Hlodavci rodu *Rattus* jsou omnivorní oportunisti, ale preferují více rostlinnou potravu, jako je obilí, brambory, ovoce a zelenina. Díky studiu jejich potravních preferencí lze redukovat populace těchto hlodavců. Sociální učení a předávání zkušeností mladým jedincům je obecně známý fenomén (Cowan a kol. 2003; Galef a Allen 1995).

Rozdíl ve stavbě těla krysy a potkana znázorňuje obrázek 3. Obecně lze říci, že potkan má menší uši a ocas je kratší než délka těla. Krysa je obvykle tmavě zbarvená a potkan je spíše hnědý a má světlé břicho (Reid 2006).

Obrázek 3: Rozdíl ve stavbě těla krysy, potkana a myši domácí (Reid 2006; upraveno).



2.8 Kryptosporidie a kryptosporidióza hlodavců rodu *Rattus*

Kryptosporidiím bylo dosud věnováno přibližně 9000 studií. Těch, které se zabývají kryptosporidii u hlodavců, jsou řádově stovky, studií zabývajících se molekulární epidemiologií nebo biologickými vlastnostmi kryptosporidií u hlodavců rodu *Rattus* je méně než 20 (WEB of Knowledge, <https://apps.webofknowledge.com>).

Ve většině prací byly oocysty kryptosporidií u hlodavců rodu *Rattus* detekovány pouze mikroskopicky a rozlišování různých druhů bylo založeno pouze na morfologii a morfometrii oocyst (Gholipoury a kol. 2016; Iseki 1986; Webster a Macdonald 1995). Ze současného pohledu nelze bez molekulárních analýz různých genotypů přesně porozumět diverzitě, epidemiologii a zoonotickému potenciálu těchto parazitů (Xiao a Fayer 2008).

Hlodavci rodu *Rattus* jsou vnímaví k řadě druhů kryptosporidií. Jedná se jak o druhy s úzkou, tak i s širokou hostitelskou specifitou. Do současné doby bylo u těchto hlodavců popsáno 5 druhů, 5 genotypů kryptosporidií a řada dalších izolátů (tabulka 3).

Tabulka 3: Přehled dosud detekovaných druhů a genotypů kryptosporidií u hlodavců rodu *Rattus*.

Druh / genotyp rodu <i>Cryptosporidium</i>	Metoda detekce	Referenční sekvence (SSU) GenBank	Země	Reference	
<i>C. parvum</i>	Mikroskopicky	–	Japonsko	Iseki 1986	
	Mikroskopicky	–	Anglie	Webster a Macdonald 1995	
	PCR	AB271070	Japonsko	Kimura a kol. 2007	
	PCR-RFLP	HQ651732	Írán	Bahrami a kol. 2012	
	PCR	AB986579-81	Írán	Saki a kol. 2016	
	PCR	(EU331237)*	Čína	Zhao a kol. 2015	
<i>C. muris</i>	Mikroskopicky	–	Japonsko	Iseki 1986	
	PCR	JX485397	Filipíny	Ng-Hublin a kol. 2013	
	PCR	JQ313975	Brazílie	Silva a kol. 2013	
	PCR	(EU245045)*	Čína	Zhao a kol. 2015	
<i>C. tyzzeri</i>	PCR	GQ121024	Čína	Chaochao a kol. 2009	
<i>C. scrofarum</i>	PCR	JX485403	Filipíny	Ng-Hublin a kol. 2013	
<i>C. suis-like</i>	PCR	JX485388	Filipíny	Ng-Hublin a kol. 2013	
<i>C. meleagridis</i> rat genotype I	PCR	AB271063	Japonsko	Kimura a kol. 2007	
	PCR	JX485398	Filipíny	Ng-Hublin a kol. 2013	
	PCR	GQ121025	Čína	Chaochao a kol. 2009	
rat genotype II	PCR	JX294358	Austrálie	Paparini a kol. 2012	
	PCR	JX485400	Filipíny	Ng-Hublin a kol. 2013	
	PCR	GQ121026	Čína	Chaochao a kol. 2009	
rat genotype III	PCR	JX294361	Austrálie	Paparini a kol. 2012	
	PCR	JX485389	Filipíny	Ng-Hublin a kol. 2013	
	PCR	KF176349	Brazílie	Silva a kol. 2013	
rat genotype IV izolát BR3 ¹ izolát BR4 a 20 ¹ izolát BR8 izolát BR12 ¹ izolát BR10 a 15 ² izolát BR16 a 44 ¹ izolát BR31 ² izolát BR40 ²	PCR	JX485394	Filipíny	Ng-Hublin a kol. 2013	
	PCR	AB271061	Japonsko	Kimura a kol. 2007	
	PCR	AB271062	Japonsko	Kimura a kol. 2007	
	PCR	AB271064	Japonsko	Kimura a kol. 2007	
	PCR	AB271066	Japonsko	Kimura a kol. 2007	
	PCR	AB271067	Japonsko	Kimura a kol. 2007	
	PCR	AB271068	Japonsko	Kimura a kol. 2007	
	PCR	AB271071	Japonsko	Kimura a kol. 2007	
	PCR	AB271072	Japonsko	Kimura a kol. 2007	
	histologie	–	Korea	Seok a kol. 2005	
	<i>Cryptosporidium</i> sp. (blíže nedefinováno)	mikroskopicky	–	Írán	Gholipoury a kol. 2016
		mikroskopicky	–	Indonésie	Prasetyo 2016
mikroskopicky		–	Japonsko	Yamaura a kol. 1990	

* Sekvence z této studie nejsou uloženy v databázi GenBank, jsou však identické s těmito uvedenými sekvencemi; ¹ později popsáno jako *Cryptosporidium* rat genotype IV; ² později popsáno jako *Cryptosporidium* rat genotype I

Jako první detekoval oocysty v trusu u *Rattus norvegicus* a *R. rattus* Iseki (1986) v Japonsku. Vzorky trusu z kolony a céka byly vyšetřeny mikroskopicky. Dle morfometrie se jednalo o dva různé druhy kryptosporidií, které byly považovány za *C. parvum* a *C. muris* a tyto izoláty byly infekční pro laboratorní potkany. Prevalence byla 14,8 %. V další studii provedené v Japonsku byly detekovány oocysty ze vzorků

trusu opět mikroskopicky. Dle velikosti oocyst se předpokládalo, že se jednalo o jeden druh kryptosporidií, který nebyl blíže specifikován. Prevalence byla 13,9 % (Yamaura a kol. 1990). V roce 1995 byly detekovány kryptosporidie v Anglii a dle velikosti oocyst byly považovány za *C. parvum*. V této studii byla překvapivě vysoká prevalence a to 63 % (Webster a Macdonald 1995). Další studie byla provedena až v roce 2005. U 6 % laboratorních potkanů v Severní Koreji dodávaných do výzkumných laboratoří, byly kryptosporidie nalezeny v histologických preparátech střeva, ačkoliv vzorky trusu byly mikroskopicky negativní (Seok a kol. 2005).

První studie, ve které byla provedena molekulární genotypizace kryptosporidií u *Rattus norvegicus*, byla publikována až v roce 2007 v Japonsku. Fylogenetická analýza genu kódujícího malou ribozomální podjednotku rRNA ukázala přítomnost jak známých druhů, tak nových genotypů, které do té doby nebyly detekovány u žádných jiných obratlovců. Celková promořenost potkanů v této studii byla 38 % (Kimura a kol. 2007).

Feng a kol. 2009 sledovali výskyt kryptosporidií v odpadních vodách v Číně a detekovali sekvenci malé ribozomální podjednotky, která byla identická s izolátem BR15 ze studie Kimura a kol. 2007. Tento genotyp byl nazván *Cryptosporidium* rat genotype.

V roce 2009 byly detekovány a pojmenovány další 2 nové genotypy kryptosporidií parazitujících u krys, jmenovitě *Cryptosporidium* rat genotype II a III (Chaochao a kol. 2009). Prevalence v této studii byla 8,9 %.

V roce 2012 byly provedeny dvě studie zabývající se kryptosporidiiemi hlodavců rodu *Rattus*. První studie byla provedena v Íránu a vzorky byly vyšetřovány pomocí PCR-RFLP metody. Pomocí této metody byly všechny pozitivní vzorky detekovány jako *C. parvum* (Bahrami a kol. 2012). V druhé studii ze severní Austrálie byla na základě přítomnosti specifické DNA kryptosporidií pomocí PCR analýzy pro malou ribozomální podjednotku rRNA a gen kódující aktin popsána 8,2% prevalence kryptosporidií u *Rattus rattus*. Byly detekovány genotypy *Cryptosporidium* rat genotype II a *Cryptosporidium* rat genotype III (Paparini a kol. 2012).

V následujícím roce byly provedeny další dvě studie. V první studii z Brazílie byla na základě molekulárních metod (SSU a aktin) 29,6% promořenost hlodavců rodu *Rattus* druhem *C. muris* a *Cryptosporidium* rat genotype III. Genotyp rat genotype II dříve detekovaný pouze u potkanů a krys byl v této studii nalezen i u myší (Silva a kol. 2013). Ve druhé studii, která byla provedena na vzorcích z Filipín, byly vyjma druhů

C. muris a *C. scrofarum* převážně detekovány hostitelsky specifické genotypy *Cryptosporidium* rat genotype I-IV (Ng-Hublin a kol. 2013). Fylogenetické analýzy prokázaly, že rat genotype IV vytváří společnou skupinu s dříve popsányi izoláty z potkanů z Japonska s izolátem W19 získaném z odpadní vody v USA (Jiang a kol. 2005; Kimura a kol. 2007). U krysu byl v této studii popsán výskyt nového genotypu nazvaného *C. suis-like*, přičemž autoři poznamenali, že by neměl být zaměňován s druhem *C. suis*, od kterého se molekulárně liší. Celková prevalence hlodavců rodu *Rattus* byla 28,1 % (Ng-Hublin a kol. 2013).

Roku 2015 byli vyšetřeni hlodavci rodu *Rattus* v Číně. Detekce kryptosporidií byla provedena pomocí PCR, amplifikací genu pro malou ribozomální podjednotku rRNA a 60-kDa glykoprotein. Molekulární analýzy prokázaly přítomnost specifické DNA u 9 % jedinců, konkrétně druhů *C. parvum* a *C. muris* (Zhao a kol. 2015).

Poslední dosud publikované studie věnované kryptosporidiím u hlodavců rodu *Rattus* byly provedeny v roce 2016 v Indonésii a Íránu. Ve dvou studiích z Indonésie a Íránu byla popsána prevalence 33 % a 6,6 %. Nicméně hlodavci byli podrobeni celkovému parazitologickému vyšetření a oocysty kryptosporidií byly detekovány pouze mikroskopicky a není tudíž jasné, jaké druhy, případně genotypy kryptosporidií se u těchto hlodavců vyskytovaly (Gholipury a kol. 2016; Prasetyo 2016). Ve třetí studii (Írán) byla detekce kryptosporidií založena na kombinaci mikroskopického vyšetření, RFLP-PCR a sekvenování genu pro malou ribozomální podjednotku rRNA. Na základě restriční analýzy a získaných sekvencí byly pozitivní vzorky vyhodnoceny jako *C. parvum*. Prevalence u hlodavců rodu *Rattus* v této studii byla 3,2 % (Saki a kol. 2016).

3 CÍLE PRÁCE

- Kritické zpracování literární rešerše k problematice daného tématu.
- Popis diverzity kryptosporidií hlodavců rodu *Rattus* z vybraných lokalit pomocí molekulárních metod.
- Popis biologie nalezených a nedostatečně charakterizovaných genotypů.
- Vyhodnocení zoonotického potenciálu detekovaných druhů a genotypů kryptosporidií.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Zdroj biologického materiálu

Celkem bylo získáno 788 vzorků trusu nebo obsahů zažívacího traktu z několika lokalit v České republice, na Slovensku, Novém Zélandu, Filipínách, v Kamerunu, Keni, Kambodži a Thajsku. Vzorky byly skladovány v dichromanu draselném nebo v ethanolu.

4.1.2 Získání parazitů

Ze vzorků trusu byly získány 4 genotypy kryptosporidií hostitelsky specifické pro hlodavce rodu *Rattus*. Pouze oocysty genotypů *Cryptosporidium* rat genotype I a *Cryptosporidium* rat genotype IV byly získány v takovém množství a kvalitě, aby bylo možné s nimi laboratorně pracovat. Ze vzorků s izoláty *Cryptosporidium* rat genotype II a *Cryptosporidium* rat genotype III byla získána pouze specifická DNA, jelikož vzorky byly uchovány v ethanolu.

4.1.3 Experimentální zvířata

Laboratorní potkani kmene Wistar (*Rattus norvegicus*) ve věku 4 a 8 týdnů, 8 týdnů staré laboratorní myši BALB/c (*Mus musculus*), 8 týdnů staří pískomilové mongolští (*Meriones unguiculatus*). Potkani byli pořízeni z firmy AnLab, s.r.o. Myši a pískomilové byli získáni z chovu Parazitologického ústavu, Biologického centra AVČR, v. v. i. v Českých Budějovicích.

4.2 Metody

4.2.1 Zpracování vzorku

U čerstvě odebraných vzorků trusu, případně ze vzorků skladovaných v dichromanu draselném byla provedena detekce oocyst kryptosporidií pomocí specifických barvení, dále purifikace oocyst pro experimentální infekce a morfometrické analýzy a izolace DNA pro genotypizaci. Ze vzorků skladovaných v ethanolu byla provedena pouze izolace DNA.

4.2.2 Purifikace oocyst

Trus s oocystami *Cryptosporidium* rat genotype I nebo *Cryptosporidium* rat genotype IV byl homogenizován ve třecí misce, dále přečištěn na sacharózovém gradientu a nakonec dočištěn na cesium chloridovém gradientu.

Sacharózový gradient (Arrowood a Stearling 1987)

Chemikálie: Sheaterův roztok, 1% roztok PBS Tween a pracovní Sheaterovy roztoky.

Složení Sheaterova roztoku: 259 ml deionizované vody, 405 g cukru a 7,29 g fenolu

Pracovní Sheaterovy roztoky: 1+2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween)

1+4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

Postup:

1. Zbavit trus příměsí přecezením přes sítko.
2. Do 4 skleněných zkumavek navrstvit pomocí pasteuovy pipety gradient:
 1. vrstva: 30 ml Sheater 1+2
 2. vrstva: 30 ml Sheater 1+4
 3. vrstva: 15 ml vzorku trusu
3. Centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
4. Horní zbarvenou vrstvu (cca 1/3) odsát a zbylý supernatant přenést do čistých zkumavek.
5. Zkumavky doplnit deionizovanou vodou a centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut. při 1370 g.
6. Polovinu objemu odsát a vzorky doplnit deionizovanou vodou. Centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
7. Zopakovat krok 6.
8. Sediment přenést do čisté zkumavky a uchovat při 4 °C s přídatkem ATB případně zalít 5% dichromanem draselným.

Cesium chloridový gradient

Chemikálie: Cesium chlorid (roztok o hustotě 1,15 g.ml⁻¹), PBS (0,025 M roztok; pH 7,2).

Postup:

1. Centrifugovat vzorky přečištěné na cukrovém gradientu.
2. Odsát supernatant, přidat PBS a rozsuspendovat.
3. Do čisté 1,7 ml zkumavky napipetovat 1 ml CsCl.
4. Na CsCl opatrně navrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
5. Vzorek centrifugovat při laboratorní teplotě po dobu 3 minuty při 16 000 g.

6. Odebrat 1 ml supernatantu s oocystami a poté naředit deionizovanou vodou.
7. Vzorek centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
8. Supernatant odsát a pelet skladovat v dichromanu draselném.

4.2.3 Specifické barvení oocyst kryptosporidií

Byl proveden tenký nátěr trusu na podložní sklo, zafixován pomocí methanolu a protažením v plameni. Vzorky byly obarveny metodami anilin-karbol-methyl violetí a metodou dle Ziehl-Neelsena.

Metoda barvení anilin-karbol-methyl violetí (Miláček a Vítovec 1985)

Chemikálie: Methylviolet' (roztok 0,6 g methylvioleti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml 96% alkoholu a 70 ml deionizované vody), roztok 2% kyseliny sírové, 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině sírové.

Postup:

1. Nafixované vzorky obarvit v roztoku methylvioleti po dobu 30 minut.
2. Vzorky opláchnout vodou.
3. Diferenciace v H₂SO₄ po dobu 2 minut.
4. Vzorky opláchnout vodou.
5. Vzorky dobarvit v tartrazinu po dobu 4 minut.
6. Vzorky opláchnout vodou.
7. Nechat vzorky oschnout při laboratorní teplotě a následně prohlížet mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Barvení dle Ziehl-Neelsena v modifikaci dle Henriksena a Pohlenze (1981)

Chemikálie: Roztok karbolfuchsinu (2,5 ml rozpuštěných fenolových krystalů, 5 ml 100% ethanolu, 0,5 g práškového basického fuchsinu, 50 ml destilované vody), 1% kyselý alkohol (1 ml koncentrované kyseliny solné – HCl, 100 ml 70% ethanolu), 0,8% fast green zeleň (0,8 g prášku light green – světlá zeleň, 100 ml deionizované vody).

Postup:

1. Nafixované vzorky v methanolu obarvit v roztoku karbolfuchsinu 2–3 hodiny.
2. Vzorky opláchnout pod tekoucí vodou.
3. Odbarvit nabarvené roztěry v 1% kyselém alkoholu tak, že při odbarvování již neodtéká roztok červené barvy.

4. Opláchnout pod vodou po dobu 1 minuty.
5. Barvit 1 minutu světlou zelení.
6. Vzorky opláchnout pod tekoucí vodou.
7. Nechat vzorky oschnout při laboratorní teplotě a následně prohlížet mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

4.2.4 Hodnocení intenzity infekce

U mikroskopicky pozitivních vzorků byla odhadnuta intenzita infekce a vyjádřena počtem oocyst v gramu trusu (OPG = oocyst per gram) (Kváč a kol. 2007).

4.2.5 Izolace DNA

Izolace byla provedena pomocí komerčního kitu Exgene Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology).

Součásti kitu: FL pufr, PB pufr, NW pufr, EzPass kolona, Kolona typ G, 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavka.

Postup:

1. Přibližně 200 mg vzorku trusu dát do Safe-Lock zkumavky, přidat skleněné a zirkonové kuličky a napipetovat 0,8 ml FL pufru, homogenizovat vortexováním a rozbít přístrojem Fast Prep 24 Instrument (MP Bio) po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s.
2. Inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě, centrifugovat 5 minut při 14 000 g.
3. Přepipetovat veškerý supernatant na EzPass kolonu (bílá kolona).
4. Centrifugovat 1 minutu při 14 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
5. Na kolonku napipetovat 100 µl EB pufru, inkubace 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
6. Vyhodit bílou kolonku a připipetovat 500 µl PB pufru do sběrné zkumavky, promíchat pipetováním.
7. Všechn obsah sběrné zkumavky přenést na mini spin column (zelená kolona).
8. Centrifugovat 1 minutu při 14 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
9. Napipetovat 500 µl pufru NW na střed kolony a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
10. Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět centrifugovat 1 minutu při 14 000 g. Přenést kolonu na čistou eppendorfku.

11. Napipetovat 200 μ l EB pufru na kolonu, inkubovat 1 minutu a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g. Získanou DNA skladovat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.2.6 Genotypizace

Vyizolovaná DNA byla použita pro amplifikaci genu kódujícího malou ribozomální podjednotku rRNA (SSU) a aktin genu pomocí nested PCR. Jako negativní kontrola byla použita dH₂O a jako pozitivní kontrola vyizolovaná DNA *C. parvum*, respektive *C. muris*. Primární reakce byla provedena ve 20 μ l, z toho 10 μ l byl HS-Taq premix (GenAll, Korea) obsahující 2U HS-Taq DNA polymerázy, 200 μ M dNTPs, reakční pufr (2,5 mM MgCl₂), loading dye a stabilizátor. Do reakce bylo dále přidáno 7 μ l PCR vody, 200 mM specifického forward a reverse primeru a 2 μ l genomové DNA. Sekundární reakce byla shodná s předpisem primární reakce. Jako templát pro sekundární reakci byly použity 2 μ l primární reakce.

Primární a sekundární PCR reakce proběhly v 35 cyklech. Nejprve došlo k denaturaci DNA při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 45 sekund. Dále následoval krok nasedání primerů (annealing) při specifické teplotě pro každou reakci po dobu 45 sekund (níže). Následně se teplota zvýšila na $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, při které se prodlužoval řetězec DNA (extension) po dobu 1 minuty. Prvnímu cyklu předcházela počáteční denaturace při teplotě $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 minut a poslední cyklus byl následován finální extenzí při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 7 minut.

Pro amplifikaci každého genu byly použity specifické primery. Tyto primery a jejich nasedací teploty jsou popsány v tabulce 4.

Tabulka 4: Nukleotidové sekvence specifických primerů pro různé geny.

SSU
Primární reakce 55 °C
F1 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'
R1 3'-AGGACAAAGTTCCTTTACCC-5'
Sekundární reakce 55 °C
F2 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'
R2 3'-ATGAAGGTGACGTAGGATACTC-5'

Aktin
Primární reakce 50 °C
F1 5'-ATGRGWGAAGAAGWARYWCAAGC-3'
R1 3'-TAACAKGTGTCTTTYACRAAGA-5'
Sekundární reakce 45 °C
F2 5'-CAAGCWTRGTTGTTGAYAA-3'
R2 3'-GGTWSWTAACAKGTGTCTTT-5'

4.2.7 Gelová elektroforéza

Produkt PCR reakce byl analyzován na 1% agarózovém gelu. Pro detekci byl použit ethidium bromid (EtBr). Vizualizace byla provedena pomocí UV záření transiluminátorem (Ultra-Lum Inc, USA) a následně byl výsledek reakce zdokumentován (Gel Logic 112, program Carestream 1-877-747-HELP, USA).

Chemikálie: 50× TAE pufr (242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA o pH 8,00), agarosa (Serva Electrophoresis, Germany), ethidium bromid (10 mg/ml, Sigma Aldrich, USA), DNA Ladder – 100 bp (Fermentas International Inc., Canada).

Postup:

1. TAE pufr smíchat s agarózou.
2. Pufr s agarózou rozpustit v mikrovlnné troubě a ochladit pod tekoucí vodou.
3. Do tekutého gelu napipetovat 2 µl EtBr a opatrně promíchat.
4. Gel nalít do předem připravené formy s hřebeny a ponechat ztuhnout.
5. Po ztuhnutí hřebeny vyndat a gel vložit do elektroforetické vany s TAE pufrem.
6. Do první jamky napipetovat DNA Ladder a do dalších jamek produkty sekundární reakce PCR.
7. Zapnout zdroj a nastavit napětí v rozmezí 70–120 V po dobu potřebnou k separaci jednotlivých fragmentů DNA.

8. Výsledek elektroforézy vizualizovat pomocí UV transluminátoru a dokumentovat pomocí příslušné kamery.

4.2.8 Izolace z gelu

Produkty gelové elektroforézy vhodné k osekvenování byly vyizolovány pomocí Gen Elute (Sigma) podle doporučení výrobce.

Součásti kitu: Column Preparation solution, Gel Solubilization Solution, Wash Solution Concentrate G, Elution Solution.

Postup:

1. Vyříznout fragment DNA z gelu čistým skalpelem a dát do připravené eppendorfky.
2. Do eppendorfky s fragmentem gelu připipetovat Gel Solubilization Solution. Na 100 mg gelu přidat 300 μ l Gel Solubilization Solution.
3. Inkubovat 10 minut při 50 °C, kontrolovat rozpouštění a promíchat každé 2–3 minuty během rozpouštění.
4. Zahřát PCR vodu na eluci na 65 °C.
5. Sestavit Binding Column G, napipetovat 500 μ l Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 13 200 g.
6. Po rozpuštění musí být v eppendorfce žlutý roztok.
7. Připipetovat ke vzorku 150 μ l isopropanolu a promíchat.
8. Přepipetovat veškerý objem vzorku na kolonu (Binding Column G) a centrifugovat 1 minutu při 13 200 g. Kolona pojme 700 μ l, vzorky s větším objemem nanášet a centrifugovat postupně.
9. Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět použít s kolonou.
10. Přepipetovat 700 μ l Wash Solution G a centrifugovat 1 minutu při 13 200 g.
11. Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět ji použít s kolonou.
12. Centrifugovat 1 minutu při 13 200 g bez přídavku jakýchkoli roztoků.
13. Otočit zkumavku v centrifuze o 180° a centrifugovat znovu 3 minuty při 13 200 g.
14. Kolonu dát do nové 1,5 ml eppendorfky a provést eluci napipetováním 30 μ l Elution Solution předeřátého na 65 °C přímo na střed kolony. Inkubovat 1 minutu a poté centrifugovat 1 minutu při 13 200 g.

4.2.9 Sekvenování a fylogenetické analýzy

Sekvenování sekundárního PCR produktu bylo provedeno pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů. Nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí programu ChromasPro v 1.32 a následně pomocí programů ClustalX a BioEdit porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank.

Získané sekvence byly seřazeny pomocí MAFFT verze 7 online server s automatickým výběrem seřazovací strategie (Mafft, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Zarovnané sekvence byly následně ručně doopraveny v programu BioEdit a byly provedeny fylogenetické analýzy za použití MEGA 6.0. Fylogenetické vztahy byly vytvořeny pomocí metody Maximum likelihood (ML) substitučním modelem, který nejlépe vyhovuje testovaným souborům sekvencí na základě Bayesiánského informačního kritéria. Pro alignmenty SSU a aktinu byl vybrán GTRT+G+I model. Podpora všech větví pro všechny modely byla získána 1000 bootstrapovými replikacemi. Fylogenetické stromy byly do finální podoby upraveny pomocí programu CorelDraw X7.

4.2.10 Design experimentálních prací

Ze vzorků trusu pozitivních na kryptosporidie byla získána infekční dávka pro pokusná zvířata: laboratorní potkan, laboratorní myš BALB/c a pískomil mongolský. Vzorky trusu byly přečištěny přes sítko o velikosti ok 40 μm . Experimentální zvířata byla nainfikována pomocí jční sondy izoláty *Cryptosporidium* rat genotype I nebo *Cryptosporidium* rat genotype IV v dávce 1×10^4 oocyst/zvíře v 0,2 ml dH₂O.

Všechna zvířata byla odebírána denně po dobu 30 dní po infekci. Vzorky byly vyšetřeny nejprve mikroskopicky pomocí barvicí metody dle Ziehl-Neelsena. Z každého vzorku byla následně vyizolována DNA a provedena amplifikace genu SSU.

4.2.11 Odběr vzorků orgánů a tkání

Po usmrcení laboratorních potkanů infikovaných izoláty *Cryptosporidium* rat genotype I a IV byly odebrány vzorky duodena, jejunu, ilea, céka a kolonu. Aby nedošlo ke kontaminaci jednotlivých vzorků, byla na každou část střeva použita nová sada pitevních nástrojů, která byla vysterilněna autoklávováním při 125 °C a dále UV zářením o vlnové délce 254 nm (Uvlink CL 508, UVITEC, UK).

4.2.12 Příprava histologických preparátů

Odebrané části střeva byly nejprve fixovány v 10% formaldehydu a později odvodněny ve vzestupné alkoholové řadě. Alkohol byl po odvodnění zcela nahrazen xylenem. Vzorky byly přeneseny do tekutého parafínu a následně zality do přefiltrovaného parafínu. Byly vytvořeny malé bločky, ze kterých byly pomocí mikrotomu nakrájeny 5 μm široké histologické řezy. Řezy byly přeneseny na podložní skla a byly odparafinovány v xylenu a sestupnou alkoholovou řadou byly převedeny do vody. Takto připravené tkáně byly barveny hematoxylin-eosinem. Obarvené vzorky byly zality do kanadského balzámu a prohlíženy světelným mikroskopem (Olympus IX70) s vhodným zvětšením. Výsledky pozorování byly porovnány s neinfikovanými tkáněmi, které byly vyšetřeny stejným postupem.

4.2.13 Barvení hematoxylin-eosinem

Chemikálie: hematoxylin (0,5 g hematoxylinu, 500 ml dH_2O ; 25 g síranu hlinito-amonného; 0,1 g jodičnanu sodného; 20 ml kyseliny octové), eosin (0,5 g eosin; 250 ml dH_2O ; 10 ml kyseliny octové).

Postup:

1. Vzorky obarvit 10 minut v hematoxylinu.
2. Vzorky oplachovat 10 minut pod tekoucí vodou.
3. Vzorky obarvit 5 minut v eosinu.

4.2.14 Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM)

Chemikálie: 3% glutaraldehyd; 0,1M kakodylátový pufr; 2% oxid osmičelý; acetonová řada (25%, 75% a 100% roztok).

Postup:

1. Vzorky střevní sliznice fixovat přes noc při 4 °C v glutaraldehydu v kakodylátovém pufru.
2. Vzorky promýt v kakodylátovém pufru 3 \times 15 minut.
3. Fixovat vzorky v oxidu osmičelém v kakodylátovém pufru po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě.
4. Vzorky promýt 3 \times 15 minut v kakodylátovém pufru.
5. Po dehydrataci vzestupnou acetonovou řadou vzorky vysušit metodou kritického bodu (CPD). Vzorky vysušit v tlakové komoře pomocí kapalného CO_2 .
6. Vysušené vzorky nalepit pomocí oboustranné lepící pásky na hliníkový terčík.

7. Nalepené vzorky pozlatit a prohlížet pomocí elektronového mikroskopu JOEL JSM-7401F-FE SEM.

5 VÝSLEDKY

5.1 Prevalence kryptosporidií u hlodavců rodu *Rattus*

Z celkového počtu 788 vzorků trusu volně žijících hlodavců rodu *Rattus* byly mikroskopicky pomocí barvení dle Ziehl Neelsena detekovány oocysty kryptosporidií pouze v 5 vzorcích trusu (0,6 %) u potkanů druhu *Rattus norvegicus* z České republiky. Ve všech případech byla zjištěna velmi nízká intenzita infekce v rozmezí 1000-2000 OPG. Specifická 18S rDNA kryptosporidií byla prokázána celkem ve 107 vzorcích, z nichž bylo do následných fylogenetických analýz zařazeno pouze 97. Ve zbylých 10 případech bylo zřejmé, že se jedná o sekvence náležící k některému z druhů nebo genotypů kryptosporidií, ale kvůli nízké kvalitě sekvencí nebylo možné provést genotypizaci (tabulka 5).

Tabulka 5: Druhy a genotypy kryptosporidií detekované u přirozeně infikovaných druhů hlodavců rodu *Rattus* na základě molekulárních analýz, včetně země původu hostitele.

Hostitel	Země	Počet vyšetřených/ pozitivních vzorků	Genotypizace pozitivních vzorků	
			SSU (počet hodnotitelných sekvencí)	Aktin
<i>R. norvegicus</i>	CZE	390/49	rat genotype I (27)	rat genotype I (23)
			rat genotype IV (13)	rat genotype IV (9)
			<i>C. andersoni</i> (3)	<i>C. andersoni</i> (3)
			<i>C. muris</i> (4)	<i>C. muris</i> (4)
			<i>C. suis</i> -like (1)	<i>C. suis</i> -like (1)
NZL	28/5	<i>C. ryanae</i> (1)	<i>C. ryanae</i> (1)	
		rat genotype II (3)	rat genotype III (5)	
THA	100/30	rat genotype I (7)	rat genotype I (6)	
		rat genotype II (1)	rat genotype II (1)	
		rat genotype IV (16)	rat genotype IV (13)	
		<i>C. proliferans</i> (2)	<i>C. proliferans</i> (2)	
SVK	46/0	<i>C. muris</i> (3)	<i>C. muris</i> (2)	
		<i>C. suis</i> -like (1)	<i>C. suis</i> -like (1)	
		–	–	
<i>R. tanezumi</i>	THA	28/6	rat genotype II (2)	rat genotype II (2)
			<i>C. suis</i> -like (1)	rat genotype III (1)
			<i>C. muris</i> (1)	<i>C. suis</i> -like (1)
			<i>C. serpentis</i> (1)	<i>C. muris</i> (1)
<i>R. exulans</i>	KHM	39/3	<i>C. serpentis</i> (1)	<i>C. serpentis</i> (1)
			rat genotype II (1)	rat genotype II (1)
			rat genotype IV (1)	rat genotype III (1)
<i>Rattus</i> sp.	NZL	36/8	rat genotype IV (1)	rat genotype IV (1)
			rat genotype II (4)	rat genotype II (1)
			rat genotype II (3)	rat genotype III (3)
			–	rat genotype III (2)
PHL	63/5	40/0	–	–
			–	–
			–	–
CMR	10/0	–	–	–
			–	–
<i>R. adamanensi</i>	THA	8/1	<i>C. suis</i> -like (1)	<i>C. suis</i> -like (1)

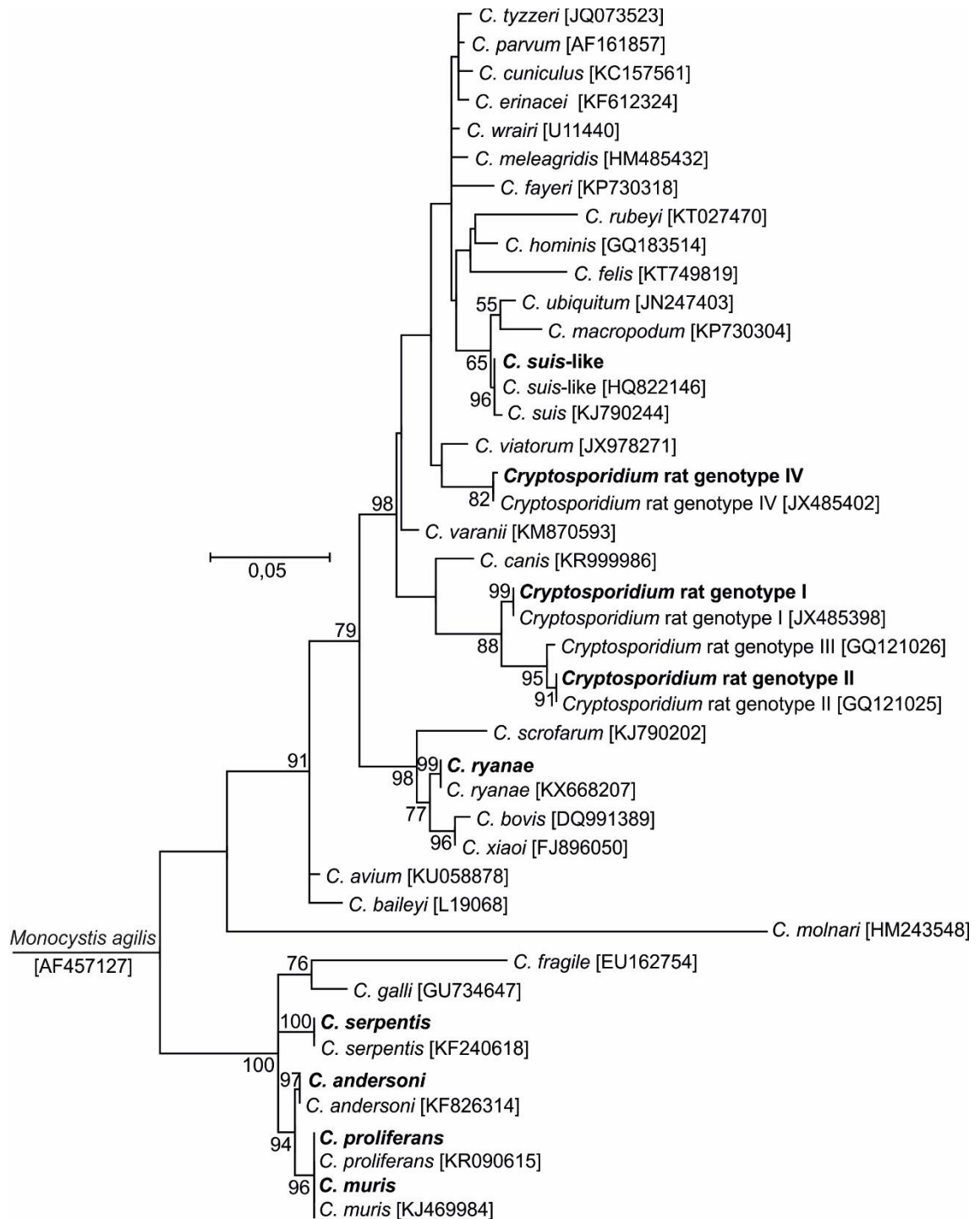
CZE – Česká republika; **CMR** – Kamerun; **KEN** – Keňa; **KHM** – Kambodža; **NZL** – Nový Zéland; **PHL** – Filipíny; **SVK** – Slovensko; **THA** – Thajsko

Fylogenetická analýza na základě genu kódujícího malou ribozomální podjednotku rRNA prokázala přítomnost 5 druhů kryptosporidií, jmenovitě *C. andersoni* (n=3), *C. muris* (n=8), *C. proliferans* (n=2), *C. ryanae* (n=1), *C. serpentis* (n=1) a 4 genotypů: *C. suis-like* (n=4), *Cryptosporidium* rat genotype I (n=34), *Cryptosporidium* rat genotype II (n=14) a *Cryptosporidium* rat genotype IV (n=30; tabulka 5). Všechny sekvence byly 99,5-100 % shodné se sekvencemi uloženými v databázi GenBank (obrázek 4).

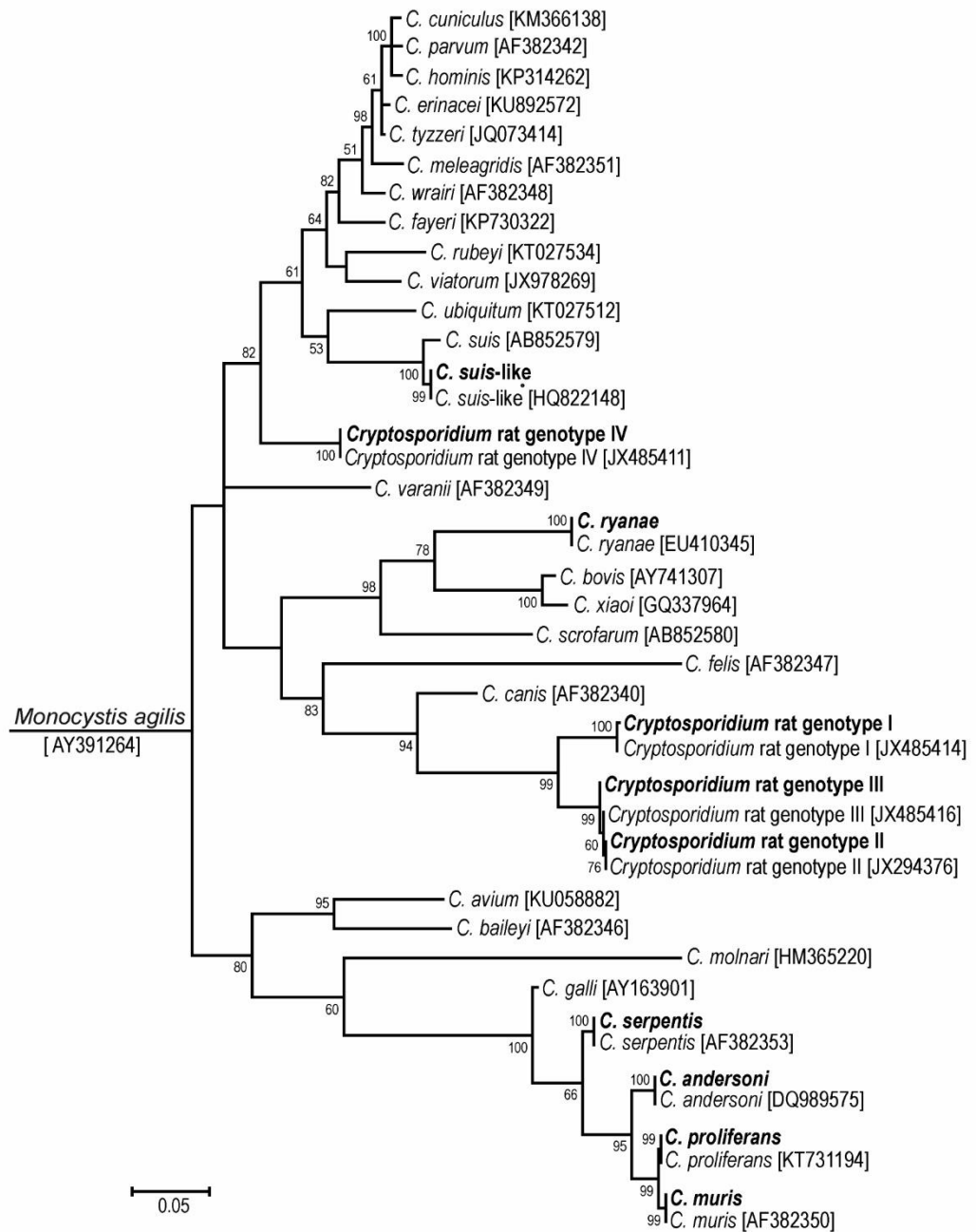
Sekvence genu kódujícího aktin byly získány z 87 vzorků ze 107 pozitivních na 18S rRNA. Fylogenetická analýza na základě genu kódující aktin prokázala taktéž přítomnost všech druhů a genotypů detekovaných na základě sekvencí 18S rDNA. Ve 12 případech byly amplifikovány sekvence genu pro aktin, které byly identické se sekvencemi *Cryptosporidium* rat genotype III, přestože fylogenetické analýzy neprokázaly přítomnost tohoto genotypu v rámci získaných 18s rDNA sekvencí (tabulka 5; obrázky 4 a 5). Všechny tři vzorky z *R. norvegicus* získané na Novém Zélandu byly na základě sekvencí 18S rDNA určeny jako *Cryptosporidium* rat genotype II, zatímco na základě sekvencí genu pro aktin jako *Cryptosporidium* rat genotype III. Obdobně tomu bylo i ve dvou vzorcích získaných na Filipínách a Novém Zélandu z *Rattus* sp. Ve zbylých sedmi případech, kdy byly detekovány sekvence genu pro aktin jako *Cryptosporidium* rat genotype III nebyly získány sekvence pro 18S rDNA (tabulka 5).

Všechny vzorky, které byly mikroskopicky pozitivní (n=5), byly zároveň i PCR pozitivní. V těchto mikroskopicky pozitivních vzorcích byl ve 4 případech detekován *Cryptosporidium* rat genotype I a v 1 případě *Cryptosporidium* rat genotype IV.

Obrázek 4: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z hlodavců rodu *Rattus* v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získané v této studii jsou tučně zvýrazněny.



Obrázek 5: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z hlodavců rodu *Rattus* v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro aktin vytvořený metodou Maximum likelihood. Sekvence získané v této studii jsou tučně zvýrazněny.



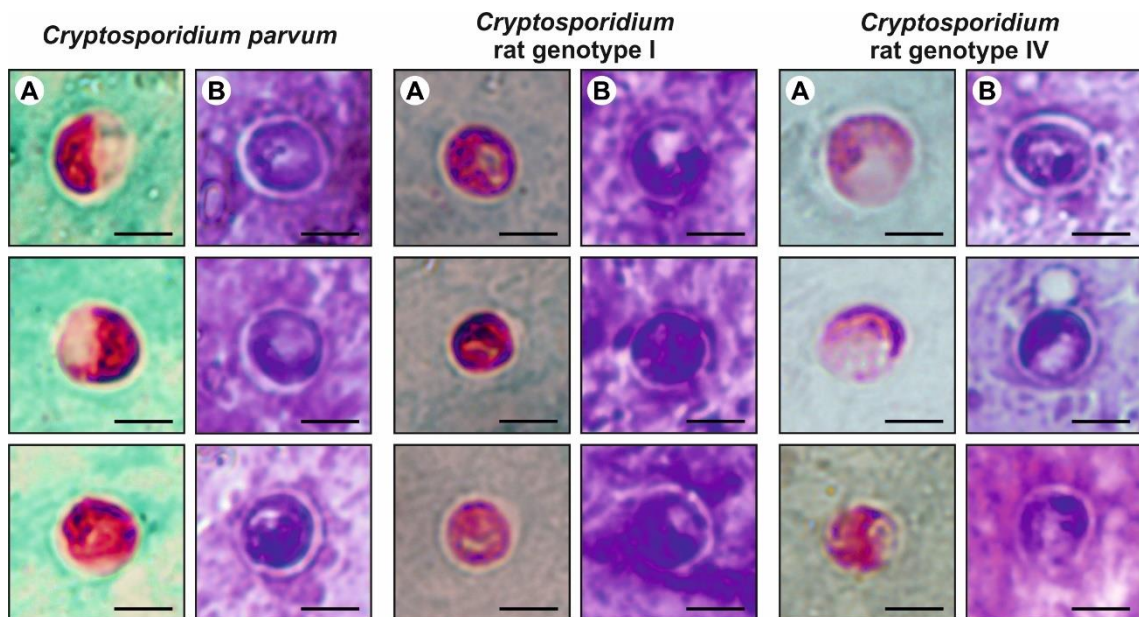
5.2 Biologické vlastnosti *Cryptosporidium* rat genotype I a IV

5.2.1 Morfometrie oocyst

Pro morfologii oocyst byl použit nativní preparát. Tento preparát byl připraven z přečištěného vzorku trusu na cesium chloridovém gradientu a následně uchováván v dichromanu draselném.

Oocysty *Cryptosporidium* rat genotype I má sférické oocysty o velikosti 4,40–5,39 μm (průměr=4,89) \times 4,29–4,95 μm (průměr=4,63) s indexem tvaru 1,06 \pm 0,04 (n=30). Oocysty *Cryptosporidium* rat genotype IV jsou sférické o velikosti 4,84–7,48 μm (průměr=5,77) \times 4,29–7,37 μm (průměr=5,47) s indexem tvaru 1,06 \pm 0,05 (n=30). Oocysty *Cryptosporidium* rat genotype I a IV jsou morfometricky neodlišitelné od oocyst druhu *C. parvum* (obrázek 6).

Obrázek 6: Oocysty *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium* rat genotype I a *Cryptosporidium* rat genotype IV barvené **A)** modifikovanou metodou dle Ziehl Neelsena a **B)** anilin-karbol-methyl-violetí. Měřítko 5 μm .



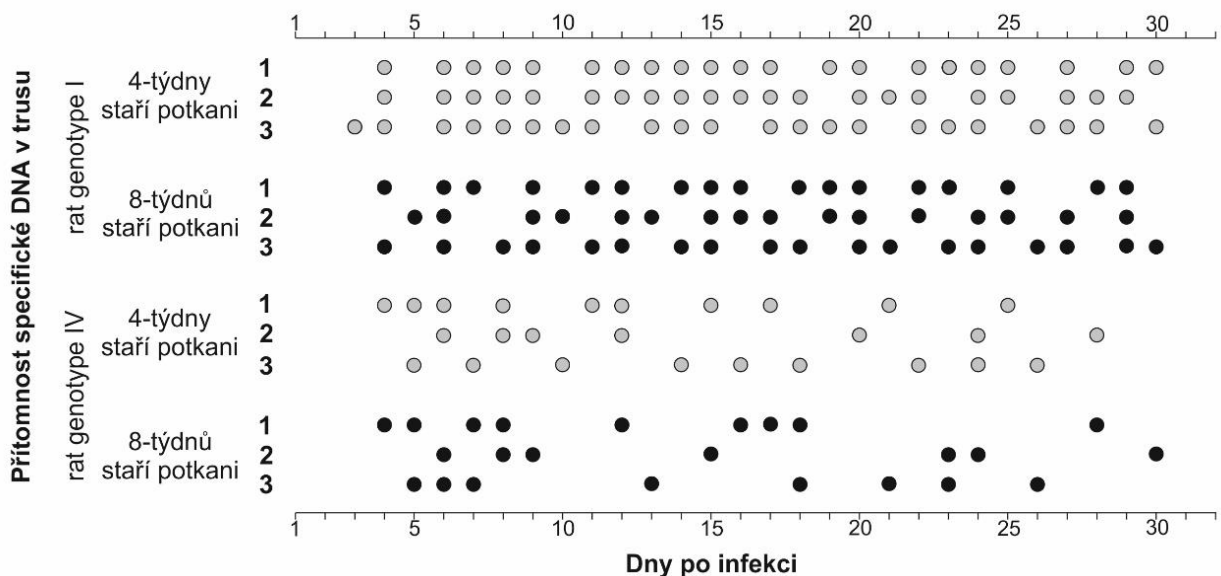
5.3.1 Hostitelská specifita

Vzhledem k nízkému množství získaných životaschopných oocyst z přirozeně infikovaných hlodavců rodu *Rattus* byla hostitelská specifita experimentálně testována pouze u *Cryptosporidium* rat genotype I a *Cryptosporidium* rat genotype IV. Výsledky sledování experimentálních pokusů prokázaly, že *Cryptosporidium* rat genotype I a *Cryptosporidium* rat genotype IV bylo infekční pouze pro laboratorní potkany (*Rattus norvegicus*). Mikroskopické ani molekulární vyšetření trusu infikovaných BALB/c myši (*Mus musculus*) a pískomilů mongolských (*Meriones unguiculatus*) neprokázalo přítomnost oocyst v trusu ani jejich specifickou DNA.

5.3.2 Průběh infekce

První záchyt specifické DNA u potkanů infikovaných *Cryptosporidium* rat genotype I byl 3. den po infekci (DPI). Oocysty nebyly mikroskopicky detekovány. U potkanů infikovaných izolátem *Cryptosporidium* rat genotype IV byl první záchyt DNA 4. DPI. Ani v tomto případě nebyly oocysty mikroskopicky detekovány. Specifická DNA byla v obou případech detekována intermitentně pomocí PCR (obrázek 7). Průběh infekce u 4 a 8 týdnů starých laboratorních potkanů se nelišil.

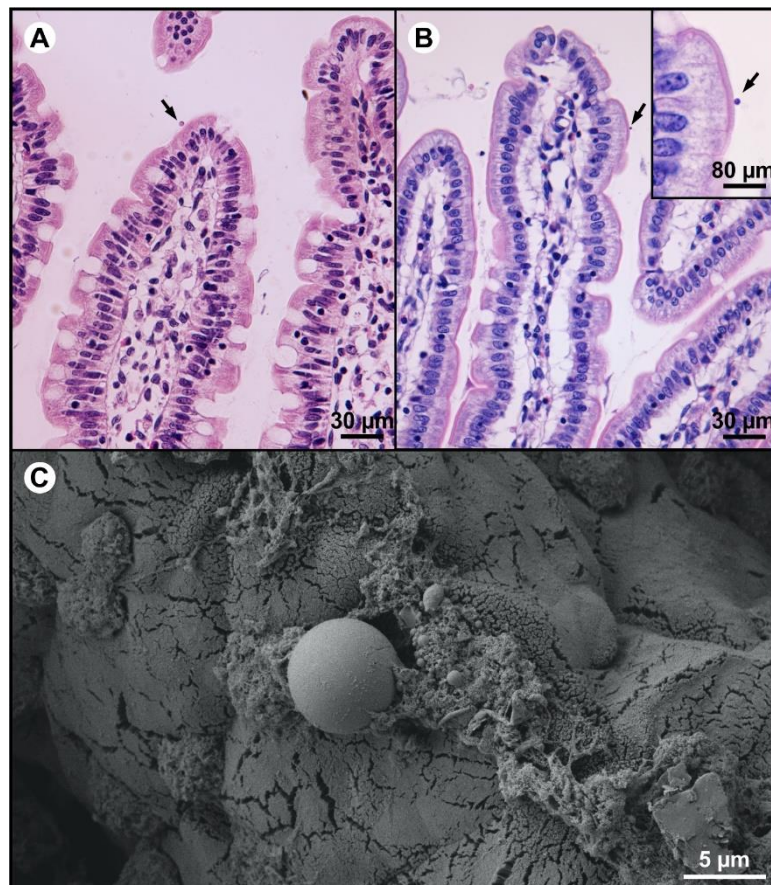
Obrázek 7: Průběh infekce *Cryptosporidium* rat genotype I a *Cryptosporidium* rat genotype IV na základě molekulární detekce specifické DNA kryptosporidií.



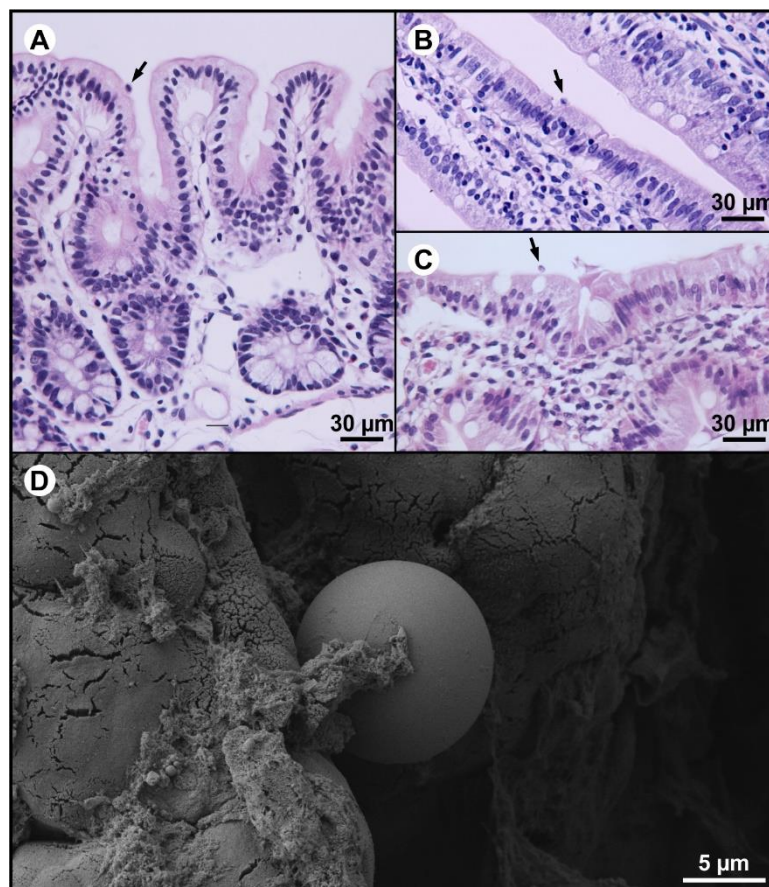
5.3.3 Klinické příznaky a patogenita

U žádného z pokusných zvířat nebyly pozorovány žádné klinické příznaky kryptosporidiózy. Zvířata neměla průjem, inapetenci, nebyla dehydratovaná, unavená ani malátná. U potkanů infikovaných *Cryptosporidium* rat genotypu I nebo *Cryptosporidium* rat genotypu IV nebyly pozorovány žádné histopatologické změny v důsledku infekce vyvolané těmito genotypy kryptosporidií. Oba genotypy byly detekovány na střevním epitelu jejunum a ilea (obrázky 8 a 9). Ojedinele byla pozorována edematózně prosáklá lamina propria, nicméně tyto změny nesouvisely s infekcí kryptosporidiemi. U infekce *Cryptosporidium* rat genotypu I bylo pozorováno mírné zmnožení pohárkových buněk na infikovaných klcích v zadní části ilea.

Obrázek 8: Přítomnost vývojových stádií *Cryptosporidium* rat genotypu I (šipka) na slizničním epitelu jejunum u laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) detekované A) a B) v histologických řezech barvených hematoxylin eosinem, C) skenovacím elektronovým mikroskopem.



Obrázek 9: Přítomnost vývojových stádií *Cryptosporidium* rat genotype IV (šipka) na slizničním epitelu jejunum u laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) detekované **A-C)** v histologických řezech barvených hematoxylin eosinem, **D)** skenovacím elektronovým mikroskopem.



6 DISKUSE

Hlodavci, krysy a potkani především, jsou považováni za potenciální přenašeče celé řady původců onemocnění významných pro člověka. Jedná se zejména o bakteriální onemocnění, jako jsou leptospiróza, salmonelóza, tuberkulóza, tularémie, tyfus a další (Evangelista 2010; Hilton a kol. 2002; Lecuit 2007; Webster a Macdonald 1995; Zhan a kol. 2009). U hlodavců rodu *Rattus* byli detekováni i původci parazitárních onemocnění včetně kryptosporidií (Franssen a kol. 2016; Zhao a kol. 2015).

V této práci byl sledován výskyt kryptosporidií v různých populacích hlodavců rodu *Rattus*. Kryptosporidie se ve většině studií vyskytují s rozdílnou prevalencí. Procento pozitivních zvířat v této studii bylo 13,6 %. Naše výsledky nejvíce odpovídají studiím, které provedli Iseki (1986), Yamaura a kol. (1990), Chaochao a kol. (2009), Papparini a kol. (2012) a Zhao a kol. (2015), kteří detekovali kryptosporidie u 8,2–14,8 % hlodavců rodu *Rattus*. Naopak nižší prevalence v rozpětí 3,2–6,6 % byla zjištěna ve studiích Saki a kol. (2016), Seok a kol. (2005) a Prasetyo (2016). Vyšší prevalence byly popsány ve studiích Kimura a kol. (2007), Silva a kol. (2013), Ng-Hublin a kol. (2013) a Gholipoury a kol. (2016), konkrétně 28,1–38 %. Pouze ve studii z roku 1995 byla na základě mikroskopických metod popsána výrazně vyšší prevalence u potkanů, která byla 63 % (Webster a Macdonald 1995). Promořenost zvířat v jednotlivých studiích může být ovlivněna řadou faktorů, zejména lokalitou a hustotou populace, ze kterých byly vzorky získány nebo použitými metodami. Prevalence může být také ovlivněna věkem, imunitou hostitele, roční dobou a řadou dalších faktorů (Gatti a kol. 2017; Petersen a kol. 2015).

Fylogenetická analýza založená na částečných sekvencích 18S rDNA prokázala přítomnost 9 geneticky odlišných skupin sekvencí. Jednotlivé skupiny sekvencí získané v této práci klastrovaly do dobře podpořených skupin s dříve popsanými druhy nebo genotypy kryptosporidií. Taktéž fylogenetická analýza založená na částečných sekvencích genu kódujícího aktin prokázala přítomnost 9 dobře podpořených skupin sekvencí. Nicméně některé izoláty, které v analýze 18S rDNA klastrovaly ke *Cryptosporidium* rat genotype II, klastrovaly v analýze pro aktin gen se sekvencemi *Cryptosporidium* rat genotype III. Tyto výsledky odpovídají studii z Filipín, kde byla taktéž popsána velmi nízká vnitrodruhová variabilita aktinového lokusu u genotypů II a III (Ng-Hublin a kol. 2013). Na rozdíl od našich výsledků Ng-Hublin a kol. získali sekvence 18S rDNA z *Cryptosporidium* rat genotype III, které však vytvářely dobře

podpořenou skupinu spolu s *Cryptosporidium* rat genotype II. Nicméně v rámci jejich studie nebyly získány žádné aktinové sekvence *Cryptosporidium* rat genotype II. Námi provedená analýza prokázala 95,5–99,8% podobnost genu pro aktin u námi získaných genotypů II a III. Sekvence aktinu genotypu III ze studie Ng-Hublin a kol. (2013) je z 99,7 % shodná se sekvencí rat genotype II (JX294376). Vzájemná podobnost 18S rDNA námi získaných sekvencí rat genotype II a III byla 97,2%. Vnitrodruhová variabilita v sekvencích 18S rDNA kryptosporidií je poměrně častá. Bylo prokázáno, že v genomu kryptosporidií, stejně jako u jiných apikomplex (*Plasmodium*), jsou přítomny odlišné paralogní kopie tohoto genu (El-Sherry a kol. 2013; Le Blancq a kol. 1997; McCutchan a kol. 1988; Nishimoto a kol. 2008; Qari a kol. 1994; Stenger a kol. 2015). Bylo prokázáno, že při použití pouze sekvencí 18S rDNA pro odvození evolučních vztahů mezi kryptosporidii může vést k chybným závěrům (Stenger a kol. 2015). Proto je nutné použít další polymorfní lokusy, jako je například aktin a další geny pro fylogenetické analýzy (Tang a kol. 2016). Přítomnost aktinových sekvencí *Cryptosporidium* rat genotype III ve vzorcích, které byly na 18S rDNA genotypovány jako *Cryptosporidium* rat genotype II lze vysvětlit dvěma způsoby. Zaprvé, mohlo se jednat o smíšenou infekci, které nebývají u kryptosporidií neobvyklé a *Cryptosporidium* rat genotypy II a III se často vyskytují společně. Druhým vysvětlením je, že se jedná o jeden druh kryptosporidie s vysokou vnitrodruhovou variabilitou v 18S rDNA, která byla popsána například u *Cryptosporidium* chipmunk genotype II nebo *C. hominis* (Stenger a kol. 2015; Ukwah a kol. 2017). Vzhledem k absenci dalších genetických markerů, například genů kódujících HSP70 (Heat shock protein 70), COWP (*Cryptosporidium* oocyst wall protein), nebo TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein 1), nelze s jistotou určit, zda se jedná o dva samostatné taxony.

Kryptosporidie jsou často označovány za původce průjmových onemocnění zvířat a člověka, zejména infekce vyvolané druhem *C. parvum* u telat a člověka nebo druhem *C. hominis* u člověka (Chappell a kol. 2015; Johansen a kol. 2014; Kváč a kol. 2013; Morgan-Ryan a kol. 2002; Naciri a kol. 1999; Pettoelo-Mantovani a kol. 1995). Nicméně kryptosporidiové infekce způsobené především úzce hostitelsky specifickými druhy s nízkou intenzitou infekce nejsou spojovány s klinickými příznaky. Například infekce vyvolaná druhem *C. tyzzeri* není doprovázena žádnými průjmovými stavy a to jak u imunokompetentních, tak i imunodeficitních myší, pro které je tento druh hostitelsky specifický (Kváč a kol. 2013b). Dalšími z mnoha příkladů mohou být

infekce vyvolané *C. suis* a *C. scrofarum* u prasat (Kváč a kol. 2013a; Ryan a kol. 2004), *C. rubeyi*, ground squirrel genotype I, II a III u stromových a zemních veverek (Li a kol. 2015; Stenger a kol. 2015) nebo *C. testudinis* a *C. ducismarci* u suchozemských želv (Ježková a kol. 2016). V námi provedené studii nebyly pozorovány žádné průjmové stavy vyvolané *Cryptosporidium* rat genotype I a IV jak u přirozeně, tak experimentálně infikovaných potkanů. Tyto výsledky se plně shodují s publikovanými údaji (Kimura a kol. 2007; Ng-Hublin a kol. 2013). Taktéž naše a dříve publikované výsledky naznačují, že infekce vyvolané *Cryptosporidium* rat genotype II a III nejsou doprovázeny klinickými příznaky (Chaochao a kol. 2009; Ng-Hublin a kol. 2013; Silva a kol. 2013). Vyjma *Rattus* specifických genotypů, byly v naší a dalších studiích detekovány druhy a genotypy, které jsou buď hostitelsky specifické pro jiné druhy obratlovců, nebo mají širokou hostitelskou specifitu. Žádná z dosud publikovaných studií včetně této neuvádí souvislost mezi průjmovými onemocněními hlodavců rodu *Rattus* a kryptosporidiovou infekcí vyvolanou dalšími druhy a genotypy. V této práci byly v souladu s dříve uveřejněnými studiemi detekovány ojedinělé nálezy *C. muris* (Ng-Hublin a kol. 2013; Silva a kol. 2013; Zhao a kol. 2015). Vzhledem k tomu, že infektivita tohoto druhu byla pro potkany a krysy experimentálně ověřena a *C. muris* je infekční pro celou řadu hlodavců (Kváč a kol. 2012; Murakoshi a kol. 2013), lze považovat tento nález za očekávaný. S ohledem na potravní strategii a způsob života potkanů a krys nejsou ojedinělé nálezy dalších druhů a genotypů kryptosporidií jak v této, tak dalších studiích překvapující. Dosud nevyřešenou otázkou však zůstává, zda přítomnost specifické DNA těchto parazitů (*C. proliferans*, *C. andersoni*, *C. ryanae*, *C. meleagridis*, *C. scrofarum*, *C. serpentis*, *C. tyzzeri* nebo *C. suis*-like) je důsledkem pasivní pasáže oocyst zažívacím traktem hostitele nebo výsledkem probíhající infekce. Obdobně nelze plně posoudit vnímavost myši ke *Cryptosporidium* rat genotype II. Tento genotyp byl v jednom případě detekován u myši (*Mus musculus*) ve studii provedené na hlodavcích v Brazílii (Silva a kol. 2013). Přítomnost hostitelsky nesespecifických druhů kryptosporidií v trusu potkanů a krys lze také hodnotit dle lokality, kde byli hlodavci odchyceni. Například *C. andersoni* a *C. ryanae* bylo získáno z potkanů, kteří byli odchyceni ve stáji, kde byl chován skot, který je typickým hostitelem těchto kryptosporidií. Obdobně *C. suis*-like bylo nalezeno u potkana ze stáje pro prasata. Z výsledků této i ostatních studií lze usuzovat, že *Cryptosporidium* rat genotype I-IV jsou hostitelsky specifické pro hlodavce rodu *Rattus*, což částečně potvrdily i naše experimentální infekce.

Průběh infekce je závislý na celé řadě faktorů, zejména na věku a stavu imunitního systému hostitele (Baishanbo a kol. 2005; Kváč a kol., 2013a; Lindsay a Blagburn, 1990; Pereira a kol. 2002). Většina autorů se shoduje, že pohlaví a infekční dávka nemá zásadní vliv jak na prepatentní, tak patentní periodu (Rhee a kol. 1995; Tarazona a kol. 1998; Zambriski a kol. 2013), nicméně například Matsui a kol. (1999) popsal vliv nízké infekční dávky *C. muris* na prodloužení prepatentní periody u myši. Prepatentní perioda se v závislosti na druhu a genotypu kryptosporidií pohybuje od 3 do 26 dní po infekci (Vítovec a kol. 2006). Pro střevní druhy kryptosporidií, zejména ty, které infikují tenké střevo savců, je typická krátká prepatentní doba. Například *C. parvum* u telat je vylučováno po 2-7 dnech (Tzipori 1983), *C. tyzzeri* u myši po 4-7 dnech (Kváč a kol. 2013b), *C. xiaoi* u ovcí po 7-8 dnech (Fayer a Santín 2009) nebo *C. scrofarum* po 4-6 dnech u prasat (Kváč a kol. 2013a). Obdobně délka prepatentní periody *Cryptosporidium* rat genotypu I a IV, které infikují tenké střevo potkanů a krys, byla 3-4 dny, respektive 4-6 dnů. Do současné doby nebyly provedeny žádné studie, které by se zabývaly průběhem infekce některého z tzv. rat genotypů, proto není možné porovnávat naše výsledky s jinými autory.

Taktéž délka patentní periody je velmi variabilní; v řadě případů dochází k tzv. self-cure jevu, kdy dojde k samovyléčení jedince (DuPont a kol. 1995; Enemark a kol. 2003; Matsui a kol. 1999; Tzipori 1983). Tento fenomén je velmi často popisován u imunokompetentních pacientů infikovaných druhy *C. parvum*, *C. hominis* nebo *C. meleagridis* v souvislosti s explozivními průjmovými stavy (Ghoshal a kol. 2016; Ng-Hublin a kol. 2013; Ukwah a kol. 2017). Naopak u celé řady druhů a genotypů kryptosporidií jako například *C. testudinis*, *C. avium*, *C. bovis*, které jsou úzce hostitelsky specifické, jsou často popisovány dlouhodobé až celoživotní infekce charakteristické intermitentním vylučováním malého množství oocyst s absencí klinických příznaků a patologických změn na sliznici infikovaných tkání (Fayer a kol. 2005; Holubová a kol. 2016; Ježková a kol. 2016). Shodný průběh infekce byl v této práci pozorován u potkanů experimentálně infikovaných *Cryptosporidium* rat genotypu I nebo IV. V obou případech byla popsána patentní perioda delší než 30 dní. Taktéž pitva a následné histopatologické vyšetření neprokázalo žádné makroskopické ani patologické změny na sliznici infikovaných částí tenkého střeva.

V této práci jsme ukázali, že oocysty *Cryptosporidium* rat genotypu I jsou nepatrně menší než oocysty *Cryptosporidium* rat genotypu IV, nicméně velikost oocyst se překrývá. Navíc velikost oocyst *Cryptosporidium* rat genotypu II a III nebo druhu

C. parvum, které byly často detekovány v řadě studií včetně této, je shodná jak mezi sebou navzájem, tak s výše jmenovanými genotypy (Chaocaho a kol. 2009). Tyto výsledky plně potvrzují skutečnost, že většinu kryptosporidií nelze taxonomicky odlišovat na základě morfometrie oocyst (Chaochao a kol. 2009; Feng a kol. 2011).

Přestože jsou potkani parazitováni převážně hostitelsky specifickými genotypy, mohou být hostiteli celé řady dalších, často zoonotických druhů kryptosporidií (Bahrami a kol. 2012; Kimura a kol. 2007; Ng-Hublin a kol. 2013). Vzhledem k tomu, že oocysty kryptosporidií si i po průchodu zažívacím traktem nevnímavého hostitele zachovávají svou infektivitu (Graczyk a kol. 1996), představují potkani a krysy s ohledem na jejich celosvětové rozšíření a způsob života ideální pasivní přenašeče pro šíření kryptosporidií. Nicméně z výsledků této a dalších studií je zřejmé, že hlodavci rodu *Rattus* nepředstavují významné riziko pro přenos patogenních druhů kryptosporidií na člověka.

7 ZÁVĚRY

- Bylo detekováno 5 druhů (*C. andersoni*, *C. muris*, *C. proliferans*, *C. ryanae* a *C. serpentis*) a 5 genotypů (*C. suis*-like a *Cryptosporidium* rat genotype I-IV) kryptosporidií infikujících hlodavce rodu *Rattus*.
- Byl popsán průběh infekce u *Cryptosporidium* rat genotype I a *Cryptosporidium* rat genotype IV u potkanů (*Rattus norvegicus*).
- *Cryptosporidium* rat genotype I a IV nejsou infekční pro laboratorní myši BALB/c (*Mus musculus*) ani pískomily mongolské (*Meriones unguiculatus*).
- *Cryptosporidium* rat genotype I a IV nezpůsobují klinické onemocnění potkanů.
- *Cryptosporidium* rat genotype II a III byly dosud detekovány pouze v Asii, na Novém Zélandě a v Jižní Americe.
- *Cryptosporidium* rat genotype I a IV jsou rozšířeny celosvětově.
- Hlodavci rodu *Rattus* nepředstavují významné riziko pro přenos patogenních druhů kryptosporidií na člověka.

8 LITERATURA

- Alvarez-Pellietro P., Sitja-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: 1007-1021.
- Anderson B. C. (1987):** Abomasal cryptosporidiosis in cattle. Veterinary Clinical Pathology, 24: 235-238.
- Aplin K. P., Chesser T., Ten Have J. (2003):** Evolutionary biology of the genus *Rattus*: profile of an archetypal rodent pest. In: Singleton G. R., Hinds L. A., Krebs C. J., Spratt D. M., editors. Rats, mice and people: rodents biology and management. Canberra: Australian Centre for International Agriculture Research. pp. 560.
- Arrowood M.J., Sterling C.R. (1987):** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. The Journal of Parasitology, 73: 314-319.
- Aydin Y. (1997):** The ultrastructure of the parasite and the mucus cell relationship and endogenous stages of *Cryptosporidium muris* in the stomach of laboratory mice. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 23: 117-125.
- Bahrami F., Sadraei J., Frozandeh M. (2012):** Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. In Wild Rats of Tehran, Iran Using 18S rRNA Gene and PCR_RFLP Method. Jundishapur Journal of Microbiology, 5: 486-490.
- Baishanbo A., Gargala G., Delaunay A., Francois A., Ballet J.J., Favennec L. (2005):** Infectivity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* genotype 2 isolates in immunosuppressed Mongolian gerbils. Infection and immunity, 73: 5252-5255.
- Bedford N.L., Hoekstra H.E. (2015):** The Natural History Of Model Organisms: *Peromyscus* mice as a model for studying natural variation. eLife, 4: e06813.
- Blunt D.S., Khramtsov N.V., Upton S.J., Montelone B.A. (1997):** Molecular Karyotype Analysis of *Cryptosporidium parvum*: Evidence for Eight Chromosomes and a Low-Molecular-Size Molecule. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 4: 11-13.
- Carreno R.A., Martin D.S., Barta J.R. (1999):** *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis

of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, 85: 899-904.

- Cavalier-Smith T. (2014):** Gregarine site-heterogenous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology*, 50: 472-495.
- Chaochao L., Zhang L., Wang R., Jian F., Zhang S., Ning C., Wang H., Feng C., Wang X., Ren X., Qi M., Xiao L. (2009):** *Cryptosporidium* spp. In Eild, Laboratory, and Pet Rodents in China: Prevalence and Molecular Characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 7692-7699.
- Chappell C.L., Okhuysen P.C., Langer-Curry R.C., Lupo P.J., Widmer G., Tzipori S. (2015):** *Cryptosporidium muris*: infectivity and illness in healthy adult volunteers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92: 50-55.
- Cowan D.P., Quy R.J., Lambert M.S. (2003):** Ecological perspectives on the management of commensal rodents. *ACIAR Monograph series*, 96: 433-439.
- Current W.L., Upton S.J., Haynes T.B. (1986):** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology*, 33: 289-296.
- Current W.L., Reese N.C. (1987):** A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *Journal of Eucaryotic Microbiology*, 33: 98-108.
- Current W.L., Garcia L.S. (1991):** Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 325-358.
- 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. *The New England Journal of Medicine*, 332: 855-859.
- El-Sherry S., Ogedengbe M.E., Hafeez M.A., Barta J.R. (2013):** Divergent nuclear 18S rDNA paralogs in a turkey coccidium, *Eimeria meleagridis*, complicate molecular systematics and identification. *International journal for parasitology*, 43: 679-685.
- Elwin K., Hadfield S.J., Robinson G., Crouch N.D., Chalmers R.M. (2012):** *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *International Journal for Parasitology*, 42: 675-682.

- Enemark H.L., Ahrens P., Bille-Hansen V., Heegaard P.M., Virge H., Thamsborg S.M., Lind P. (2003):** *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the 'porcine' genotype. *Parasitology*, 126: 407-416.
- Evangelista K.V. (2010):** *Leptospira* as an emerging pathogen: A review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiology*, 5: 1413-1425.
- Fayer R., Ungar B.L.P. (1986):** *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiology Reviews*, 50: 458-483.
- Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P. (1997):** The general biology of *Cryptosporidium*: In: Fayer R. (Ed.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Chemical Rubber Company Press. pp. 2-33.
- Fayer R., Morgan U., Upton S.J. (2000):** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30: 1305-1322.
- Fayer R., Trout J.M., Xiao L., Morgan U.M., Lai A.A., Dubey J.P. (2001):** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*, 87: 1415-1422.
- Fayer R. (2003):** *Cryptosporidium*: From molecules to disease. In: Thompson R.C.A., Armson A., Ryan U.M. (Eds.): *Cryptosporidium*: From molecules to disease. Elsevier. pp. 11-18.
- Fayer R. (2004):** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126: 37-56.
- Fayer R., Santín M., Xiao L. (2005):** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology*, 91: 624-649.
- Fayer R., Santín M., Trout J.M. (2008):** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156: 191-198.
- Fayer R. a Santín M. (2009):** *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, 164: 192-200.
- Feng Y., Li N., Duan L., Xiao L. (2009):** *Cryptosporidium* Genotype and Subtype Distribution in Raw Wastewater in Shanghai, China: Evidence for Possible Unique *Cryptosporidium hominis* Transimssion. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 153-157.
- Feng Y., Yang W., Ryan U., Zhang L., Kvač M., Koudela B., Modrý D., Li N., Fayer R., Xiao L. (2011):** Development of a multilocus sequence tool for typing

Cryptosporidium muris and *Cryptosporidium andersoni*. Journal of Clinical Microbiology, 49: 34-41.

- Franssen F., Swart A., van Knapen F., van der Giessen J. (2016):** Helminth parasites in black rats (*Rattus rattus*) and brown rats (*Rattus norvegicus*) from different environments in the Netherlands. Infection ecology and epidemiology, 17: e31413.
- Galef B.G., Allen C. (1995):** A new model system for studying behavioural traditions in animals. Animal Behaviour, 50: 705-717.
- Gatti F.A., Ceolan E., Greco F.S., Santos P.C., Klafke G.B., Oliveira G.R., Groll A., Martinez A.M., Goncalves C.V., Scaini C.J. (2017):** The prevalence of trichomoniasis and associated factors among women treated at a university hospital in southern Brazil. PLOS One, 12: e0173604.
- Gholipoury M., Rezai H.R., Namroodi S., Arab Khazaeli F. (2016):** Zoonotic and Non-zoonotic Parasites of Wild Rodents in Turkman Sahra, Northeastern Iran. Iranian Journal of Parasitology, 11: 350-357.
- Ghoshal U., Dey A., Ranjan P., Khanduja S., Agarwal V., Ghoshal U.C. (2016):** Identification of opportunistic enteric parasites among immunocompetent patients with diarrhoea from Northern India and genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Microsporidia*. Indian journal of medical mikrobiology, 34: 60-66.
- Goebel E., Braendler U. (1982):** Ultrastructure of microgametogenesis, microgametes and gametogamy of *Cryptosporidium* spp. in the small intestine of mice. Protistology, 18: 331-344.
- Goodstein R.F., Colombo C.S., Illefelder M.A., Skaggs R.E. (1989):** Bronchial and gastrointestinal cryptosporidiosis in AIDS. The Journal of the American Osteopathic Association, 89: 195-197.
- Graczyk T.K., Cranfield M.R., Fayer R., Anderson M.S. (1996):** Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. Applied and environmental microbiology, 62: 3234-3237.
- Havrdová N. (2016):** Laparotomické infekce hostitelů střevními a žaludečními kryptosporidii. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. 76 pp.
- Hedrich H.J. (2000):** History, Strains and Models. In Krinke G.J., Buton T., editors. The laboratory Rat (Handbook of Experimental Animals). London: Academic Press. pp. 1871-1895.

- Henriksen S.A., Pohlenz J.F.L. (1981):** Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22: 594-596.
- Hilton A.C., Wills R.J., Hickie S.J. (2002):** Isolation of *Salmonella* from urban wild brown rats (*Rattus norvegicus*) in the West Midlands, UK. *International Journal of Environmental Health Research*, 12: 163-168.
- Holubová N., Sak B., Horčíčková M., Hlásková L., Květoňová D., Menchaca S., McEvoy J., Kváč M. (2016):** *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Birds. *Parasitological Research*, 115: 2243-2251.
- Houpte R., Bushen O.Y., Sam N.E., Kohli A., Asgharpour A., Ng C.T., Calfee D.P., Guerrant R.L., Maro V., Ole-Nguyaine S., Shao J.F. (2005):** Short report: Asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 520-522.
- Ifeonu O.O., Simon R., Tennant S.M., Sheoran A.S., Daly M.C., Felix V., Kissinger J.C., Widmer G., Levinne M.M., Tzipori S., Silva J.C. (2016):** *Cryptosporidium hominis* gene catalog: a resource for the selection of novel *Cryptosporidium* vaccine candidates. *Database: the journal of biological databases and curation*. pp. 137.
- Iseki M. (1979):** *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the Domestic cat. *Japanese Journal of Parasitology*, 28: 285-307.
- Iseki M. (1986):** Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Japanese Journal of Parasitology*, 35: 251-256.
- Iseki M., Maekawa T., Moriya K., Uni S., Takada S. (1989):** Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitology Research*, 75: 218-222.
- Jenkins M.B., Eaglesham B.S., Anthony L.C., Kachlany S.C., Bowman D.D., Ghirese W.C. (2010a):** Significance of wall structure, macromolecular composition, and surface polymers to the survival and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 1926-1934.
- Ježková J., Horčíčková M., Hlásková L., Sak B., Květoňová D., Novák J., Hofmannová L., McEvoy J., Kváč M. (2016):** *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium* tortoise genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitologica*, 63: 035.

- Jiang J., Alderisio K.A., Xiao L. (2005):** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. Applied and environmental microbiology, 71: 4446-4454.
- Jin C., Qin D., Pan W., Wang Y., Zhang Y., a kol. (2008):** Micromammals of the Giantopithecus fauna from Sanhe Cave, Chongzuo, Guangxi. Quaternary Sciences, 28: 1129-1137.
- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Krížek J., Modrý D., Šlapeta J. (2008):** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. Folia Parasitologica, 55: 81-94.
- Johansen O.H., Hanevik K., Thrana F., Carlson A., Stachurska-Hagen T., Skaare D., Robertson L.J. (2014):** Symptomatic and asymptomatic secondary transmission of *Cryptosporidium parvum* following two related outbreaks in schoolchildren. Epidemiology and Infection, 30: 1-8.
- Katsumata T., Hosea D., Ranuh I.G., Uga S., Yanagi T., Kohno S. (2000):** Short report: Possible *C. muris* infection in humans. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 62: 70-72.
- Kimura A., Edagawa A., Okada K., Takimoto A., Yonesho S., Karanis P. (2007):** Detection and genotyping of *Cryptosporidium* from brown rats (*Rattus norvegicus*) captured in an urban area of Japan. Parasitology Research, 100: 1417-1420.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. (2007):** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). Veterinary Parasitology, 143: 229-233.
- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Secor W.E. (2009d):** Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Veterinary Parasitology, 163: 33-38.
- Kváč M., Kestřánová M., Květoňová D., Kotková M., Ortega Y., McEvoy J., Sak B. (2012):** *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. Experimental parasitology, 131: 107-110.
- Kváč M., Kestřánová 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*). Veterinary Parasitology, 31: 218-227.

- Kváč M., McEvoy J., Loudová M., Stenger B., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Rašková V., Moriarty E., Rost M., Macholán M., Piálek J. (2013b):** Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *International Journal for Parasitology*, 43: 805-817.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., McEvoy J., Vítovec J., Rost M., Sak B. (2013c):** The Lesser Egyptian Gerbil (*Gerbillus gerbillus*) is a suitable host for the long-term propagation of *Cryptosporidium andersoni*. *Experimental Parasitology*, 134: 438-442.
- Kváč M., Saková K., Květoňová D., Kicia M., Weselovska M., McEvoy J., Sak B. (2014):** Gastroenteritis caused by the *Cryptosporidium* hedgehog genotype in a immunocompetent man. *Journal of Clinical Microbiology*, 52: 347-349.
- Kváč M., Hofmannová L., Hlásková L., Květoňová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B. (2014):** *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology*, 201: 9-17.
- Kváč M., Havrdová N., Hlásková L., Daňková T., Kanděra J., Ježková J., Vítovec J., Sak B., Ortega Y., Xiao L., Modrý D., Chelladurai J.R., Prantlová V., McEvoy J. (2016):** *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of Mammals. *PLOS One*, 11: e0147090.
- Le Blancq S.M., Khramtsov N.V., Zamani F., Upton S.J., Wu T.W. (1997):** Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and biochemical parasitology*, 90: 463-478.
- Lecuit M. (2007):** Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection*, 9: 1216-1225.
- Levine N.D. (1980):** Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology*, 66: 830-834.
- Li N., Xiao L., Alderisio K., Elwin K., Cebelinski E., Chalmers R., Santin M., Fayer R., Kváč M., Ryan U., Sak B., Stanko M., Guo Y., Wang L., Zhang L., Cai J., Roelling D., Feng Y. (2014):** Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a Zoonotic Pathogen Emerging in Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 20: 217-224.
- Li X., Pereira M., Larsen R., Xiao C., Phillips R., Striby K., McCowan B., Atwill E.R. (2015):** *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae)

in multiple Spermophilus ground squirrel species. International journal for parasitology, Parasites and wildlife, 4: 343-350.

Lin X.D., Guo W.P., Wang W., Zou Y., Hao Z.Y., a kol. (2011): Migration of norway rats resulted in the worldwide distribution of scoul hantavirus today. Journal of Virology, 86: 972-981.

Lindsay D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R., Blagburn B.L. (2000): *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 47: 91-95.

Lindsay D.S., Blagburn B.L. (1990): Cryptosporidiosis in birds In: Dubey J.P., Speer C.A., Fayer R. (Ed.): Cryptosporidiosis in Man and Animals. CRC Press, Boca Raton. pp. 133-148.

Lindsay D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R., Blagburn B.L. (2000): *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 47: 91-95.

Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2000): 100 of the world's worst invasive alien species a selection from the global invasive species database. Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), *Aliens*, 12: 12 pp.

Lydekker R. (1896): A hand-book to the British mammalia. London: Edward Lloyd.

Macher A. M. (1988): The pathology of AIDS. Public Health Reports, 103: 246-254.

Mafft [online]: [cit. 2017-18-3]. Dostupné z: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>.

Matsui T., Fujino T., Tsuji M. (1999): Infectivity to hosts of the endogenous stages of chicken and murine *Cryptosporidium*. Journal of Veterinary Medical Science, 61: 471-474.

McCutchan T.F., de la Cruz V.F., Lal A.A., Gunderson J.H., Elwood H.J., Soqin M.L. (1988): Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. Molecular and biochemical parasitology, 28: 63-68.

Melicharová J., Ilgová J., Kváč M., Sak B., Koudela B., Valigurová A. (2014): Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitisation. Parasitology, 141: 287-303.

Miláček P., 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: 50.

- Morgan-Ryan U.M., Fall A., Ward L.A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R.C., Olson M., Lal A., Xiao L. (2002):** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 49: 433-440.
- Murakoshi F., Fukuda Y., Matsubara R., Kato Y., Sato R., Sasaki T., Tada C., Nakai Y. (2013):** Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. Veterinary parasitology, 196: 184-188.
- Musser G.G., Carleton M.D. (1993):** Family Muridae in Wilson D.E and Reeder D.M. eds: Mammal Species of the World a Taxonomic and Geographic Reference. Washington, D.C. Smithsonian Institution Press. pp. 501-755.
- Naciri M., Lefay M.P., Mancassola R., Poirier P., Chermette R. (1999):** Role of *Cryptosporidium parvum* as a patogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. Veterinary Parasitology, 85: 245-257.
- Ng-Hublin J.S., Combs B., Mackenzie B., Ryan U. (2013):** Human cryptosporidiosis diagnosed in Western Australia: a mixed infection with *Cryptosporidium meleagridis*, the *Cryptosporidium* mink genotype, and unknown *Cryptosporidium* species. Journal of clinical microbiology, 51: 2463-2465.
- Ng-Hublin J.S.Y., Singleton G.R., Ryan U. (2013):** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rats and mice from rural communities in the Philippines. Infection, Genetics and Evolution, 16: 5-12.
- Nishimoto Y., Arisue N., Kawai S., Escalante A.A., Horii T., Tanabe K., Hashimoto T. (2008):** Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. Molecular phylogenetics and evolution, 47: 45-53.
- O' Donoghue P.J. (1995):** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. International Journal for Parasitology, 25: 139-195.
- Paparini A., Jackson B., Ward S., Young S., Ryan U.M. (2012):** Multiple *Cryptosporidium* genotypes detected in wild black rats (*Rattus rattus*) from northern Australia. Experimental Parasitology, 131: 404-412.
- Pavlásek I., Ryan U. (2008):** *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. Experimental Parasitology, 118: 434-437.
- Pereira M.D., Atwill E.R., Barbosa A.P., Silva S.A., García-Zapata M.T. (2002):** Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goniania, Goliás, Brazil. The American journal of tropical medicine and hygiene, 66: 787-793.

- Petersen H.H., Jianmin W., Katakam K.K., Mejer H., Thamsbog S.M., Dalsgaard A., Olsen A., Enemark H.L. (2015):** *Cryptosporidium* and *Giardia* in Danish organic pig farms: Seasonal and age-related variation in prevalence, infection intensity and species/genotypes. *Veterinary parasitology*, 214: 29-39.
- Pettoello-Mantovani M., Di Martino L., Dettori G., Vajro P., Scotti S., Ditullio M.T., Guandalini S. (1995):** Asymptomatic carriage of intestinal *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunodeficient children: A prospective study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 14: 1042-1047.
- Pospischil A., Stiglmeier M.T., Hegel G., Wiener H. (1987):** Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Veterinary Record*, 112: 379-380.
- Power M.L., Ryan U.M. (2008):** A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *Journal of Parasitology*, 94: 1114-1117.
- Prasetyo R.H. (2016):** Survey of house rat intestinal parasites from Surabaya district, East Java, Indonesia that can cause opportunistic infections in humans. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 47: 194-198.
- Pubmed [online]:** [cit. 2017-7-2]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
- Qari S.H., Goldman I.F., Pieniazek N.J., Collins W.E., Lal A.A. (1994):** Blood and sporozoite stage-specific small subunit ribosomal RNA-encoding genes of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene*, 150: 43-49.
- Rašková V., Květoňová D., Sak B., McEvoy J., Edwinston A., Stenger B., Kváč M. (2013):** Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *Journal of Clinical Microbiology*, 51: 360-362.
- Reid F. (2006):** *A Field Guide to Mammals of North America*. Boston: Houghton Mifflin. pp. 368.
- Reina F.T., Ribeiro C.A., Araújo R.S., Matté M.H., Castanho R.E., Tanaka I.I., Viggiani A.M., Martins L.P. (2016):** Intestinal and pulmonary infection by *Cryptosporidium parvum* in two patients with HIV/AIDS. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58: 21
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning C., Jian F., Wang R., Lv C., Wang Q., Arrowood M.J., Xiao L. (2012):** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, 130: 274-281.

- Rhee J.K., Yook S.Y., Park B.K. (1995):** Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in mice. *The Korean Journal of Parasitology*, 33: 377-382.
- Robins J.H., McLenachan P.A., Phillips M.J., Craig L., Ross H.A., Matisoo-Smith E. (2008):** Dating of divergences within the *Rattus* genus phylogeny using whole mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 460-466.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S.J., Katzer F., Bartley P.M., Hunter P.R., Nath M., Innes E.A., Chalmers R.M. (2010):** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, 40: 1539-1548.
- Ryan U.M., Xiao L., Read C., Sulaiman I.M., Monis P., Lal A.A., Fayer R., Pavlasek I. (2003):** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology*, 89: 809-813.
- Ryan U.M., Monis P., Enemark H.L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R.C., Xiao L. (2004):** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*, 90: 769-773.
- Ryan U.M., Power M., Xiao L. (2008):** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal of Eucaryotic Microbiology*, 55: 22-26.
- Ryan U.M., Xiao L. (2014):** Taxonomy and molecular taxonomy. In: Caccio S.M., Widmer G. (Eds.): *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer. New York. pp. 1-22.
- Ryan U.M., Papparini A., Tonq K., Yanq R., Gibson-Kueh S., O'Hara A., Lymbery A., Xiao L. (2015):** *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*, 150: 31-35.
- Saitou N., Nei M. (1987):** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Saki J., Foroutan-Rad M., Asadpouri R. (2016):** Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Wild Rodents of Southwestern Iran Using 18s rRNA Gene Nested-PCR-RFLP and Sequencing Techniques. *Journal of Tropical Medicine*. e6834206.

- Segura R., Prim N., Montemayor M., Valls M.E., Muñoz C. (2015):** Predominant virulent IbA10G2 subtype of *Cryptosporidium hominis* in human isolates in Barcelona: A Five-Year Study. PLoS One. 10: e0121753.
- Seok S., Park J., Cho S., Baek M., Lee H., Kim D., Yang K., Jang D., Han B., Nam K., Park J. (2005):** Health Surveillance of Specific Pathogen-Free and Conventionally-Housed Mice and Rats in Korea. Experimental Animals, 54: 85-92.
- Silva S.O.S., Richtzenhain L.J., Barros I.N., Gomes A.M.M.C., Silva A.V., Kozerski N.D., Ceranto J.B.A., Keid L.B., Soares R.M. (2013):** A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. Experimental Parasitology, 135: 551-557.
- Sréter T., Kovács G., da Silva A.J., Pieniazek N.J., Széll Z., Dobos-Kovács M., Márialigeti K., Varga I. (2000):** Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. Applied and Environmental Microbiology, 66: 735-738.
- Stenger B.L., Clark M.E., Kváč M., Khan E., Giddings C.W., Prediger J., McEvoy J.M. (2015):** North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes. Infection, Genetics and Evolution, 36: 287-293.
- Stenger B.L., Clark M.E., Kváč M., Khan E., Giddings C.W., Dyer N.W., Schultz J.L., McEvoy J.M. (2015):** Highly divergent 18S rRNA gene paralogs in a *Cryptosporidium* genotype from eastern chipmunks (*Tamias striatus*). Infection, Genetics and Evolution, 32: 113-123.
- Sterling C.R., Seegar K., Sinclair N.A. (1986):** *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea. The Journal of Infectious Diseases, 153: 380-381.
- Striepen B. (2013):** Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis. Nature, 503: 189-191.
- Sunnotel O., Snelling W.J., Xiao L., Moule K., Moore J.E., Millar B.C., Dooley J.S., Lowery C.J. (2006):** Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides. The Journal of Clinical Microbiology, 44: 3285-3291.
- Sulaiman I.M., Xiao L., Lal A.A., (1999):** Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. Applied and Environmental Microbiology, 65: 4431-4435.

- Tang Y., Li N., Song M., Roelling D.M., Feng Y., Xiao L. (2016):** Development of a multilocus sequence typing tool for high-resolution subtyping and genetic structure characterization of *Cryptosporidium ubiquitum*. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 45: 256-261.
- Tarazona R., Blewett D.A., Carmona M.D. (1998):** *Cryptosporidium parvum* infection in experimentally infected mice: infection dynamics and effect of immunosuppression. *Folia Parasitologica*, 45: 101-107.
- Thompson R.C.A., Olson M.E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M.S., Hijawi N.S. (2005):** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 59: 77-158.
- Traversa D. (2010):** Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Parasites and Vectors*, 3: 21.
- Turkcepar N., Kutlay S., Nergizoglu G., Atli T., Duman N. (2002):** Prevalence of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. *Nephron*, 90: 344-346.
- Tyzzar 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: 394-414.
- Tyzzar E.E. (1912):** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde*, 26: 394-412.
- Tzipori S. (1983):** Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiology Revue*, 47: 84-96.
- Ukwah B.N., Ezeonu I.F., Ezeonu C.T., Roelling D., Xiao L. (2017):** *Cryptosporidium* species and subtypes in diarrheal children and HIV-infected persons in Ebonyi and Nsukka, Nigeria. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11: 173-179.
- Uni S., Iseki M., Maekawa T., Moriya K., Takada S. (1987):** Ultrastructure of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) parasitizing the murine stomach. *Parasitological Research*, 74: 123-132.
- Valigurová A., Hofmannová L., Koudela B., Vávra J. (2007):** An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *Journal of Eucaryotic Microbiology*, 54: 495-510.

- Valigurová A., Jirků M., Koudela B., Gelnar M., Modrý D., Šlapeta J. (2008):** Cryptosporidia: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *International Journal of Parasitology*, 38: 913-922.
- Verneau O., Catzefflis F., Furano A.V. (1998):** Determining and dating recent rodent speciation events by using L1 (LINE-1) retrotransposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 11284-11289.
- Vetterling J.M., Takeuchi A., Madden P.A. (1971):** Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. *The Journal of Protozoology*, 18: 248-60.
- Vítovec J., Hamadejová K., Landová L., Kváč M., Květoňová D., Sak B. (2006):** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *Journal of Veterinary Medicine*, 53: 239-243.
- Wang L., Xue X., Li J., Zhou Q., Yo Y, Du A. (2014):** Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. *Parasite*, 21: 36.
- Web of knowledge [online]:** [cit. 2017-5-2]. Dostupné z: <https://appswebofknowledge.com>.
- Webster J.P., Macdonald D.W. (1995):** Cryptosporidiosis reservoir in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) in the UK. *Epidemiology and Infection*, 115: 207-209.
- Webster J.P., Macdonald D.W. (1995):** Parasite of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Parasitology*, 111: 247-255.
- Weselowska M., Szostakowska B., Kicia M., Sak B., Kváč M., Knysz B. (2016):** *Cryptosporidium meleagridis* infection: the first report in Poland of its occurrence in an HIV-positive woman. *Annals of Parasitology*, 62: 239-241.
- Wetzel D.M., Schmidt J., Kuhlenschmidt M.S., Dubey J.P. Sibley L.D. (2005):** Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infection and Immunity*, 73: 5379-5387.
- Widmer G., Klein P., Bonilla R. (2007):** Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology*, 134: 1583-1588.
- Wu X., Wang Y. (2012):** Fossil materials and migrations of *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*. *Research of China's Frontier Archaeology*, 1: 1-9.
- Xiao L., Sulaiman I.M., Ryan U.M., Zhou L., Atwill E.R., Tischler M.L., Zhang X., Fayer R., Lal A.A. (2002):** Host adaption and host-parasite co-evolution

in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Veterinary Parasitology*, 147: 166-170.

Xiao L., Fayer P. (2008): Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal of Parasitology*, 38: 1239-1255.

Yamaura H., Shirasaka R., Asahi H., Koyama T., Motoki M., Ito H. (1990): Prevalence of *Cryptosporidium* Infection among House Rats *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, in Tokyo, Japan and Experimental Cryptosporidiosis in Roof Rats. *Japanese Journal of Parasitology*, 39: 439-444.

Yoshikawa H., Iseki M. (1991): Freeze-fracture studies of *Cryptosporidium muris*. *Journal of Protozoology*, 38: 171-172.

Zambriski J.A., Nydam D.V., Wilcox Z.J., Bowman D.D., Mohammed H.O., Liotta J.L. (2013): *Cryptosporidium parvum*: determination of ID₅₀ and the dose-response relationship in experimentally challenged dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 197: 104-112.

Zhan L., Cao W.C., Chu C.Y., Jiang B.G., Zhang F., Liu W., Dumler S., Wu X.M., Zuo S.Q., Zhang P.H., Huang H., Zhao Q.M., Jia N., Yang H., Richardus J.H., Habbema D.F. (2009): Tick-borne Agents in Rodents, China, 2004-2006. *Emerging Infectious Diseases*, 15: 1904-1908.

Zhao Z., Wang R., Zhao W., Qi M., Zhao J., Zhang L., Li J., Liu A. (2015): Genotyping and subtyping of *Giardia* and *Cryptosporidium* isolates from commensal rodents in China. *Parasitology*, 142: 800-806.

Ziegler P.E., Wade S.E., Schaaf S.L., Stern D.A., Nadareski Ch.A., Mohammed H.O. (2007): Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, 147: 176-184.