

**Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích**

Zemědělská fakulta

**KRYPTOSPORIDIOVÉ INFEKCE
VEVEREK**

Bakalářská práce

Kamila Švajlenová

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

Školitel specialista: Ing. Nikola Holubová

České Budějovice, 2020

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) 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 15. dubna 2020

.....
Kamila Švajlenová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za cenné rady a trpělivost při vedení mé práce. Dále bych ráda poděkovala školitelce specialiste Ing. Nikole Holubové za pomoc při práci v laboratoři. Rovněž chci poděkovat celé své rodině a přátelům, za podporu při studiu a psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. MVDr. Dušanu Rajskému, CSc. za pomoc při sběru materiálu na území Slovenska.

Tato bakalářská práce byla finančně podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LTAUSA17165, řešitel prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

Abstrakt

Zkoumali jsme *Cryptosporidium* spp. infikující veverky obecné (*Sciurus vulgaris*) z 27 oblastí v České republice a na Slovensku. Zkoumali jsme 157 vzorků trusu, u kterých jsme detekovali oocysty *Cryptosporidium* spp. u 14 zvířat (21,98 %). Fylogenetická analýza genových sekvencí malých podjednotek rRNA, aktinu a gp60 prokázala přítomnost infekce *Cryptosporidium* u 14 zvířat. Sekvenční analýza odhalila přítomnost genotypu *Cryptosporidium* ferret genotyp ve všech pozitivních vzorcích. V populaci veverek byly detekovány tři gp60 subtypy, VIIIb, VIIIc a nový subtyp VIIIe. Výskyt infekce *Cryptosporidium* se nelišil mezi věkem nebo pohlavím zvířat. Mikroskopická detekce oocyst prokázala infekci pouze u mláďat. Intenzita infekce se pohybovala od 100000–250000 oocyst na gram trusu. Žádná z přirozeně infikovaných veverek v této studii nevykazovala klinické příznaky. Genotyp *Cryptosporidium* chipmunk I získaný z přirozeně infikované veverky šedé (*Sciurus carolinensis*) z Itálie, který byl použit pro experimentální pokusy, byl infekční pro myši ((*Mus musculus*; kmeny SCID; C57BL/6J; CD4^{-/-} a CD8^{-/-}), fretky (*Mustela putorius furo*) a veverky obecné s prepatentním obdobím 10, 4, 4, 4, 4 a 11 dní po infekci. Oocysty *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I měřily 5,64 (5,50–5,89) × 5,37 (4,86–5,60) μm (index tvaru 1,05 (1,01–1,14)). Všechny myši kromě kmene SCID se infekce zbavily do 8 až 18 dnů po infekci. Klinická kryptosporidióza se projevovala u SCID myší, fretok a veverek, ale pouze veverky trpěly těžkým průjmem a infekce pro ně byla smrtelná. SCID myši představují vhodný laboratorní model pro pomnožování genotypu *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I.

Klíčová slova: *Cryptosporidium* spp.; stromové veverky; prevalence; genotypizace; infekce

Summary

We investigated the *Cryptosporidium* spp. infecting red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in 27 areas in the Czech Republic and Slovakia. Examination of 157 faecal samples revealed oocysts of *Cryptosporidium* sp. in 14 animals (21.98%). Phylogenetic analysis of small subunit rRNA, actin and gp60 gene sequences showed the presence of *Cryptosporidium* infection in 14 animals. Sequence analysis revealed the presence of *Cryptosporidium* ferret genotype in all positive samples. Three gp60 subtypes, VIIIb, VIIIc and novel subtype VIIIe were detected within screened population of squirrels. The occurrence of *Cryptosporidium* infection did not differ between the age or sex of animals. Only juvenile animals shed microscopically detectable amount of oocysts. The infection intensity ranged from 100000 to 250000 oocysts per gram. None of the naturally infected squirrels developed clinical signs in the present study. *Cryptosporidium* chipmunk genotype I obtained from naturally infected Eastern gray squirrel (*Sciurus carolinensis*) in Italy and used for experiments was infectious for mice (*Mus musculus*; strains SCID, C57BL/6J, CD4^{-/-} and CD8^{-/-}), ferret (*Mustela putorius furo*) and red squirrels, with a prepatent period of 10, 4, 4, 4, 4 and 11 days post-infection, respectively. Oocysts of the *Cryptosporidium* chipmunk genotype I measured 5,64 (5,50–5,89) × 5,37 (4,86–5,60) μm (shape index 1,05 (1,01–1,14)). All mice strains except SCID clear infection within 8-18 days post-infection. Clinical cryptosporidiosis was observed in SCID mice, ferret and squirrels, but only squirrels suffer severe diarrhoea and the infection was lethal for them. SCID mice represent the suitable laboratory model host for maintenance of *Cryptosporidium* chipmunk genotype I.

Key words: *Cryptosporidium* spp.; tree squirrels; prevalence; genotyping; infection

Obsah

1. ÚVOD	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1. Čeleď Sciuridae	9
2.2. Historie kryptosporidií	9
2.3. Kryptosporidie a kryptosporidióza	10
2.3.1. Kryptosporidie	10
2.3.2. Kryptosporidióza	10
2.4. Taxonomie	11
2.5. Vývojový cyklus kryptosporidií	11
2.6. Kryptosporidie parazitující u veverek	12
2.6.1. <i>Cryptosporidium ferret</i> genotyp	13
2.6.2. <i>Cryptosporidium chipmunk</i> genotyp I	13
2.6.3. <i>Cryptosporidium parvum</i>	13
2.6.4. <i>Cryptosporidium baileyi</i>	14
2.6.5. <i>Cryptosporidium muris</i>	14
2.6.6. <i>Cryptosporidium deer mouse</i> genotyp III	14
2.6.7. <i>Cryptosporidium skunk</i> genotyp	15
2.6.8. <i>Cryptosporidium ubiquitum</i>	15
3. CÍLE PRÁCE	16
4. MATERIÁL A METODIKA	17
4.1. Materiál	17
4.1.1. Oocysty pro experimentální infekci	17
4.1.2. Zvířata pro experimentální infekce	17
4.2. Metody	18
4.2.1. Odběr vzorků, orgánů a tkání	18
4.2.2. Mikroskopické vyšetření	18
4.2.3. Barvení nátěru trusu anilin-karbol-methylvioletí (Miláček et Vítovec 1985)	18
4.2.4. Barvení auramine-fenolem (Ley et al. 1988)	19
4.2.5. Barvení dle Ziehl-Neelsena (Henriksen et Pohlenz 1981)	20

4.2.6. Značení oocyst pomocí monoklonálních protilátek (Crypto Cell, Cellabs, Austrálie)	20
4.2.7. Purifikace oocyst	21
4.2.8. Měření oocyst	23
4.2.9. Izolace DNA z trusu	23
4.2.10. Izolace DNA z tkáně	24
4.2.11. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	25
4.2.12. Gelová elektroforéza	26
4.2.13. Izolace z gelu	27
4.2.14. Sekvence	28
4.2.15. Fylogenetické analýzy	29
4.2.16. Statistické analýzy	29
4.2.17. Design experimentu	29
4.2.18. Intenzita infekce	29
5. VÝSLEDKY	31
5.1. Prevalence kryptosporidií	31
5.2. Vliv pohlaví a stáří na přítomnost kryptosporidiové infekce	37
5.3. Průběh experimentální infekce <i>Cryptosporidium</i> chipmunk genotyp I	37
5.4. Morfometrie oocyst <i>Cryptosporidium</i> chipmunk genotyp I	38
6. DISKUZE	40
7. ZÁVĚRY	43
8. LITERATURA	44

1. ÚVOD

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou obligátní epitelární paraziti infikující epitelální buňky převážně gastrointestinálního traktu různých hostitelů patřících do všech tříd obratlovců, včetně člověka a hospodářských zvířat.

Kryptosporidie způsobují závažná až život ohrožující průjemová onemocnění svých hostitelů, zejména u jedinců s nedostatečně vyvinutým nebo nefunkčním imunitním systémem a jedinců po léčbě, jejíž součástí je cílená imunosuprese. U hospodářských, ale i volně žijících zvířat jsou kryptosporidie příčinou vysoké morbidity a mortality mláďat.

Myši domácí, myšice, zemní veverky nebo potkani byli v minulosti popsáni jako potenciální zdroj lidských kryptosporidiových infekcí. V porovnání s ostatními hlodavci, jsou výzkumy v oblasti kryptosporidiových infekcí stromových veverek neuspokojivé, přestože právě tyto hlodavci se ukazují jako potenciální zdroj infekcí. V letech 2006–2013 byly detekovány kryptosporidiové infekce způsobené *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I u osob žijících ve Francii, Švédsku a Velké Británii, přestože se neprokázalo, že by tyto osoby navštívily oblasti, kde se vyskytují zemní veverky (chipmunkové), které jsou přirození hostitelé této kryptosporidie. Pozdější studie prokázaly, že zdroje infekcí jsou veverky popelavé (*Sciurus carolinensis*), které byly do Itálie a Velké Británie záměrně zavlečeny ze severní Ameriky.

Vedle zoonotických druhů a genotypů kryptosporidií jsou stromové veverky parazitovány řadou hostitelsky specifických kryptosporidií, o jejichž biologii je známo velmi málo.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Čeleď Sciuridae

Veverky jsou různorodou skupinou sestávající z přibližně 279 druhů a 51 rodů, které jsou rozděleny do pěti podčeledí (Ratufinae, Sciurillinae, Sciurinae, Xerinae a Callosciurinae). Rodina Sciuridae zahrnuje veverky stromové, veverky zemní a veverky létající ("The IUCN Red List of Threatened Species", 2008; Gurnell 1987; Jansa et Myers 2000; Lurz 2011; Steppan et Hamm 2006; Thorington et Ferrell 2006).

Jejich velikost se pohybuje od velikosti myši u veverek pygmejských (*Exilisciurus exilis*), které mají hmotnost okolo 10 gramů až po robustní veverky červené obří létající (*Ratufa indica*) v Asii o hmotnosti až 3 kilogramy (Gurnell 1987; Jansa et Myers 2000; Lurz 2011; Steppan et Hamm 2006; Thorington et Ferrell 2006).

Veverky se vyznačují dlouhými těly, jemnou srstí a velkýma očima. Zadní nohy mají pět prstů, přední jen čtyři. Stromové veverky mají dlouhé svalnaté nohy, dlouhé uši a dlouhé huňaté ocasy. Jejich lebky jsou krátké s klenutým profilem (Anderson et Jones 1984; Hayssen 2008; Jansa et Myers 2000; Michaux et al. 2008; Nowak 1991; Steppan et Hamm 2006; Thorington et Ferrell 2006).

Páření probíhá ve dvou obdobích, a to od prosince do ledna a druhé od května do června. Délka březosti je různá, ale většinou se pohybuje v rozmezí 29–65 dnů. Ve vrhu může být 1–11 mláďat (Hayssen 2008; Thorington et Ferrell 2006; Vernes 2004).

Veverky se vyskytují po celém světě s výjimkou Austrálie, Madagaskaru, Jižní Ameriky, Antarktidy, Grónska, mnoha oceánských ostrovů a některých pouštních oblastí, jako je Sahara. Veverky jsou zvláště rozmanité v afrických zemích a jihovýchodní Asii (Anderson et Jones 1984; Macdonald 1984; Matthews 1971; Nowak 1991; Seebeck 1989; Steppan et Hamm 2006; Thorington et Ferrell 2006).

2.2. Historie kryptosporidií

Kryptosporidie byly poprvé popsány roku 1907 Edwardem Tyzzerem, který našel v žaludku laboratorní myši parazity, které pojmenoval *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907; Tyzzer 1910). V roce 1912 popsal další druh parazitující v tenkém střevě myši a pojmenoval ho *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). V roce 1955 byl popsán druh

parazitující u krůt a byl pojmenován *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955). V roce 1976 byly popsány první infekce těmito parazity u lidí (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976). Ukázalo se, že kryptosporidie představují život ohrožující patogeny pro lidi nakažené HIV s rozvinutým AIDS (Fayer et Ungar 1986).

Až do konce 80 let 20. století bylo v rámci rodu *Cryptosporidium* popsáno jen velmi malé množství druhů. S postupným rozvojem a dostupností molekulárních metod došlo k výraznému posunu v poznání diverzity kryptosporidií (Kváč et al. 2008).

2.3. Kryptosporidie a kryptosporidióza

2.3.1. Kryptosporidie

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou protozoární paraziti, kteří infikují epiteliální buňky gastrointestinálního traktu obratlovců patřících do všech tříd (Xiao et al. 2010).

V rámci rodu rozlišujeme kryptosporidie na žaludeční a střevní. Žaludeční kryptosporidie mají oocysty oválné a větší oproti kryptosporidiím střevním, které jsou malé a kulaté. Dle místa lokalizace se liší i klinické příznaky kryptosporidiózy (Vítovec et al. 2006).

Oocysty kryptosporidií jsou odolné vůči nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí, uchovávají si infekce schopnost ve vlhkém prostředí, jako je voda, půda, čerstvé mořské plody (Rose 1997) a přežívají většinu běžných dezinfekčních postupů (Korich et al. 1990).

2.3.2. Kryptosporidióza

Onemocnění vyvolané kryptosporidiemi se nazývá kryptosporidióza (Cació et al. 2002). Prepatentní perioda trvá přibližně 7 dní (rozmezí 1–14 dní) a jedinec se z infekce většinou vyléčí sám. Průměrná délka onemocnění je 6–9 dní (Hunter et al. 2007), i když byly pozorovány i delší časy (průměrné trvání 19–22 dnů, maximálně do 100–120 dnů) (Robertson et al. 2002). Hlavním příznakem kryptosporidiózy je gastroenteritida, která může být nebezpečná pro jedince s oslabenou imunitou (Abubakar et al. 2007; Hunter et al. 2007). Nejčastějším projevem je vodnatý průjem, s příměsí hlenu ale ne krve, dále hubnutí, zvracení, zvýšená teplota a bolesti břicha (Mathieu et al. 2004). Kryptosporidiemi se lze nakazit prostřednictvím různých přenosových cest včetně

přímého kontaktu s infikovanými osobami (přenos z člověka na člověka), kontakt se zvířaty (přenos zoonóz) a požití kontaminovaných potravin (potravinářský přenos) nebo vody (vodní přenos) (Xiao et al. 2010).

2.4. Taxonomie

Kryptosporidie patří do čeledi Cryptosporidiidae, která patří do kmene Apicomplexa. Přesné umístění čeledi Cryptosporidiidae v rámci Apicomplexa je nejisté. Kryptosporidie byly po dlouhou dobu považovány za kokcidie, ke kterým byly řazeny (Corlis 1994). Nejnovější fylogenetické studie uvádí, že kryptosporidie jsou více příbuzné s gregarinami než kokcidiemi (Carreno et al. 1999). Extracelulární reprodukční stádia podobná gregarinám byla popsána u druhů *C. andersoni* a *C. parvum* (Hijjawi et al. 2002).

2.5. Vývojový cyklus kryptosporidií

Kompletní vývojový cyklus je znám pouze u čtyř druhů kryptosporidií, a to u *C. muris* (Tyzzer 1910), *C. parvum* (Tyzzer 1912), *C. baileyi* (Current 1986) a *C. proliferans* (Melicherová et al. 2014), nicméně se všeobecně předpokládá, že u ostatních druhů a genotypů kryptosporidií probíhá vývojový cyklus podobně.

Životní cyklus parazita je dokončen v rámci jednoho hostitele (tj. monoxenní cyklus) a zahrnuje jak asexuální, tak sexuální replikaci (Fayer et al. 2008).

Infekce kryptosporidii začíná pozřením vysporulovaných oocyst. V žaludku, u žaludečních kryptosporidií, nebo ve střevě, u střevních kryptosporidií, se z oocysty uvolní čtyři sporozoiti (excystace). Napadají epitelální buňky a vyvíjejí se v jednojaderné trofozoity. Na epitelálních buňkách se trofozoiti asexuálně dělí, což vede ke vzniku merontu typu I, v kterém vzniká šest až osm merozoitů (merogonie). Tato stádia jsou morfologicky podobná sporozoitům a mohou infikovat sousední epitelové buňky, které tvoří další meronty typu I nebo dávají vzniknout merontům typu II, kteří se dělí na čtyři jádra a vytvoří čtyři merozoity II. typu. Merozoiti II. typu jsou uvolňováni a infikují nové buňky, aby vytvořili další meronty typu II nebo mohou diferencovat do sexuálně odlišných stadií nazývaných makro- a mikro-gametocyty v procesu zvaném gametogonie. Makrogameta vzniká z makrogametocytu, je oplodněna mikrogametou vzniklou v mikrogametocytu za vzniku zygoty. Sporulací zygoty vzniká oocysta. Asi 20

% oocyst je tenkostěnných, které existují v trávicím traktu hostitele, což vede k infekci nových buněk (autoinfekce). Zbývajících 80 % je vylučováno do vnější prostředí spolu s výkaly/stolicí hostitele (Fayer et al. 1997). Nicméně existence tenkostěnných oocyst nebyla prokázána u většiny známých druhů kryptosporidií.

2.6. Kryptosporidie parazitující u veverek

Z celkového počtu 44 dosud popsaných druhů a více než 100 genotypů kryptosporidií, byly u stromových veverek detekovány 4 druhy, *C. baileyi*, *C. muris*, *C. parvum* a *C. ubiquitum*, a 4 genotypy, *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I, deer mouse genotyp III, ferret genotyp a skunk genotyp (Bertolino et al. 2003; Feng et al. 2007; Kváč et al. 2008; Lv et al. 2009b; Stenger et al. 2015; Ziegler et al. 2007a).

V roce 1982 se v literatuře objevuje první zmínka o výskytu kryptosporidií u čeledi Sciuridae a to u veverky popelavé (*Sciurus carolinensis*), kde byl zaznamenán výskyt *C. parvum* (Sundberg et al. 1982). Následně byly kryptosporidie nalezeny u veverky liščí (*Sciurus niger*), skupiny veverek létavých a sysla (Current 1989). Všechny tyto nálezy však byly popsány na základě mikroskopické detekce oocyst v trusu vyšetřovaných zvířat a na základě dnešních znalostí nelze spolehlivě určit o jaký druh nebo genotyp kryptosporidie se vlastně jednalo. Až v roce 2001 popsali pomocí molekulárních metod Bertolino et al. (2003) výskyt *C. parvum* u veverky obecné (*Sciurus vulgaris*). U veverky obecné byly později popsány další dva genotypy a to *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I a ferret genotyp (Kváč et al. 2008). Posledně zmíněný genotyp byl u těchto veverek také detekován v Asii (Feng et al. 2007; Lv et al. 2009). V severní Americe byl u čikarí červených (*Tamiasciurus hudsonicus*) detekován druh *C. ubiquitum* a genotypy deer mouse genotyp III a skunk genotyp (Stenger et al. 2015; Ziegler et al. 2007a,b), u veverek popelavých byly kromě výše zmíněných druhů a genotypů dále nalezeny druhy *C. baileyi* a *C. muris* (Feng et al. 2007; Stenger et al. 2015; Sundberg et al. 1982; Ziegler et al. 2007a, b) a u veverek liščích druh *C. ubiquitum* (Stenger et al. 2015).

Kryptosporidii stromových veverek se budu věnovat v následujícím textu.

2.6.1. *Cryptosporidium ferret* genotyp

Cryptosporidium ferret genotyp byl poprvé detekován u fretky černé (*Mustela nigripes*) a fretky domácí (*Mustela putorius furo*) v USA a Japonsku (Abe a Iseki 2003; Sulaiman et al. 2000; Xiao et al. 1999). Kromě toho Gomé-Couso et al. (2007) popsali tento genotyp u amerických norků (*Mustela vison*) chovaných ve Španělsku. Tento genotyp byl v předchozích studiích určen jako nejčastější kryptosporidie u stromových veverek v Itálii a Číně (Kváč et al. 2008; Lv et al. 2009). Velikost oocyst *Cryptosporidium ferret* genotyp u veverek obecných je asi 5,5 (4,8–6,1) × 5,1 (4,7–5,7) μm (Kváč et al. 2008). Vývojový cyklus není znám. U veverek infikovaných tímto genotypem nebyly popsány žádné klinické příznaky onemocnění (Kváč et al. 2008; Prediger et al. 2017).

2.6.2. *Cryptosporidium chipmunk* genotyp I

Cryptosporidium chipmunk genotyp I byl poprvé detekován ve vodě po povodních v New Yorku (Jiang et al. 2005). Následně byl v USA tento genotyp popsán u veverky popelavé a čipmanka východního (*Tamias striatus*) (Feng et al. 2007). V Itálii byl tento genotyp detekován u introdukovaných veverek popelavých a veverek Pallasových (*Callosciurus erythraeus*) také ve dvou případech u veverek obecných (Prediger et al. 2017; Kváč et al. 2008). *Cryptosporidium chipmunk* genotyp I patří mezi zoonotické kryptosporidie. Lidské infekce touto kryptosporidií byly hlášeny v USA a Evropě (Feltus et al. 2006; Guo et al. 2015; Lebbad et al. 2013). Vývojový cyklus *Cryptosporidium chipmunk* genotyp I prozatím není popsán. Velikost oocyst tohoto genotypu je 5,8 (5,3–6,6) × 5,4 (4,7–5,9) μm (Kváč et al. 2008). Zjištěná prevalence u veverek obecných z Itálie byla 10,5–24,3 % (Kváč et al. 2008; Prediger et al. 2017) a u veverek popelavých v USA 37,5 % (Feng et al. 2007).

2.6.3. *Cryptosporidium parvum*

Druh *C. parvum* infikuje především skot, ovce a lidi, ale byl hlášen i u široké škály hostitelů (Fayer 2010; Xiao et Ryan 2008). První informace o detekci *C. parvum* u veverek z čeledi Sciuridae pochází z USA, kde byl tento druh nalezen ve vzorcích trusu veverky popelavé (Sundberg et al. 1982), nicméně veverky nejsou typickým hostitelem

této kryptosporidie. Velikost oocyst se pohybuje kolem $4,5 \times 5,0 \mu\text{m}$ (Upton et Current 1985). Vývojový cyklus je popsán v kapitole 2.5. *Cryptosporidium parvum* nejčastěji infikuje tenké střevo, ale může být i v celém zažívacím traktu (Cacció et al. 2002). Typickým příznakem je vodnatý průjem bez příměsi krve. Patologické změny se projevují atrofií klků a zánětem střevního epitelu (Thompson et al. 2005).

2.6.4. *Cryptosporidium baileyi*

Cryptosporidium baileyi byl poprvé izolován ze vzorků trusu brojlerů kura domácího v roce 1986 (Current et al. 1986). Přestože se jedná o druh adaptovaný na ptáky (Lindsay et al. 1990), byla tato kryptosporidie nalezena u veverek popelavých v USA (Feng et al. 2007). Vývojový cyklus je popsán v kapitole 2.5. Velikost oocyst se pohybuje v rozmezí $6,0\text{--}7,2 \times 4,8\text{--}5,4 \mu\text{m}$. Lokalizace tohoto druhu není jen v trávicím traktu, ale také ve spojivce, nosohltanu, průdušnici, průduškách, ledvinách, močových cestách, kloace a burse Fabrici (Lindsay et Blagburn 1990).

2.6.5. *Cryptosporidium muris*

Cryptosporidium muris byl poprvé popsán E. Tyzzerem v roce 1907 v žaludku laboratorních myší (Tyzzer 1907). Tento druh se vyvíjí v žaludku hostitele. Je dobře známo, že *C. muris* má širokou hostitelskou specificitu. Kromě různých druhů hlodavců se také vyskytují infekce u prasat, velbloudů, žiraf, psů, koček a primátů (Fayer 2010; Feng et al. 2011). Tento druh byl popsán také u lidí (Katsumata et al. 2000). Vývojový cyklus je popsán v kapitole 2.5. Velikost oocyst se pohybuje v rozmezí $8,4 (7,5\text{--}9,8) \times 6,3 (5,5\text{--}7,0) \mu\text{m}$ (Iseki 1986). *Cryptosporidium muris* byl poprvé detekován u veverky v roce 2003, a to u burunduka páskovaného (*Eutamias sibiricus*) (Hůrková et al. 2003).

2.6.6. *Cryptosporidium deer mouse genotyp III*

O tomto genotypu je toho velmi málo popsáno, přesto se ví, že *Cryptosporidium deer mouse genotyp III* byl popsán u čikarí červených v severní Americe (Stenger et al. 2015; Ziegler et al. 2007a,b). Poprvé byl tento genotyp detekován v odpadních vodách jako genotyp W1 a následně nalezen u křečků rodu *Peromyscus* (Feng et al. 2007). *Cryptosporidium deer mouse genotyp III* není infekční pro lidi (Feng et al. 2007). Tento

genotyp je často detekován u stromových veverek v Severní Americe, ale doposud nebyl nalezen v Evropě nebo Asii, s výjimkou jediné zprávy z roku 2006 z Polska, kde byl nalezen v mývalovi (*Procyon lotor*) (Lesnianska et al. 2016).

2.6.7. *Cryptosporidium* skunk genotyp

Cryptosporidium skunk genotyp byl poprvé izolován ze vzorků od burunduka páskovaného (*Tamias sibiricus*) v Kalifornii, díky tomuto nálezu byl i pojmenován kvůli předpokládané specifitě hostitele (Xiao et al. 2002). Následně byl ale popsán u dalších hostitelů, a to u veverky popelavé, veverky obecné, veverky liščí, vačice virginské (*Didelphis virginiana*) a dalších (Feng et al. 2007; Rengifo-Herrera et al. 2011; Stenger et al. 2015). Oocysty, respektive specifická DNA *Cryptosporidium* skunk genotyp jsou velmi často detekovány v povrchových vodách ve státech Evropské unie, Kanady a USA (Jellison et al. 2009; Jiang et al. 2005; Ruecker et al. 2012; Yang et al. 2008). Tento genotyp je infekční pro člověka, infekce byla popsána v pěti případech v USA a Velké Británii (Davies et al. 2009; Robinson et al. 2008). *Cryptosporidium* skunk genotyp je úzce příbuzný s *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I (Feng et al. 2007; Lv et al. 2009; Stenger et al. 2015). Vývojový cyklus prozatím není popsán a také není známa velikost oocyst.

2.6.8. *Cryptosporidium ubiquitum*

Druh *C. ubiquitum* je běžně detekován u domácích a divokých přežvýkavců, hlodavců, masožravců a primátů (Fayer et al. 2010; Feng et al. 2007; Elwin et al. 2008; da Silva et al. 2003; Ziegler et al. 2007). Byl také nalezen v pitné vodě, odtoku dešťové vody, sedimentu potoka a odpadní vodě v různých geografických lokalitách (Jiang et al. 2005; Jellison et al. 2009; Nichols et al. 2010; Yang et al. 2008). *Cryptosporidium ubiquitum* bylo popsáno u veverky liščí (Stenger et al. 2015). V Severní Americe byl taktéž tento druh popsán u čikari červených (Stenger et al. 2015; Ziegler et al. 2007). Vývojový cyklus doposud nebyl popsán. Velikost oocyst je $4,1-5,3 \times 4,3-5,0 \mu\text{m}$ (Fayer et al. 2010).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce je:

- Popsat výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikujících volně žijící veverka na území České republiky, případně dalších států Evropy (např. Slovensko a Polsko).
- Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp kryptosporidií a pomocí parazitologických metod stanovit intenzitu infekce.
- Porovnat izoláty získané v rámci bakalářské práce se studii provedenými ve světě.
- Fylogenetickými metodami určit fylogenetické vztahy nalezených druhů a genotypů kryptosporidií.
- Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů.
- Zpracovat datové soubory příslušnými statistickými a fylogenetickými metodami.
- Porovnat získané výsledky s publikovanými údaji.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Materiál

V letech 2018–2020 bylo získáno celkem 157 vzorků trusu veverek pocházejících z České republiky a Slovenska, které byly následně vyšetřeny na přítomnost kryptosporidií. Vzorky trusu získané z živochytných pastí byly uloženy do sterilních 1,7 ml mikrozkušavek. V případě nálezu uhynulé veverky byly vzorky trusu odebrány z rekta při pitvě zvířete a taktéž uloženy do 1,7 ml sterilních mikrozkušavek. Každá mikrozkušavka byla označena unikátním identifikačním číslem a uchovávána v chladu (4–8 °C) až do dalšího zpracování. Vzorky trusu byly kromě vlastních odchytů získávány ve spolupráci se záchrannými stanicemi zvířat v České republice a s doc. MVDr. Dušanem Rajským, CSc. (Technická univerzita Zvolen, Zvolen, Slovensko).

4.1.1. Oocysty pro experimentální infekci

Pro účely experimentálních infekcí byly použity oocysty *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I získané z přirozeně infikované veverky obecné v Itálii a udržované v laboratoři ve SCID myších. Zvířata byla infikována dávkou 500 000 oocyst v 200 µl vody.

4.1.2. Zvířata pro experimentální infekce

K experimentálním infekcím byly použity 3 myši SCID (*Mus musculus*; C.B-17/IcrHsd-*Prkdc*^{scid}; The Jackson Laboratory, USA), 3 myši kmene C57BL/6J (The Jackson Laboratory, USA), 3 myši kmene CD4^{-/-} (B6.129S2-*Cd4*^{tm1Mak}/J; The Jackson Laboratory, USA), 3 myši kmene CD8^{-/-} (B6.129S2-*Cd8a*^{tm1Mak}/J; The Jackson Laboratory, USA), 3 fretky domácí (domácí chov) a 3 veverky obecné (odchyt). Zvířata byla chována v chovném a experimentálním zařízení Parazitologického ústavu Biologického centra AVČR, v.v.i. v chovných nádobách, respektive klecích odpovídajících druhu a velikosti zvířat dle příslušných zákonů a předpisů. Zvířata dostávala sterilní krmení a vodu *ad libitum*. Klece a chovné nádoby byly čištěny každý den. Experimentální práce byla povolena na základě projektu pokusů č. MZP/2019/630/1411.

4.2. Metody

4.2.1. Odběr vzorků, orgánů a tkání

Trus experimentálně inokulovaných zvířat byl odebírán každých 24 hodin po dobu 30 dnů do sterilních 1,7 ml mikrozkušavek s řádným označením a následně byl skladován při 4–8 °C do dalšího zpracování (nátěr na podložní sklíčko a izolace DNA). Orgány a tkáně byly odebírány do sterilních mikrozkušavek při pitvě. Zkušavky byly řádně označeny a vzorek určený pro izolaci DNA byl zpracován do 24 hodin po odběru.

4.2.2. Mikroskopické vyšetření

Všechny vzorky trusu z volně žijících veverek i experimentálně infikovaných zvířat byly vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií pomocí různých specifických barvení a značení protilátkami (4.2.3.–4.2.6.).

4.2.3. Barvení nátěru trusu anilin-karbol-methylvioletí (Miláček et Vítovec 1985)

Roztoky:

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

Postup:

- Rozetřít trus pomocí špejle na podložní sklíčko
- Fixovat nátěr v methanolu a plameni
- Barvit v roztoku methylvioletí po dobu 30 minut
- Opláchnout pod tekoucí vodou

- Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 1–5 minut
- Opláchnout pod tekoucí vodou
- Dobarvit v roztoku tartrazinu po dobu 5 minut
- Opláchnout pod tekoucí vodou
- Nechat okapat a zaschnout
- Mikroskopovat při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje

Výsledek:

- Oocysty kryptosporidií se barví tmavě fialově na žlutém až žluto-fialovém pozadí

4.2.4. Barvení auramine-fenolem (Ley et al. 1988)

Roztoky:

- Auramine – fenol
- 3% HCl
- 70% methanol
- 0,1% manganistan draselný

Postup:

- Rozetřít trus pomocí špejle na podložní sklíčko
- Fixovat vzorek v methanolu a plameni
- Barvit auramine-fenolem po dobu 10 minut
- Opláchnout pod tekoucí vodou
- Odbarvit 3% HCl v 70% methanolu po dobu 5 minut
- Opláchnout pod tekoucí vodou
- Dobarvit 0,1% manganistanem draselným po dobu 30 sekund
- Opláchnout pod tekoucí vodou
- Nechat okapat a zaschnout
- Prohlížet sklíčka pomocí fluorescenčního mikroskopu s filtrem WB 515 nm při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje

Výsledek:

- Oocysty kryptosporidií mají žluto-zelenou fluorescenci

4.2.5. Barvení dle Ziehl-Neelsena (Henriksen et Pohlenz 1981)

Roztoky:

- Roztok karbolfuchsinu (rozpuštěné fenolové krystaly 2,5 ml, 100% ethanol 5 ml, práškový basický fuchsin 0,5 g, deionizovaná voda 50 ml), před použitím přefiltrovat
- 1% kyselý alkohol
- 0,8% světlá zeleň

Postup:

- Rozetřít trus pomocí špejle na podložní sklíčko
- Fixovat v 95–100% methanolu po dobu 10 minut
- Barvit v roztoku karbol fuchsinu po dobu 30 minut
- Opláchnout pod tekoucí vodou
- Odbarvit v 1% kyselém alkoholu (při odbarvování již neodtéká roztok červené barvy)
- Opláchnout pod tekoucí vodou
- Barvit světlou zelení po dobu 1 minuty
- Opláchnout pod tekoucí vodou
- Nechat zaschnout
- Mikroskopovat při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje

Výsledek:

- Oocysty kryptosporidií se barví červeně na zeleném pozadí

4.2.6. Značení oocyst pomocí monoklonálních protilátek (Crypto Cell, Cellabs, Australie)

Roztoky:

- Crypto Cell reagent – fluorescenčně značené specifické monoklonální protilátky proti stěně oocysty
- Mounting fluid

Postup:

- Kápnout vyčištěné oocysty v 20 μ l dH₂O na jamkové sklo (4.2.7.), nechat zaschnout
- Fixovat v methanolu do zaschnutí při laboratorní teplotě
- Přidat 10 μ l Crypto Cell Reagentu
- Inkubovat sklíčka v temnu a vlhku po dobu 30 minut při 37 °C
- Omýt sklíčka v PBS po dobu 1 minuty
- Osušit
- Před prohlížením kápnout 10 μ l mounting fluid na sklíčko a přikrýt krycím sklíčkem
- Prohlížet sklíčka pomocí fluorescenčního mikroskopu s filtrem WB 515 nm při zvětšení 1000 \times za použití imerzního oleje

Výsledek:

- Oocysty kryptosporidií mají zelenou fluorescenci na tmavém pozadí

4.2.7. Purifikace oocyst

Pozitivní vzorek trusu zhomogenizovat v třecí misce, přecedit přes sítko a vyčistit a zkoncentrovat na sacharózovém gradientu a následně pomocí cesium chloridového gradientu.

Sacharózový gradient (Arrowood et Stearling 1987)**Roztoky:**

- Sheaterův roztok (deionizovaná voda (dH₂O (259 ml) + cukr (405 g))
- PBS Tween (PBS, Tween (1% Tween 20 v PBS (1 l deionizované vody; 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄ \times 12H₂O; 2,4 g KH₂PO₄))

Postup:

- Vzorek trusu homogenizovat v třecí misce, přecedit přes sítko
- Do připravených zkumavek navrstvit gradient
 1. vrstva 30 ml Sheater 1+2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween)
 2. vrstva 30 ml Sheater 1+4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

3. vrstva 15 ml vzorku

- Centrifugovat 20 minut při 1370 g
- Přelít supernatant do připravených zkumavek a vyhodit sediment
- Do zkumavek se supernatantem dolít deionizovanou vodu
- Centrifugovat 20 minut při 1370 g
- Ze zkumavek odsát půlku obsahu pomocí vodní vývěvy a doplnit deionizovanou vodou
- Centrifugovat 20 minut při 1370 g
- Ze zkumavek opět odsát půlku obsahu pomocí vodní vývěvy a doplnit deionizovanou vodou
- Centrifugovat 20 minut při 1370 g
- Sedimenty uchovat v PBS při 4 °C

Cesium chloridový gradient (Arrowood et Donaldson 1996)

Roztoky:

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

Postup:

- Napipetovat do mikrozkušavky 1 ml CsCl
- Do zkumavky s CsCl navrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS
- Centrifugovat při 20 °C 3 minuty při 16000 g
- Supernatant přepipetovat do 50 ml zkumavek a vyhodit sediment
- Zkušavku doplnit deionizovanou vodou
- Centrifugovat při 4 °C 20 minut při 1370 g
- Odsát supernatant a doplnit zkumavku deionizovanou vodou, vortexovat a centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g (opakovat 3×)
- Oocysty uchovat v deionizované vodě při 4 °C

4.2.8. Měření oocyst

Velikost oocyst *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I byla měřena po zhotovení mikroskopických preparátů, které byly obarveny pomocí barvení anilin-karbol-methylvioletí, barvením auramine-fenolem, barvením dle Ziehl-Neelsena a značení oocyst pomocí specifických monoklonálních protilátek. Měřena byla šířka a délka oocyst a následně byl vypočítán index tvaru.

4.2.9. Izolace DNA z trusu

Pro izolaci celkové genomové DNA z trusu byl použit komerční kit GeneAll® Exgene™ Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology, co., Ltd., Soul, Jižní Korea).

Materiál a roztoky:

- 1,7 ml mikrozkušavky Safe-Lock mikrozkušavky (není součástí kitu)
- Skleněné kuličky 0,5 mm (není součástí kitu)
- Zirkonové kuličky 1,5 mm (není součástí kitu)
- 1,7 ml mikrozkušavky EzPass (součástí kitu)
- 1,7 ml mikrozkušavky mini spin column (součástí kitu)
- FL pufr (součástí kitu)
- EB pufr (součástí kitu)
- NW pufr (součástí kitu)
- PB pufr (součástí kitu)

Postup:

- Vzorek (přibližně 200 mg) dát do Safe-Lock mikrozkušavky, přidat skleněné a zirkonové kuličky a napipetovat 1–1,3 ml FL pufru, homogenizovat vortexováním a rozbít homogenizátorem (FastPrep24 Instrument; MP Biomedical) po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s
- Inkubovat 5 minut, při laboratorní teplotě, centrifugovat 5 minut při 16 000 g
- Přepipetovat veškerý supernatant na EzPass kolonku
- Centrifugovat 1 minutu při 16000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky

- Na kolonku napipetovat 100 µl EB pufru, inkubace 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g
- Vyhodit EzPass kolonku a připipetovat 500 µl PB pufru do sběrné zkumavky, promíchat pipetováním
- Všechn obsah přenést na mini spin kolonku
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky
- Napipetovat 500 µl NW pufru na střed kolony
- Centrifugovat 1 minutu při 16000 g, vylít odpad ze sběrné kolony
- Opět centrifugovat 1 minutu při 16 000 g, odstranit zbytek pufru, přenést kolonky na čistou 1,7 ml mikrozukavku
- Napipetovat 200 µl EB pufru na kolonku, inkubovat 1 minutu, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g
- Získanou DNA skladovat při -18 °C

4.2.10. Izolace DNA z tkáně

Pro izolaci celkové genomové DNA z tkáně byl použit komerční kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN).

Materiál a roztoky:

- 1,7 ml mikrozukavky (není součást kitu)
- Skleněné kuličky 0,5 mm (není součást kitu)
- Zirkonové kuličky 1,5 mm (není součást kitu)
- Mini spin kolonka (součást kitu)
- ATL Buffer (součást kitu)
- Proteináza K (součást kitu)
- AL pufr (součást kitu)
- EtOH (není součást kitu)
- AW 1 pufr (součást kitu)
- AW 2 pufr (součást kitu)

- AE pufr (součást kitu)

Postup:

- Do mikrozkušavky nastříhat asi 10 mg tkáň, přidat malé skleněné kuličky a zirkonové kuličky
- Připipetovat 200 µl ATL Buffer, homogenizovat vortexováním
- Homogenizovat (FastPrep24 Instrument; MP Biomedical) po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s
- Připipetovat 20 µl proteinázy K
- Inkubovat 1 hodinu při 56 °C, během inkubace pravidelně míchat
- Připipetovat 200 µl AL Buffer, homogenizovat vortexováním
- Připipetovat 200 µl EtOH, homogenizovat vortexováním
- Centrifugovat 45 s při 16 000 g
- Veškerý supernatant přepipetovat na Mini spin kolonku, centrifugovat 3 minuty při 16 000 g, odstranit odpad ze sběrné mikrozkušavky
- Připipetovat 500 µl AW 1 Buffer, centrifugovat 1 minutu při 10 000 g, odstranit odpad ze sběrné mikrozkušavky
- Připipetovat 500 µl AW 2 Buffer, centrifugovat 1 minutu při 10 000 g, odstranit odpad ze sběrné mikrozkušavky
- Sběrné mikrozkušavky vyhodit, nahradit je novými mikrozkušavkami, přímo na membránu kolony napipetovat 200 µl AE Buffer, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 10 000 g

4.2.11. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost specifické DNA kryptosporidií byla detekována pomocí metody nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU), genu kódujícího aktin a 60 kDA glykoprotein (GP60).

Pro primární i sekundární reakce byl namíchaný mastermix, který měl vždy objem 30 µl. Jako pozitivní kontroly byly použity oocysty *Cryptosporidium muris* nebo *Cryptosporidium parvum*. K negativní kontrole sloužila voda. Mastermix byl

rozpipetovaný do mikrozkušavek, kam byl následně přidán i vyizolovaný vzorek DNA. Vše bylo vloženo do cycleru s příslušnou nasedací teplotou, viz níže.

SSU (Jiang et al. 2005; Xiao et al. 1999)

Primární reakce – nasedací teplota 50 °C

F1 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'

R1 3'-AGGACAAAGTTCCTTTACCC-5'

Sekundární reakce – nasedací teplota 55 °C

F2 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

R2 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'

Aktin (Sulaiman et al. 2002)

Primární reakce – nasedací teplota 50 °C

F1 5'-ATGRGWGAAGAAGWARYWCAAGC-3'

R1 3'-TAACAKGTGTCTTTYACRAAGA-5'

Sekundární reakce – nasedací teplota 45 °C

F2 5'-CAAGCWTRGTTGTTGAYAA-3'

R2 3'-GGTWSWTAACAKGTGTCTTT-5'

GP60 (Jiang et al. 2005)

Primární reakce – nasedací teplota 50°C

F1 5'-TTTACCCACACATCTGTAGCGTCG-3'

R1 5'-ACGGACGGAATGATGTATCTGA-3'

Sekundární reakce – nasedací teplota 50°C

F2 5'-ATAGGTGATAATTAGTCAGTCTTTAAT-3'

R2 5'-CCAAAAGCGGCTGAGTCAGCATC-3'

4.2.12. Gelová elektroforéza

Produkty ze sekundární PCR byly separovány pomocí gelové elektroforézy na 1% agarózovém gelu s přídavkem ethidium bromidu.

Pomůcky:

- 50× TAE pufr (242 g tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA)
- agaróza (Biotech, Heidelberg, Německo)
- ethidium-bromid (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- 100 bp DNA Ladder (O'Gene Ruler™, Biogen, Londýn, Velká Británie)

Postup:

- Navážít agarózu a smíchat s TAE pufrém, ohřívat v mikrovlnné troubě dokud se agaróza nerozpustí
- Ochladit pod tekoucí vodou
- Přidat 1 µl ethidium bromidu
- Nalít do nosiče a přidat hřebeny
 - Nosič malý: 0,4 g / 40 ml TAE pufr
 - Nosič střední: 0,8 g / 80 ml TAE pufr
 - Nosič velký: 1,2 g / 120 ml TAE pufr
- Nechat ztuhnout
- Po ztuhnutí vložit do elektroforetické vany tak, aby starty byly u záporné elektrody
- Vyjmout hřebeny, do jamek nanést produkty ze sekundární PCR, do první jamky nanést velikostní marker (100 bp) (O'Gene Ruler™, Biogen, Londýn, Velká Británie).

4.2.13. Izolace z gelu

Pro izolaci naamplifikované DNA z gelu byl použit komerční kit Gen Elute (Sigma).

Materiál a roztoky:

- 1,7 ml Mikrozkušavky
- Gel Solubilization Solution
- Binding Column G
- Column Preparation Solution

- Wash Solution G
- Eluční voda

Postup:

- Vyříznout fragment DNA z gelu čistým skalpelem, dát do 1,7 ml mikrozkušavky
- Připipetovat 500 µl Gel Solubilization Solution
- Inkubovat 10 minut při 50 °C, promíchat každé 2–3 minuty
- Inkubace vody na eluci při 65 °C
- Sestavit Binding Column G, napipetovat 500 µl Column Preparation Solution, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g
- Připipetovat 150 µl isopropanolu, promíchat
- Přepipetovat veškerý obsah na kolonu (Binding Column G), centrifugovat 1 minutu při 16 000 g
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky
- Přepipetovat 700 µl Wash Solution G, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g
- Otočit zkumavku v centrifuze o 180°, centrifugovat 3 minuty při 16 000 g
- Kolonu dát do nové 1,7 ml mikrozkušavky, provést eluci napipetováním 30 µl eluční vody na střed kolony
- Inkubovat 1 minutu, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g
- Získanou DNA skladovat při 4° C

4.2.14. Sekvenace

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů v komerčních firmách (SeqMe, Dobříš, Česká republika; nebo Eurofins, Praha, Česká republika).

4.2.15. Fylogenetické analýzy

Nukleotidové sekvence získané v této práci byly zpracovány pomocí programu Chromas Pro v 2.4.1 (Technelysium, Pty Ltd, Jižní Brisbane, Austrálie) a porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank. Sekvence byly porovnány pomocí webové verze programu MAFFT verze 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Nejvhodnější fylogenetický model pro fylogenetické analýzy byl vybrán v programu MEGA X. V programu MEGA X byly metodou maximum likelihood (ML) vypočteny fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií. Bootstrapový konsenzus výsledného stromu byl získán na základě 1000 opakování. Získané fylogenetické stromy byly ručně upraveny pomocí CorelDrawX7.

4.2.16. Statistické analýzy

Vliv věku a pohlaví na výskyt kryptosporidiových infekcí byl testován pomocí chí kvadrát testu. Pro výpočet byl použit software Epi InfoTm v. 7.2.3.1 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA).

4.2.17. Design experimentu

Každé experimentální zvíře bylo před začátkem experimentu vyšetřeno na přítomnost oocyst a specifické DNA kryptosporidií. Každé experimentální zvíře bylo inokulováno dávkou 50 000 oocyst *Cryptosporidium* chipmunk genotype I v 200 µl vody (4.2.7.). Zvířata použitá jako negativní kontroly byla inokulována destilovanou vodou v dávce 200 µl ve stejný čas jako experimentální zvířata. Trus všech zvířat byl odebírán do mikrozkuvek od druhého dne po infekci (DPI) po dobu 30 dnů. Z každého vzorku trusu byl zhotovený nátěr (4.2.2.), který byl dále obarven anilin-karbol-methylvioletí (4.2.3.). Z každého vzorku byla vyizolována DNA (4.2.7.), která byla následně zpracována pomocí PCR (4.2.9.). Pozitivní vzorky byly dále sekvenovány v komerčních firmách.

4.2.18. Intenzita infekce

Intenzita infekce byla stanovena jako počet oocyst na gram trusu (OPG). Sklíčka byla vážena před a bezprostředně po zhotovení nátěru trusu, obarvená a mikroskopicky

vyšetřena při 1000 násobném zvětšení. OPG byla odhadnuta na základě počtu spočítaných oocyst (Kváč et al. 2007).

5. VÝSLEDKY

V průběhu let 2019–2020 bylo získáno celkem 157 vzorků trusu z veverek, z toho 111 vzorků z 12 lokalit v České republice a 46 vzorků z 15 lokalit ve Slovenské republice (Tabulka 1).

5.1. Prevalence kryptosporidií

Mikroskopické vyšetření nátěrů trusu prokázalo přítomnost oocyst kryptosporidií pouze v pěti vzorcích (3,2 %) pocházejících z mladých veverek na lokalitě 5 v České republice (Tabulka 1). Intenzita infekce u mikroskopicky pozitivních jedinců se pohybovala v rozmezí 22 000–72 000 OPG.

Na základě molekulárních analýz byla detekována specifická DNA kryptosporidií ve 14 vzorcích trusu, včetně vzorků, které byly mikroskopicky pozitivní (Tabulka 2 a 3). Všech 14 pozitivních vzorků bylo úspěšně genotypováno/sekvenováno na genech kódujících SSU, aktin a gp60. Fylogenetické analýzy založené na částečných sekvencích genů kódujících SSU a aktin prokázaly přítomnost *Cryptosporidium ferret* genotyp ve všech pozitivních vzorcích (Tabulka 2 a 3; Obrázek 1 a 2). Všechny získané sekvence byly vzájemně identické a 100% shodné se sekvencemi MF411071 (SSU) a MF411076 (aktin) *Cryptosporidium ferret* genotyp získanými z veverek obecných v předchozích studiích a uložených v GenBank. ML fylogenetický strom vytvořený z částečných sekvencí genu kódujícího gp60 prokázal přítomnost tří různých skupin *Cryptosporidium ferret* genotyp klastrující ke dvěma dříve detekovaným subtypům tohoto genotypu (VIIIb a VIIIc) a jednu novou subtypovou skupinu (VIIIe), která dosud nebyla popsána (Tabulka 2 a 3; Obrázek 3).

Tabulka 1. Výskyt kryptosporidií v trusu veverek obecných (*Sciurus vulgaris*) na základě mikroskopického a molekulárního vyšetření ve vztahu k věku, pohlaví a státu odchyту veverek obecných.

Stát	Pohlaví	Věk	Počet vzorků	Počet pozitivních mikroskopicky	Počet pozitivních PCR
Česká republika	Samice	Dospělec	25	0	3
		Mládě	21	1	1
	Samec	Dospělec	38	0	2
		Mládě	27	4	4
Slovensko	Samice	Dospělec	9	0	1
		Mládě	5	0	1
	Samec	Dospělec	27	0	2
		Mládě	5	0	0

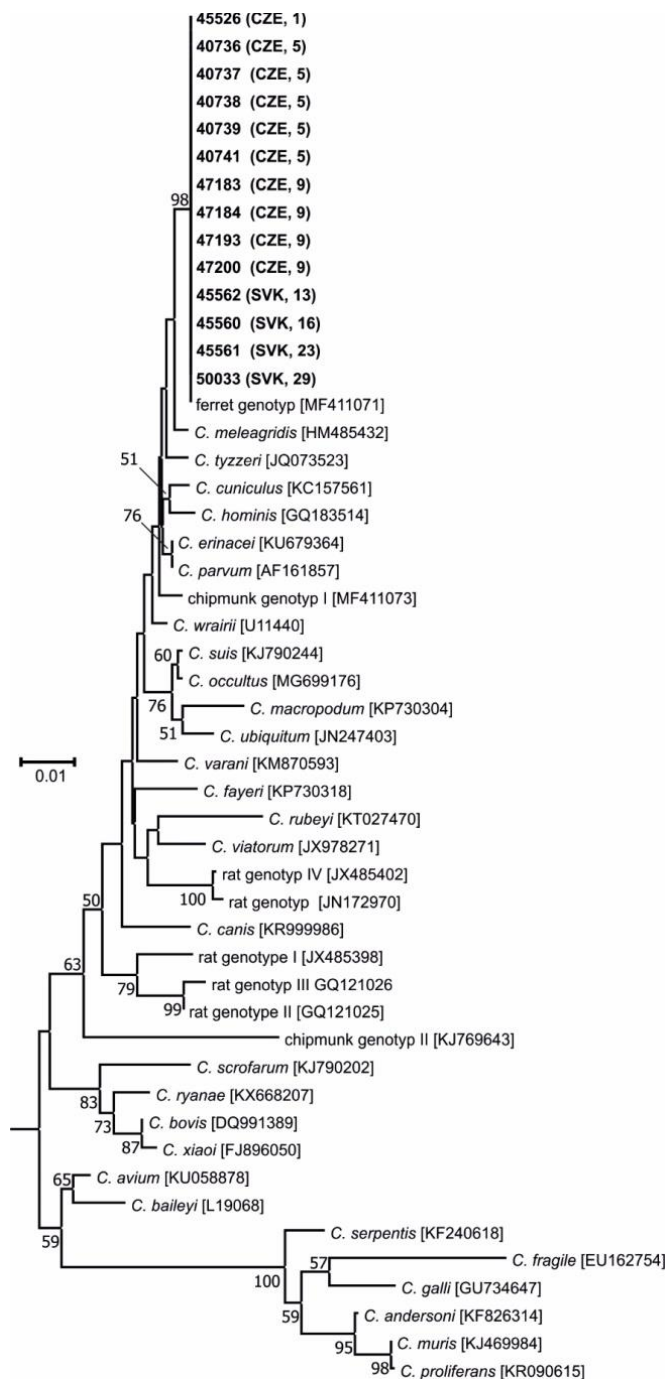
Tabulka 2. Mikroskopická detekce (MIK) včetně intenzity infekce vyjádřené jako počet oocyst na gram trusu (OPG) a genotypizace kryptosporidií na základě sekvenace části genů kódujících malou podjednotku rRNA (SSU), aktin a 60 kDa glykoprotein (GP60) na lokalitách na Slovensku u veverek obecných (*Sciurus vulgaris*).

Lokalita	Počet vyšetřených/ pozitivních	ID vzorku	MIK (OPG)	Genotypizace		
				SSU	Aktin	GP60
13	5/1	45562	Ne	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIcA10G2R1
14	2/0	-	-	-	-	-
15	2/0	-	-	-	-	-
16	5/1	45560	Ne	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIcA10G2R1
17	4/0	-	-	-	-	-
18	2/0	-	-	-	-	-
19	7/0	-	-	-	-	-
20	1/0	-	-	-	-	-
21	1/0	-	-	-	-	-
22	4/0	-	-	-	-	-
23	1/1	45561	Ne	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIcA10G2R1
24	9/1	50033	Ne	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIcA10G2R1
25	1/0	-	-	-	-	-
26	1/0	-	-	-	-	-
27	1/0	-	-	-	-	-

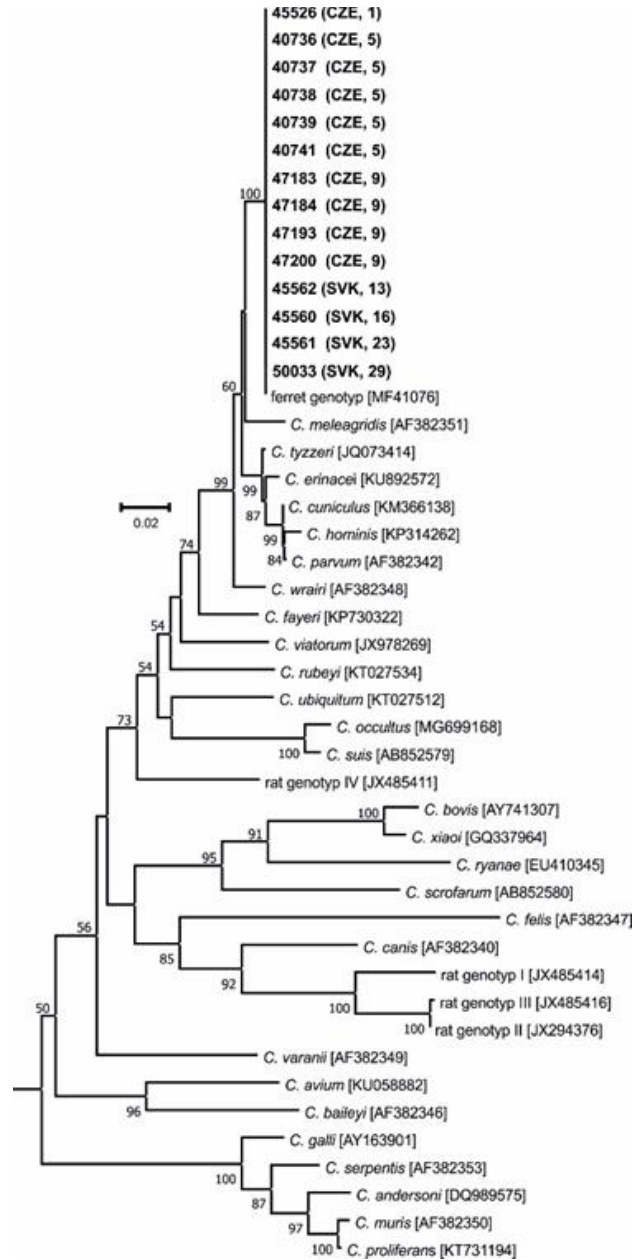
Tabulka 3. Mikroskopická detekce (MIK) včetně intenzity infekce vyjádřené jako počet oocyst na gram trusu (OPG) a genotypizace kryptosporidií na základě amplifikace/sekvenace části genů kódujících malou podjednotku rRNA (SSU), aktin a 60 kDa glykoprotein (GP60) na lokalitách v České republice u veverek obecných (*Sciurus vulgaris*).

Lokalita	Počet vyšetřených/ pozitivních	ID vzorku	MIK (OPG)	Genotypizace		
				SSU	Aktin	GP60
1	10/1	45526	Ne	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIbA11G1R1
2	3/0	-	-	-	-	-
3	7/0	-	-	-	-	-
4	4/0	-	-	-	-	-
5	36/5	40736	Ano (56 000)	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIeA10G2R1
		40737	Ano (64 000)	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIcA10G2R1
		40738	Ano (22 000)	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIcA10G2R1
		40739	Ano (72 000)	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIcA10G2R1
		40741	Ano (22 000)	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIeA10G2R1
6	2/0	-	-	-	-	-
7	2/0	-	-	-	-	-
8	3/0	-	-	-	-	-
9	30/4	47183	Ne	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIbA11G1R1
		47189	Ne	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIbA11G1R1
		47193	Ne	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIbA11G1R1
		47200	Ne	ferret genotyp	ferret genotyp	ferret genotyp VIIIbA11G1R1
10	1/0	-	-	-	-	-
11	6/0	-	-	-	-	-
12	7/0	-	-	-	-	-

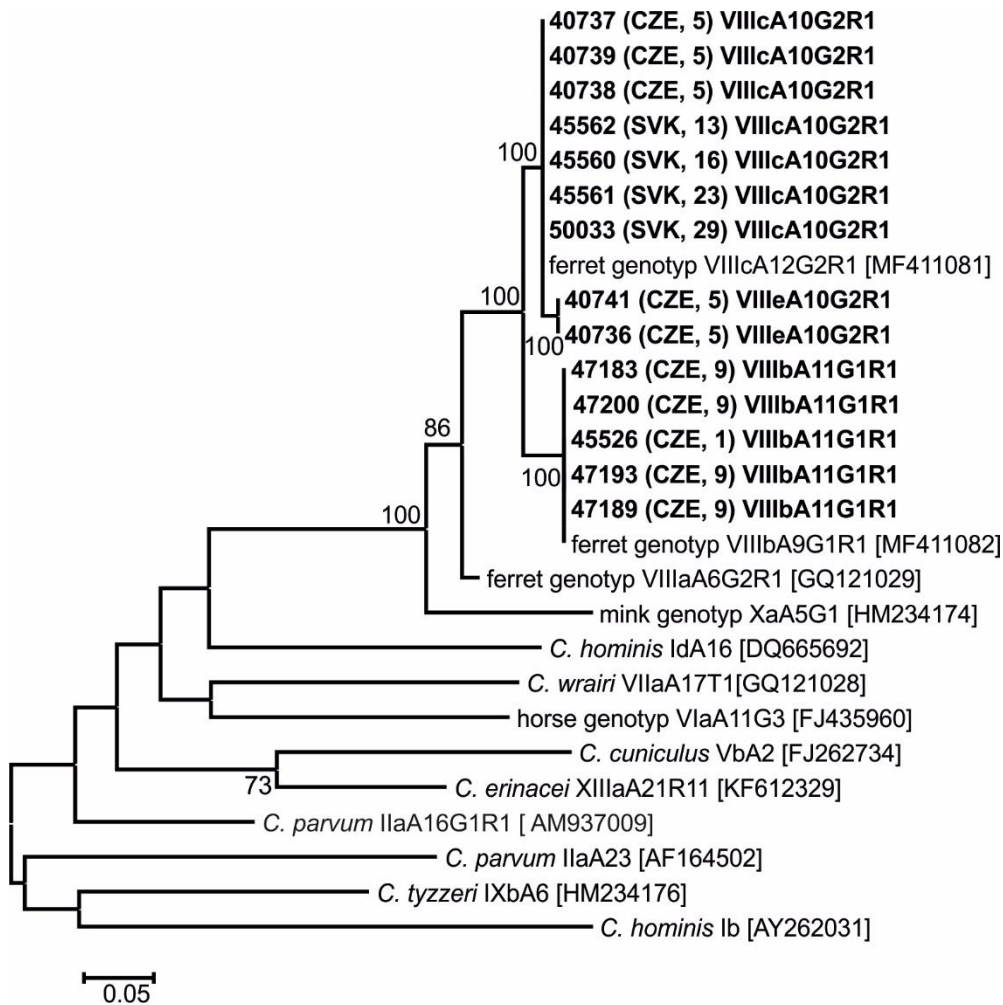
Obrázek 1. Maximum Likelihood fylogenetický strom vypočtený na základě General Time Reversible modelu (+G, +I) z datasetu 51 nukleotidových sekvencí části genu kódujícího malou podjednotku rRNA. Ve finálním datasetu bylo 783 nukleotidových pozic. Finální strom byl získán na základě 1000 replikací. Vzorky získané v této studii jsou zvýrazněny tučně. V závorce je uvedena mezinárodní zkratka státu (Česká republika - CZE, Slovensko - SVK) a číslo lokality, kde byl vzorek získán. U sekvencí získaných z genové bance (GenBank) je v hranaté závorce uvedeno číslo sekvence. Délka větví odpovídá počtu substitucí na pozici. Jako bootstrap byla použita sekvence *Plasmodium falciparum* (JQ627151).



Obrázek 2. Maximum Likelihood fylogenetický strom vypočtený na základě General Time Reversible modelu (+G) z datasetu 47 nukleotidových sekvencí části genu kódujícího aktin. Ve finálním datasetu bylo 732 nukleotidových pozic. Finální strom byl získán na základě 1000 replikací. Vzorky získané v této studii jsou zvýrazněny tučně. V závorce je uvedena mezinárodní zkratka státu (Česká republika - CZE, Slovensko - SVK) a číslo lokality, kde byl vzorek získán. U sekvencí získaných z genové bance (GenBank) je v hranaté závorce uvedeno číslo sekvence. Délka větví odpovídá počtu substitucí na pozici. Jako bootstrap byla použita sekvence *Eimeria maxima* (XM013478337).



Obrázek 3. Maximum Likelihood fylogenetický strom vypočtený na základě General Time Reversible modelu (+G) z datasetu 27 nukleotidových sekvencí části genu kódujícího 60 kDa glykoprotein. Ve finálním datasetu bylo 730 nukleotidových pozic. Finální strom byl získán na základě 1000 replikací. Vzorke získané v této studii jsou zvýrazněny tučně. V závorce je uvedena mezinárodní zkratka státu (Česká republika - CZE, Slovensko - SVK) a číslo lokality, kde byl vzorek získán. U sekvencí získaných z genové bance (GenBank) je v hranaté závorce uvedeno číslo sekvence. Délka větví odpovídá počtu substitucí na pozici.



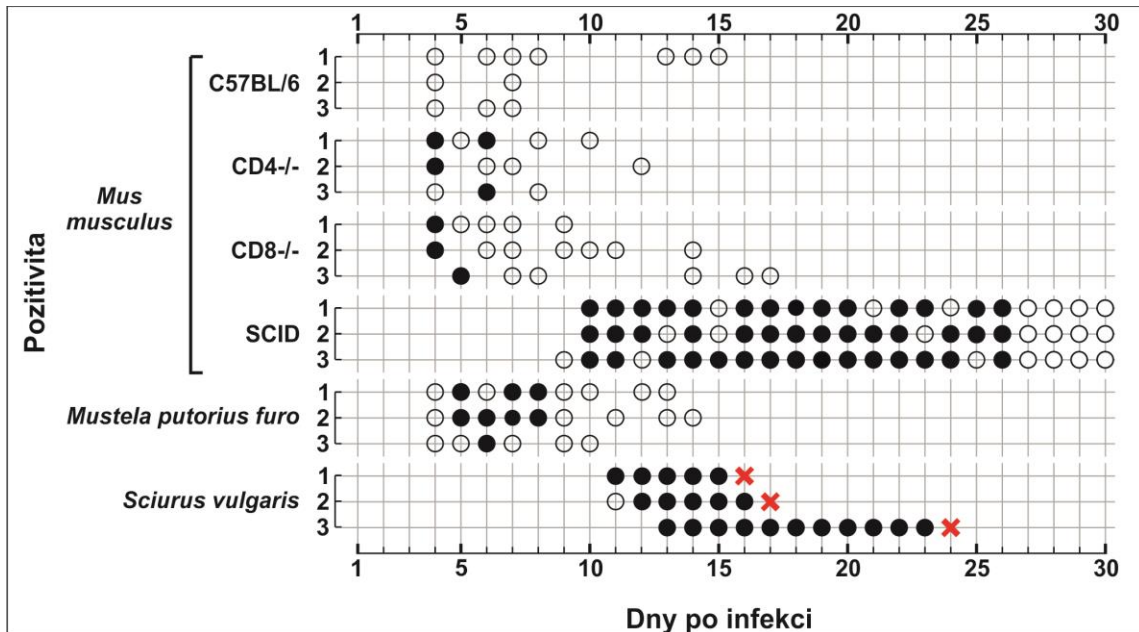
5.2. Vliv pohlaví a stáří na přítomnost kryptosporidiové infekce

Kryptosporidiové infekce byly detekovány u 8 samců a 6 samic (Tabulka 1). Statistická analýza prokázala, že v rámci vyšetřené skupiny zvířat nebyl rozdíl v promořenosti mezi samci a samicemi ($\chi^2=0,0074$; *d.f.* 1; *p*=0,9313). Dále bylo prokázáno, že není rozdíl mezi proměnností mezi mláďaty (*n*=6) a dospělými (*n*=8) jedinci ($\chi^2= 0,0504$; *d.f.* 1; *p*=0,8220).

5.3. Průběh experimentální infekce *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I

Všechna zvířata pro experimentální infekce se nakazila, ale lišila se v průběhu infekce. U myši kmene C57BL/6J, CD4^{-/-} a CD8^{-/-} se průběh výrazně nelišil, jejich prepatentní perioda byla 4–5 dní. Množství vylučovaných oocyst se pohybovalo mezi 2000–6000 OPG. Myši neměly žádné klinické příznaky a došlo u nich k samovolnému vyléčení v rozmezí od 7. do 17. dne po infekci. U SCID myši se prepatentní perioda pohybovala v rozmezí 9–10 dní a zvířata vylučovala velké množství oocyst každý den (10000–50000 OPG) a k samovolnému vyléčení během experimentu nedošlo. U infikovaných myši SCID byla pozorována změna trusu z pevných pelet na pastovitou konzistenci. U fretek domácích probíhala infekce podobně jako u myši kmene C57BL/6J, CD4^{-/-} a CD8^{-/-} a prepatentní perioda byla 4 dny. Klinickými příznaky u fretek bylo zvracení a vodnatý průjem 6.–7. den po infekci. K samovolnému vyléčení došlo 10.–14. den po infekci. Intenzita infekce se pohybovala od 2000 do 20000 OPG. U veverek obecných byla prepatentní perioda v délce 11–13 dní. Veverky měly velmi výrazné klinické příznaky, které se projevovaly zvracením a vodnatými průjmy. Všechny veverky přestaly přijímat krmivo krátce po uplynutí prepatentní periody a v rozmezí od 16. do 24. dne po infekci uhynuly. Intenzita infekce u veverek se pohybovala v rozmezí 100000–250000 OPG.

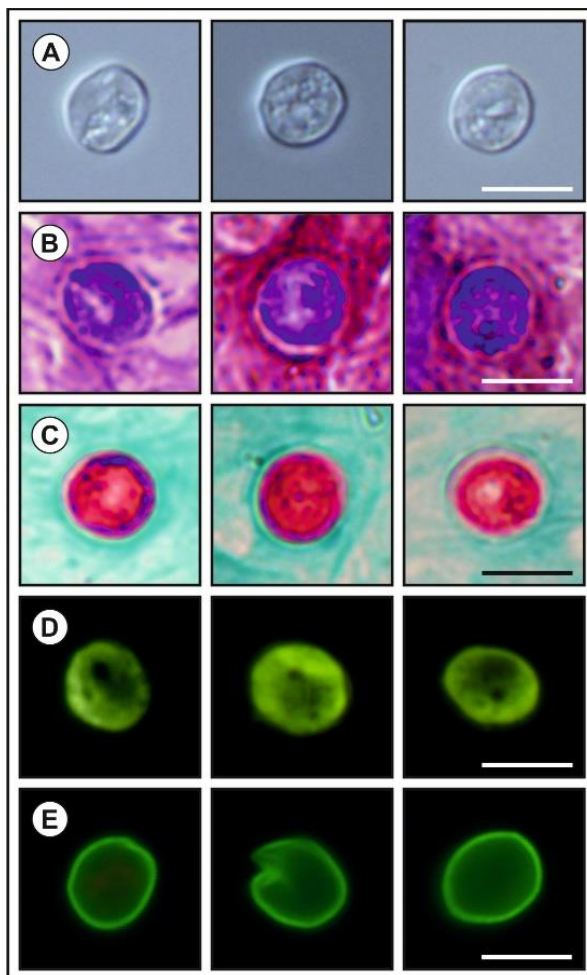
Obrázek 4. Průběh infekce u myši kmene C57BL/6J, myši kmene CD4^{-/-}, myši kmene CD8^{-/-}, myši SCID (*Mus musculus*), fretek domácích (*Mustela putorius furo*) a veverek obecných (*Sciurus vulgaris*). Bílé kruhy znázorňují přítomnost specifické DNA kryptosporidií a černé kruhy znázorňují mikroskopicky pozitivní vzorky. Křížek značí úhyn zvířete.



5.4. Morfometrie oocyst *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I

Velikost oocyst získaných od experimentálních zvířat byla $5,64 (5,50-5,89) \times 5,37 (4,86-5,60) \mu\text{m}$ s indexem 1,05 (1,01-1,14). Oocysty chipmunk genotyp I se barví stejně jako oocysty ostatních druhů a genotypů kryptosporidií danými barvenými. Protilátky, které byly primárně vytvořené proti stěně oocysty druhu *C. parvum*, značí stěnu *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I. Oocysty jsou lehce okrouhlého až oválného tvaru. Jsou vylučovány plně infekce schopné.

Obrázek 5. *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I zobrazený ve specifických barveních. **A.** Diferenciální interferenční kontrast **B.** Barvení anilin-karbol-methylvioletí **C.** Barvení dle Ziehl-Neelsena **D.** Barvení auramine fenolem **E.** Značení pomocí specifických protilátek proti stěně oocysty. Měřítka 5 μm .



6. DISKUZE

Naše studie prokázala, že prevalence kryptosporidií u 157 získaných vzorků trusu od veverek obecných z 11 lokalit v České republice byla 11,1 % a z 15 lokalit na Slovensku byla 1,84 %. Toto je první studie o výskytu kryptosporidií u veverek ve střední Evropě. Námi zjištěné výsledky jsou obdobné jako v nedávno publikované studii ze severní Itálie, kdy byla zjištěna prevalence 4,5 % u veverek obecných (Prediger et al. 2017). Naopak ve dřívější studii z roku 2008, taktéž na severu Itálie, byla zjištěna prevalence u veverek obecných 24,3 % (Kváč et al. 2008). Obdobně vysoká prevalence, 37,5 %, byla zjištěna u veverek popelavých v USA (Feng et al. 2007).

V souladu s výsledky Kváče et al. (2008) a Prediger et al. (2017) jsme prokázali, že infekce u přirozeně nakažených veverek obecných *Cryptosporidium ferret* genotyp probíhá bezpříznakově a nakažení jedinci vylučují velmi malé množství oocyst. Přestože žádná předchozí ani tato studie neprokázala vliv věku na výskyt infekcí (Kváč et al. 2008; Prediger et al. 2017), v této práci jsme pozorovali, že pouze mláďata vylučovala mikroskopicky detekovatelné množství oocyst. V porovnání se studií Prediger et al. (20018), která popsala mikroskopickou detekci oocyst u 70 % veverek, jsme detekovali výrazně menší počet veverek (36 %) vylučující mikroskopicky detekovatelné množství oocyst.

Zjistili jsme, že prevalence u mladých a dospělých jedinců, u samic a samců byla téměř totožná. Z toho lze usuzovat, že pohlaví ani věk hostitele nemá vliv na infekci způsobenou *Cryptosporidium ferret* genotypem. Ke stejnému závěru došli i Prediger et al. (2017) ve studii provedené v Itálii. Naopak u zemních veverek (*Spermophilus beecheyi*) infikovaných druhem *C. parvum* (mohlo se jednat o jiný druh, nebyla provedena genotypizace) bylo zjištěno, že samci byly téměř dvakrát častěji infikováni než samice a také mláďata byla častěji pozitivní než dospělci (Atwill et al. 2001). Obdobná věková specifita u druhu *C. parvum* byla popsána u mláďat hospodářských zvířat, zejména skotu. Zatímco telata dojených plemen jsou infikována tímto druhem ze 70-100 %, u dospělých zvířat se tato kryptosporidie vyskytuje jen ojediněle (Thompson et al. 2019).

V souladu s výsledky Prediger et al. (2017) jsme v této práci detekovali u veverek obecných výhradně *Cryptosporidium ferret* genotyp. Dá se tedy předpokládat, že

Cryptosporidium ferret genotyp je dominantním genotypem kryptosporidií u veverek obecných. Druhy a genotypy *Cryptosporidium ubiquitum*, *Cryptosporidium* skunk genotyp a *Cryptosporidium* chipmuk genotyp I, které byly popsány u veverek popelavých, nebyly v naší studii detekovány a není známo, že by se vyjma *C. ubiquitum*, vyskytovaly na území České republiky (Kellerová et al. 2017; Kotková et al. 2016).

U vyšetřovaných veverek z naší studie, které byly přirozeně nakažené *Cryptosporidium ferret* genotyp nebyly pozorovány žádné klinické příznaky, stejně jako popisují Prediger et al. (2017) ve své studii ze severní Itálie. Obdobně popisují Abe et al. (2003) absenci klinických příznaků u infikovaných fretek v Japonsku. Také ostatní studie se shodují na tom, že *Cryptosporidium ferret* genotyp nezpůsobuje klinické onemocnění u volně žijících zvířat (Abe et Iseki 2003; Kváč et al. 2008; Lv et al. 2009; Song et al. 2015; Sulaiman et al. 2000; Xiao et al. 1999).

Původní izolát *Cryptosporidium ferret* genotyp byl na základě genotypizace na genu gp60 zařazen do alelické rodiny VIIIa (Lv et al. 2009). Prediger et al. (2017) popsala u veverek v severní Itálii výskyt dalších tří variant, a to VIIIbA11G1R1, VIIIcA12G2R1 a VIIIIdA16G1R1. V této práci jsem ve shodě s výsledky Prediger et al (2017) detekovala přítomnost varianty VIIIb a VIIIc. Nicméně jednotlivé subtypy detekované v této práci se neshodovaly s dřívějšími studii. Na základě podrobné analýzy jsme zjistili, že varianta VIIIId nepatří ke *Cryptosporidium ferret* genotyp, ale jedná se variantu již dříve popsaného druhu *C. parvum*, a měla by být správně označena jako IIa. Kromě výše popsaných variant, jsme detekovali dosud neznámou variantu, kterou jsme označili jako VIIIe.

Stejně jako Prediger et al. (2017), tak v této práci jsme nedetekovali u veverek obecných žádnou infekci způsobenou *Cryptosporidium* chipmuk genotyp I, přestože Kváč et al. (2008) popsali výskyt této kryptosporidie u dvou veverek obecných v Itálii. V našem experimentu jsme zjistili, že *Cryptosporidium* chipmuk genotyp I je pro veverky obecné velice infekční. Všechny veverky v experimentu na infekci uhynuly velmi rychle. Závěry vyslovené na základě terénního sledování v práci Prediger et al. (2017) jsou tedy nepřesné a zkreslené. Na základě našich výsledků se domníváme, že *Cryptosporidium* chipmuk genotyp I, který byl do Itálie zavlečen spolu s veverkami popelavými, je pro veverky obecné velmi patogenní a je příčinou rychlého a náhlého

úhynu veverek obecných. S ohledem na pozorovaný průběh infekce se dá předpokládat, že takto postižená veverka zůstává ve svém hnízdě, kde hyne a proto je ji těžké v přírodě odchytil. *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I byl dosud nalezený u volně žijících veverek v Itálii a Velké Británii (Kváč et al. 2008; Prediger et al. 2017), ale v České republice ani na Slovensku nebyl detekován. Tato skutečnost je způsobena faktem, že *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I pochází z veverek popelavých, které se zatím nerozšířily do střední Evropy.

Oocysty *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I v této studii s velikostí 5,64 (5,50–5,89) × 5,37 (4,86–5,60) μm jsou velikostně shodné s oocystami popsány Kváčem et al. (2008), které měřily 5,8 ± 0,3 × 5,4 ± 0,3 μm. Morfologie a morfometrie oocyst *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I je velmi podobná jako u *Cryptosporidium* ferret genotyp, který má velikost oocyst 5,5 (4,8–6,1) × 5,1 (4,7–5,7) μm (Kváč et al. 2008). Ve velikosti oocyst obou genotypů je malý rozdíl, který je velmi těžko mikroskopicky odlišitelný a proto nelze velikost oocyst považovat za vhodný diagnostický znak při určování druhu a genotypu kryptosporidie. Také velikost oocyst u ostatních druhů, které byly u veverek detekovány - *C. parvum* (5,0 × 4,5 μm) nebo *C. ubiquitum* (4,1–5,3 × 4,3–5,0 μm) mají podobnou velikost jako *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I a *Cryptosporidium* ferret genotyp (Fayer et al. 2010; Upton et Current 1985). Naproti tomu oocysty druhu *C. muris* (8,4 × 6,3 μm; Iseki 1986) jsou mnohem větší a lze je od ostatních druhů a genotypů spolehlivě odlišit.

Experimentálně jsme prokázali, že SCID myši jsou vnímavé k infekci *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I, dlouhodobě vylučují a můžou být dobrým modelovým hostitelem pro udržení izolátu v laboratorních podmínkách. U *Cryptosporidium* ferret genotyp doposud takovýto hostitel nebyl nalezen.

Cryptosporidium ferret genotyp nebyl dosud popsán u člověka, proto nejsou veverky obecné v České republice a na Slovensku zdrojem kryptosporidií pro člověka. Naproti tomu *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I, který se nejčastěji vyskytuje u veverek, je pro člověka infekční (Guo et al. 2015; Lebbad et al. 2013). Infekce tímto genotypem byly u lidí popsány v USA, Švédsku a Francii (Anofel *Cryptosporidium* National Network 2010; Guo et al. 2015; Lebbad et al. 2013).

7. ZÁVĚRY

- Prevalence zjištěná u veverek obecných (*Sciurus vulgaris*) v České republice byla 11,1 % a na Slovensku 1,84 %.
- Veverky v České republice a na Slovensku byly parazitovány pouze *Cryptosporidium ferret* genotypem.
- Infekce *Cryptosporidium ferret* genotypem není u veverek doprovázena klinickými příznaky.
- Veverky v České republice a na Slovensku nepředstavují zdroj zoonotických kryptosporidií.
- Nebyl prokázán vliv mezi kryptosporidiovými infekcemi a pohlavím a věkem veverek.
- Byla zjištěna vysoká patogenita *Cryptosporidium chipmunk* genotyp I pro veverky obecné se 100% mortalitou.
- Velikost oocyst *Cryptosporidium chipmunk* genotyp I je $5,64 (5,50-5,89) \times 5,37 (4,86-5,60) \mu\text{m}$ s indexem 1,05 (1,01-1,14).
- SCID myši představují vhodný laboratorní model pro udržování *Cryptosporidium chipmunk* genotyp I.

8. LITERATURA

2008: "The IUCN Red List of Threatened Species" (On-line). (20. 3. 2020) dostupné z: http://www.iucnredlist.org/documents/mammals/gma_redlist_by_famil_v1223563405.xls.

Abe N., Iseki M. 2003: Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from ferrets in Japan. Parasitol. Res. 89: 422–424.

Abubakar I., Aliyu S. H., Arumugam C., Usman N. K., Hunter P. R. 2007: Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. Brit. J. Clin. Pharm. 63, 387–393.

Anderson S., J. Jones. 1984: Orders and Families of Recent Mammals of the World. United States of America: Wiley-Interscience Publication.

Anofel *Cryptosporidium* National Network 2010: Laboratorybased surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006–2009. Euro Surveill. 15: 19642.

Arrowood M. J., Donaldson K. 1996: Improved purification methods for calfderived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. Journal of Eukaryotic Microbiology 43: 89S.

Arrowood M. J., Sterling C. R. 1987: Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. Journal of Parasitology 73: 314–319.

Atwill E. R., Camaro S. M., Phillips R., Alonso L. H., Tate K. W., Jensen W. A., Bennet J., Little S., Salmon T. P. 2001: Quantitative Shedding of Two Genotypes of *Cryptosporidium parvum* in California Ground Squirrels (*Spermophilus beecheyi*). Appl. Environ. Microbiol. 67: 2840–2843.

Bertolino S., Wauters L. A., De Bruyn L., Canestri-Trotti G. 2003: Prevalence of coccidia parasites (Protozoa) in red squirrels (*Sciurus vulgaris*): effects of host phenotype and environmental factors. Oecologia 137: 286–295.

Cacció S. M., de Giacomom M., Pozio E. 2002: Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int. J. Parasitol.* 32: 1023–1030.

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. *Parasitol.asitology Research.* 85: 899–904.

Corlis J. O., 1994: An interim utilitarian ('user-friendly') hierarchical classification and characterization of the protists, *Acta Protozool.* 33:1–51 .

Current W. L. 1989: *Cryptosporidium* spp. In: Walzer P.D.,Genta R. M. (eds) *Parasitic infections in the compromised host.* Dekker, New York, pp 281–341.

Current W. L., Upton S. J., Haynes T. B. 1986: The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The JournalJ. of Protozoology.* 33: 289–296.

da Silva A. J., Caccio S., Williams C., Won K.Y., Nace E.K., Whittier C. 2003: Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. *Vet. Parasitol.* 111: 297–307.

Davies A. P., Campbell B., Evans M. R., Bone A., Roche A., Chalmers R. M. 2009: Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United kingdom. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 838–840.

Elwin K., Hadfield S. J., Robinson G., Chalmers R. M. 2012b. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. *Epidemiol. Infect.* 140: 673–683.

Fayer R., Santin M., Macarisin D. 2010: *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet Parasitol.* 2010: 172: 23–32.

Fayer R. 2008: The General Biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer, R., Xiao, L., editors. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 1–42.

Fayer R., Speer C. A., Dubey J. P. 1997: The general biology of *Cryptosporidium*. In: R. Fayer (Ed.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC press, Boca. Raton., 1–42.

Fayer R., Ungar B. L. P. 1986: *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50: 458–483.

Feltus, D. C., Giddings, C. W., Schneck, B. L., Monson, T., Warshauer D., McEvoy, J. M. 2006: Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4303–4308.

Feng Y., Aldersio K. A., Yang W., Blancero L. A., Kuhne W. G., Nadareski C. A., Reid M., Xiao L. 2007: *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 6475–6483.

Feng Y., Lal A. A., Li N., Xiao L. 2011: Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.* 127: 238–242.

Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Ares-Mazas, E., 2007: First report of *Cryptosporidium parvum* ‘ferret’ genotype in American mink (*Mustela vison* Shreber 1777). *Parasitol. Res.* 100: 877–879.

Guo Y., Cebelinski E., Matusevich C., Alderisio K. A., Lebbad M., McEvoy J., Roellig D. M., Yang C., Feng Y., Xiao L. 2015b: Subtyping novel zoonotic pathogen *Cryptosporidium* chipmunk genotype I. *J. Clin. Microbiol.* 53: 1648–1654.

Gurnell, J. 1987: *The Natural History of Squirrels*. New York: Facts on File Inc.

Hayssen V. 2008: Patterns of Body and Tail Length and Body Mass in Sciuridae. *Journal of Mammalogy*, 89/4: 852-873.

Henriksen S. A., Pohlentz J. F. 1981: Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.* 22: 594-596.

Hijjawi N. S., Meloni B. P., Ryan U. M., Olson M. E., Thompson R. C. A. 2002: Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* 32: 1719–1726.

Hůrková L., Hajdušek O., Modrý D. 2003: Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. *Wildl. Dis.* 39: 441–444.

Iseki M., 1986: Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Parasitol.*, 35: 521–526.

Jansa S., Myers P. 2000: "Family Sciuridae" (On-line). *Animal Diversity Web.* (20. 3. 2020) dostupné z: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Sciuridae.html>.

Jellison K. L., Lynch A. E., Ziemann J. M. 2009: Source tracking identifies deer and geese as vectors of human-infectious *Cryptosporidium* genotypes in an urban/suburban watershed. *Environ Sci Technol.* 43:4267–72.

Jiang J., Alderisio K. A., Xiao L. 2005: Distribution of *cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4446–4454.

Katsumata T., Hosea D., Ranuh I. G., Uga S., Yanagi T., Kohno S. 2000: Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 70–72.

Kellnerová K., Holubová N., Jandová A., Vejčík A., McEvoy J., Sak B., Kváč M. Eur J. Protistol. 2017: First description of *Cryptosporidium ubiquitum* XIIa subtype family in farmed fur animals 59:108-113.

Korich D. G., Mead J. R., Madore M. S., Sinclair N. A., Sterling C. R. 1990: Effect of ozone, chlorine, dioxide, chlorine and monochlorimine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability, *Applied and Environmental microbiology* 56(5): 1423-1428.

Kotkova M., Nemejc K., Sak B., Hanzal V., Kvetonova D., Hlaskova L., Condlova S., McEvoy J., Kváč M. 2016: *Cryptosporidium ubiquitum*, *C. muris* and *Cryptosporidium* deer genotype in wild cervids and caprines in the Czech Republic. *Folia Parasitol (Praha)* 25:63.

Kváč M., Hofmannová L., Bertolino S., Wauters L., Tosi G., Modrý D. 2008: Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitol.* 55: 95–99.

Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. 2007: Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*) 143: 229–233.

Lebbad M., Beser J., Insulander M., Karlsson L., Mattsson J. G., Svenungsson B., Axen C. 2013: Unusual cryptosporidiosis cases in Swedish patients: extended molecular characterization of *Cryptosporidium viatorum* and *Cryptosporidium* chipmunk genotype I. *Parasitology* 140: 1735–1740.

Lesnianska K., Perec-Matysiak A., Hildebrand J., BunkowskaGawlik K., Pirog A., Popiolek M. 2016: *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in introduced raccoons (*Procyon lotor*) – first evidence from Poland and Germany. *Parasitol. Res.* 115: 4535–4541,

Ley D. H., Levy M. G., Hunter L., Corbett W., Barnes H. J. 1988: *Cryptosporidia*-Positive Rates of Avian Necropsy Accessions Determined by Examination of Auramine O-Stained Fecal Smears. *Avian Dis.* 32 1:108–13.

Lindsay D. S., Blagburn B. L. 1990: Cryptosporidiosis in birds. In: Dubey J. P., Speer C. A., Fayer R. (Eds.), *Cryptosporidiosis in man and animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, 370 pp.

Lurz P. 2011: "Squirrels and Relatives III: Tree Squirrels" (On-line). Grzimek's Animal Life. (20. 3. 2020) dostupné z: <http://animals.galegroup.com.proxy.lib.umich.edu>.

Lv Ch., Zhang L., Wang R., Jian F., Zhang S., Ning Ch., Wang H., Feng Ch., Wang X., Ren X., Qi M., Xiao L. 2009: *Cryptosporidium* spp. in Wild Laboratory and Pet Rodents in China: Prevalence and Molecular Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7692–7699.

Mathieu E., Levy D. A., Veverka F., Parrish M., Sarisky J., Shapiro N., Johnston S., Handzel T., Hightower A., Xiao L., Lee Y., York S., Arrowood M., Lee R., Jones J. L. 2004: Epidemiologic and environmental investigation of a recreation water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000 p.528-589.

Meisel J. L., Perera D. R., Meligro C., Rubin C. E., 1976: Overwhelming watery diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70: 1156–1160

Melicherová J., Ilgová J., Kváč M., Sak B., Koudela B., Valigurová A. 2013: Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology*: 141:287–303.

Michaux J., Hautier L., Simonin T., Vianey-Liaud M. 2008. Phylogeny, adaptation, and mandible shape in Sciuridae (Rodentia, Mammalia). *Mammalia*, 72/4: 286-296.

Miláček P., Vítovec J. 1985: Differential staining of cryptosporidia by anilinecarbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica* 32: 50.

Nichols R. A., Connelly L., Sullivan C. B., Smith H. V. 2010: Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in Scottish raw and drinking waters during a one-year monitoring period. *Appl Environ Microbiol.* 76:5977–86.

Nime F. A., Burek J. D., Page D. L., Holscher, M. A., Yardley J. H. 1976: Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70, 592–598.

Nowak, R. 1991: Walker's Mammals of the World 5th Edition, Volume I. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press.

Prediger J., Hořčíčková M., Hofmannová L., Sak B., Ferrari N., Mazzamuto M. V., Romeo C., Wautrs L. A., McEvoy J., Kváč M. 2017: Native and introduced squirrels in Italy host different *Cryptosporidium* spp. 61: 64 – 75.

Rengifo-Herrera C., Ortega-Mora L. M., Gómez-Bautista M., García-Moreno F. T., García-Párraga D., Castro-Urda J., Pedraza-Díaz S. 2011: Detection and Characterization of a *Cryptosporidium* Isolate from a Southern Elephant Seal (*Mirounga leonina*) from the Antarctic Peninsula p. 1524–1527.

Robertson B., Sinclair M. I et al. 2002: Case-control studies of sporadic cryptosporidiosis in Melbourne and Adelaide, Australia. *Epidemiol Infect* 128:419–431

Robinson G., Elwin K., Chalmers R. M. 2008: Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1800–1802,

Rose J. B. 1997: Enviromental ekology of *Cryptosporidium* and public health implications. 18: 135161.

Ruecker N. J., Matsune J. C., Wilkes G., Lapen D. R., Topp E., Edge T. A., Sensen C. W., Xiao L., Neumann N. F. 2012: Molecular and phylogenetic approaches for assessing sources of *Cryptosporidium* contamination in water. *Water Research* 46: 5135-5150.

Seebeck, J. 1989: "Fauna of Australia 46. Sciuridae" (On-line). (20. 3. 2020) dostupné z: <http://www.environment.gov.au/biodiversity/abrs/publications/fauna-of-australia/pubs/volume1b/46-ind.pdf>.

Slavin D. 1955: *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparitive Pathology* 65: 262–266.

Song Ch., Zhang S., Huang H. 2015: Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes 6: 1049.

Stenger L. S. B., 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 36: 287 – 293.

Steppan S., Hamm S. 2006: "Sciuridae. Squirrels. Version 13 May 2006" (On-line). The Tree of Life Web Project. (20. 3. 2020) dostupné z: <http://tolweb.org/Sciuridae/16456/2006.05.13>.

Sulaiman I. M., Morgan U. M., Thompson R. C. A., Lal A. A., Xiao L. H. 2000: Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70- kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2385–2391.

Sundberg J., Hill D., Ryan M. 1982: Cryptosporidiosis in a gray squirrel. *JAVMA* 181: 1420–1422.

Thompson R. C., Olson M. E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M. S., Hijjawi N. S. 2005: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology* 59: 77–158.

Thomson S., A Innes E., N Jonsson N., Katzer F. 2019: Shedding of *Cryptosporidium* in Calves and Dams: Evidence of Re-Infection and Shedding of Different gp60 Subtypes 146 (11): 1404-1413

Thorington R., Ferrell K. 2006: *Squirrels - The Animal Answer Guide*. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press.

Tyzzer E. E. 1907: A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 5: 12.

Tyzzer E. E. 1910: An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical Research* 23: 487–509.

Tyzzer E. E. 1912: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde* 26: 394–412.

Upton S. J., Current W. L. 1985: The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) infecting mammals. *Journal of Parasitology* 71: 625–629.

Vernes K. 2004: Breeding biology and seasonal capture success of northern flying; squirrels and red squirrels in southern new brunswick. *Northeastern Naturalist*, 11: 123-137.

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 B* 53: 239–243.

Xiao L. 2010: Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology* 124: 80–89.

Xiao L., Escalante L., Yang C., Sulaiman I., Escalante A. A., Montali R. J., Fayer R., Lal A. A. 1999: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol* 65: 1578–1583.

Xiao L., Ryan U. M. 2008: Molecular epidemiology. In: Fayer R, Xiao L (eds) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, pp 119–172

Xiao L. 2010: Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol.* 124:80–9.

Xiao L., Sulaiman I. M., Ryan U. M., Zhou L., Atwill E. R., Tischler M. L. 2002: Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int J Parasitol.* 32:1773–85.

Yang W., Chen P., Villegas E. N., Landy R. B., Kanetsky C., Cama V. 2008: *Cryptosporidium* source tracking in the Potomac River watershed. *Appl Environ Microbiol.* 74:6495–504.

Ziegler P. E., Wade E., Schaaf S. L., Chang Y. F., Mohammed H. O. 2007a.: *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York City watershed. *J. Wildl. Dis.* 43, 586–596.