

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**KRYPTOSPORIDIE A KRYPTOSPORIDIÓZA
CHOVANÝCH A ZDIVOČELÝCH NUTRIÍ**

Diplomová práce

Bc. Zlata Limpouchová

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

Školitel specialista: Ing. Nikola Holubová

České Budějovice, 2021

Limpouchová Z., (2021): Kryptosporidie a kryptosporidióza chovaných a zdivočelých nutrií. [*Cryptosporidium* and cryptosporidiasis in farmed and feral nutrias, Mgr. Thesis, in Czech] – 63 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice

Annotation:

Cryptosporidium spp., common parasite of vertebrates, remain poorly studied in wildlife. This study describes the novel *Cryptosporidium* species adapted to nutria (*Myocastor coypus*). A total of 247 faecal samples of feral and farmed nutrias were collected from locations in the Czech Republic and Slovakia and examined for *Cryptosporidium* spp. oocysts and specific DNA at the SSU, actin, HSP70, and gp60 loci.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b 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. 4. 2021

.....
Zlata Limpouchová

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za odborné vedení mé práce, trpělivost a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala i mé školitelce specialiste Ing. Nikole Holubové, za pomoc při práci. Velké poděkování patří také celému kolektivu Laboratoře veterinární a lékařské protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za jejich ochotu, vstřícnost a vytvoření příjemného prostředí. Dále děkuji všem, kteří mi poskytli vzorky trusu z nutrií, zejména doc. MVDR. Dušanu Rajskému, CSc.

Velké poděkování patří také mé rodině, přítelovi a přátelům za podporu během celého studia.

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

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

Obsah

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1. Nutrie	2
2.2. Kryptosporidie	2
2.2.1. Taxonomie kryptosporidií	3
2.2.2. Vývojový cyklus kryptosporidií	3
2.2.3. Kryptosporidie a kryptosporidióza savců	5
2.2.4. Kryptosporidie a kryptosporidióza hlodavců	6
2.2.5. Kryptosporidie a kryptosporidióza nutrií	7
3. CÍLE PRÁCE	10
4. MATERIÁL A METODIKA	11
4.1. Materiál	11
4.1.1. Získávání biologického materiálu z nutrií	11
4.1.2. Zvířata pro experimentální infekce	11
4.2. Metody	12
4.2.1. Mikroskopické vyšetření	12
4.2.2. Molekulární vyšetření	15
4.2.3. Purifikace oocyst	21
4.2.4. Design experimentu	22
4.2.5. Odběr vzorků, orgánů a tkání	23
5. Výsledky	27
6. Diskuze	38
7. Závěry	42
8. Literatura	43

1. ÚVOD

Paraziti jsou nedílnou součástí života. Svým parazitickým způsobem života způsobují infekční onemocnění jak u lidí, tak u zvířat a rostlin, a proto by nemělo být opomíjeno jejich studium. Jedním z infekčních onemocnění, které se vyskytuje u všech obratlovců je i kryptosporidióza. Toto onemocnění je často spojováno s průjmy, které mohou být závažné až smrtelné (Ryan et Xiao 2014), známé jsou ovšem i infekce bez klinických příznaků (Nakamura et Meireles 2015; Zintl et al. 2007). Původci tohoto onemocnění jsou paraziti rodu *Cryptosporidium* patřící do kmene Apicomplexa (Carreno et al. 1999). Genetické a biologické studie prokázaly vysokou rozmanitost rodu *Cryptosporidium*, přičemž velká část této rozmanitosti byla pozorována u volně žijících živočichů (Čondlová et al. 2019; Horčíčková et al. 2019; Ryan et al. 2015; Stenger et al. 2017; Wei et al. 2019; Zahedi et al. 2017). Doposud bylo popsáno 46 platných druhů (Holubová et al. 2019; Ježková et al. 2021) a více než 100 genotypů, které byly od platných druhů odlišeny převážně na základě molekulárních rozdílů a pravděpodobně představují samostatné druhy (Ryan et Xiao 2014). Přesto ještě zbývá objevit mnoho o rozmanitosti rodu *Cryptosporidium* a jeho hostitelské oblasti. Tato práce se proto zabývá dalším studiem diverzity kryptosporidií na dosud neprobádaném „území“ – u chovaných a zdivočelých nutrií.

Nutrie (*Myocastor coypus*), je vodní hlodavec pocházející původně z Jižní Ameriky. Ovšem především díky kvalitě srsti, kterou nutrie mají, byly nutrie z komerčních důvodů rozšířeny do mnoha zemí mimo jejich původní oblast výskytu (Carter et al. 2002). V mnoha regionech, kde byly nutrie chovány pro jejich maso a kožešinu nebo jako domácí mazlíčci, vytvořili ze zajetí uniklí jedinci místní divokou populaci. V současné době se zdivočelé nutrie vyskytují na všech kontinentech a jsou zahrnuty do seznamu mezi 100 invazních nepůvodních druhů s významným dopadem na Evropskou unii (Tsiamis et al. 2017). Paraziti divokých, zdivočelých a chovaných nutrií byli dosud málo studováni (Babero et Lee 1961; Kellnerová et al. 2017; Martino et al. 2018). A proto se tato práce zabývá studiem parazitů rodu *Cryptosporidium* u chovaných a zdivočelých nutrií na území České republiky a Slovenska.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Nutrie

Nutrie (*Myocastor coypus*) je vodní hlodavec pocházející z Jižní Ameriky, jižně od 230° zeměpisné šířky, včetně Argentiny, Bolívie, jižní Brazílie, Chile, Paraguaye a Uruguaye (Banfield 1974; Ehrlich 1967; Kinler et al. 1987, 1992a). Nutrie byly dlouho oceňovány jako kožešinová zvířata, což vedlo k jejich rozšíření téměř po celém světě. K největšímu rozšíření farmového chovu těchto hlodavců došlo v Evropě a Severní Americe (Evans 1970). Zvířata, uniklá z těchto farem, nebo v mnoha případech záměrně vypuštěná do volné přírody, se následně stala základem zdivočelé populace nutrií (Bounds 2000; Dozier 1952; Evans 1970; Kinler 1992b). V mnoha ekosystémech se nutrie staly obtěžujícími druhy, protože jejich stravovací návyky ničí močálové vegetace, způsobují značné škody na zemědělských plodinách a jejich nory znemožňují kontrolu nad vodními strukturami (Grace 1992; Linscombe et al. 1981; Linscombe et Kinler 1997). Nicméně v mnoha zemích je nutrie považována za vítaný zdroj kožešiny (Aliev 1967). Jejich klasifikace jako škůdce často závisela na ceně jejich kožešin v daném státě (Lowery 1974). Vysoké ceny kožešin mají za následek cílené odchyty nutrií, čímž dochází ke snížení populace a zmírnění poškození životního prostředí, které nutrie může způsobit (Kinler et al. 1987). Naopak, nízké ceny kožešin obvykle vedou ke snížení lovu nutrií, což umožňuje populacím nutrií překročit únosnou míru rozšíření (Carter et al. 1999; Gosling et Baker 1987; Kinler et al. 1987).

Do České republiky byly nutrie poprvé dovezeny v roce 1924 z Argentiny (Anděra et al. 2003). Farma, kam byly nutrie dovezeny, se tak stala vůbec první farmou s nutriemi v Evropě. Tato farma ovšem nezůstala jedinou farmou, kde byly nutrie chovány. O 10 let později bylo v České republice již 100 farem s těmito hlodavci. Zhruba od 70. let 20. století se nutrie začaly vyskytovat i ve volné přírodě, kam utekly z farem. V současnosti je stálý výskyt hlášen zhruba z 15 % území České republiky a nadále se rozšiřuje, přičemž největší výskyt je v teplejších nížinách středních a východních Čech, Moravy a Slezska. (<https://invaznidruhy.nature.cz/res/archive/318/039183.pdf?seek=1473326128>)

2.2. Kryptosporidie

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření paraziti patřící do kmene Apicomplexa. Infikují epitelální buňky zejména gastrointestinálního traktu, ale také dýchací a urogenitální soustavy různých druhů hostitelů patřících do všech tříd obratlovců (Bones et al. 2019; Fayer et al. 2010; Holubová et al. 2016). Nicméně druhy a genotypy kryptosporidií vyvíjející se v dýchací

a urogenitální soustavě primárně infikují střevo svých hostitelů. Na základě místa infekce dělíme kryptosporidie na dvě monofyletické, morfologicky odlišné skupiny, a to na kryptosporidie s vývojem ve střevě nebo žaludku (Fayer et al. 2007; Kváč et al. 2013; Widmer et al. 2007; Xiao et Ryan 2004). Žaludeční kryptosporidie se vyznačují tím, že jejich oocysty jsou oválné a větší, než oocysty střevních kryptosporidií, jejichž oocysty jsou okrouhlé (Kváč et al. 2018a; Widmer et al. 2007).

V současné době známe 46 platných druhů kryptosporidií, které se mezi sebou liší lokalizací infekce, hostitelskou a věkovou specifitou (Fayer et al. 2007; Holubová et al. 2019; Ježková et al. 2021). Jelikož některé druhy kryptosporidií infikují široké, často překrývající se spektrum hostitelů, a nelze jejich oocysty morfologicky odlišit, byly tyto druhy odlišeny až použitím molekulárních metod (Ryan et Xiao 2014).

2.2.1. Taxonomie kryptosporidií

Paraziti rodu *Cryptosporidium* jsou eukaryotičtí prvoci patřící do kmene Apicomplexa. Kromě eugregarin mají všichni zástupci kmene Apicomplexa komplikovaný životní cyklus skládající se z nepohlavních a pohlavních stádií vedoucí ke sporogonii. Pro kmen Apicomplexa, a tedy i pro kryptosporidie, je typický apikální komplex, který se skládá z apikálního kroužku, conoidu, mikroném, rhoptrií a denzních granulí, a který je důležitý pro invazi do hostitelské buňky (Fayer et al. 1997). Navzdory podobnosti exogenních vývojových stádií a životního cyklu kryptosporidií a kokcidií, ke kterým byly kryptosporidie dříve řazeny (Fayer et al. 1997; Levine 1988), molekulární analýzy naznačují užší fylogenetický vztah s gregarinami, které jsou v současnosti považovány za nejbližší příbuzné kryptosporidií (Carreno et al. 1999).

2.2.2. Vývojový cyklus kryptosporidií

Kryptosporidie mají monoxenní životní cyklus zahrnující čtyři fáze: excystaci, merogonii, gametogonii a sporogonii (Fayer et Xiao 2007; Thompson et al. 2005; Tyzzer 1910).

Excystace

Jakmile se do těla vhodného hostitele dostane oocysta kryptosporidie, prvním krokem k infekci je excystace. Během excystace se otevře stěna oocyst podél švu (sutura) na jednom pólu oocyst, kterou čtyři infekční sporozoiti opustí oocystu. U kryptosporidií vyžaduje excystace, aby byly oocysty vystaveny kyselému prostředí v žaludku a následně expozici pankreatickým enzymům nebo žlučovým solím v tenkém střevě. Za experimentálních podmínek bylo prokázáno, že sporozoiti mohou excystovat z oocyst v teplých vodných

roztocích, což může umožnit autoinfekci a infekce hlášené v extraintestinálních místech, jako je spojivka, dýchací cesty, žlučník, lymfatické uzliny, varlata, vaječníky, děloha a pochva. Při excystaci ve vodním prostředí je ovšem procento excystovaných oocyst menší (Blagburn et al. 1987; Curtiss et al. 2015; Fayer et al. 1990; Fleta et al. 1995).

Sporozoiti, kteří excystují z oocyst, jsou pohybliví a apikálním komplexem se přichycují k hostitelské buňce (Wetzel et al. 2005). Připojení sporozoiti, zpočátku štíhlého tvaru půlměsíce nebo bumerangu, se stávají oválnými nebo sférickými. Jak tento proces internalizace postupuje, sporozoit se stává sférický a mění se na trophozoit (Valigurová et al. 2008).

Merogonie

Asexuální množení zvané merogonie (schizogonie) je výsledkem rozdělení jádra trophozoitů. U většiny dosud studovaných vývojových cyklů byly popsány dva typy merontů (schizontů), pouze u druhu *C. baileyi* byl detekován ještě třetí typ meronta (Current et al. 1986). U druhu *C. parvum* se při první merogonii vyvíjejí osmi jaderní meronti tzv. meronti typu I. Každé z jader je začleněno do merozoitu, což je fáze strukturně podobná sporozoitu (Fayer 2004). Zralý merozoit typu I opouští meront a infikuje jinou hostitelskou buňku a vyvíjí se jako meront I typu nebo vzniká meront typu II. Meronti typu II produkují čtyři merozoity. Meronti typu III u druhu *C. baileyi* produkují osm merozoitů.

Gametogonie

Předpokládá se, že pouze merozoiti z merontů typu II, respektive typu III u *C. baileyi*, iniciují sexuální reprodukci po infikování nových hostitelských buněk diferenciací buď do mikrogamontového (samčího) nebo makrogamontového (samičího) stádia. Mikrogamonti jsou vícejaderní a následně z nich vznikají mikrogamety. Makrogamonti zůstávají jednojaderní a vznikají z nich makrogamety. Mikrogameta oplodní makrogametu a vznikne oocysta, která sporuluje v hostiteli (Current et al. 1986).

Sporogonie

Při sporogonii se jádro meioticky dělí, a tak vznikají čtyři sporozoiti s redukováným počtem chromozomů a reziduální tělísko. Sporulující oocysta je infekční pro další hostitele ihned po vyloučení z hostitele (Fayer et al. 1997; Liu et al. 2009; Xiao et Fayer 2008). Oocysty druhů a genotypů vyvíjejících se v gastrointestinálním traktu jsou vylučovány ve výkalech. Druhy a genotypy parazitující v dýchacích cestách opouštějí tělo buď respiračními a nosními sekrety nebo po spolknutí sekretů výkaly (Current et al. 1986). Některé zprávy naznačují, že oocysty

s tenkými stěnami uvolňují sporozoity, kteří autoinfikují hostitele, zatímco ty se silnějšími stěnami opouštějí tělo, aby infikovaly další hostitele (Current 1985, 1988).

2. 2. 3. Kryptosporidie a kryptosporidióza savců

Zoonózy představují hlavní problém veřejného zdraví na všech kontinentech. Zdá se, že divoká zvířata se podílejí na epidemiologii většiny zoonóz a slouží jako hlavní rezervoáry pro přenos zoonotických původců onemocnění včetně kryptosporidií (Jiang et al. 2005; Kruse et al. 2004; Xiao et al. 2000; Zhou et al. 2004). Na druhou stranu znečištění životního prostředí oocystami kryptosporidií pocházejících z člověka nebo jím chovaných zvířat může vést k nákaze volně žijících zvířat (Appelbee et al. 2005). Tyto složité vztahy přenosu infekce kryptosporidiiemi u savců byly vysvětleny až na základě použití molekulárních metod, kdy byly identifikovány jednotlivé druhy a genotypy kryptosporidií a jejich cesty přenosu (Feng 2010).

Z dosud 46 popsanych druhů kryptosporidií, jich nejvíce (29) bylo nalezeno u savců (Fayer et al. 1997, 2004; Ježková et al. 2021; O'Donoghue 1995). První studie byly primárně zaměřeny na výskyt kryptosporidií u domácích zvířat, která mají ekonomický význam. S rozvojem oboru došlo k rozšiřování výzkumu i na divokou zvěř, která je považována za významný zdroj infekčních onemocnění přenosných nejen na domácí zvířata, ale také na člověka. Přestože je kryptosporidióza primárně spojována s průjmovým onemocněním (Ryan et Xiao 2014; Segura et al. 2015), výsledky nedávných výzkumů ukazují, že většina kryptosporidií, které jsou adaptované na divoká zvířata, nevyvolávají u svých hostitelů žádné nebo ojedinělé klinické příznaky onemocnění. Jako příklad lze uvést v nedávné době řadu nově popsanych druhů kryptosporidií adaptovaných na různé hlodavce – *C. alticolis* a *C. microti* u hrabošů, *C. apodemi* a *C. ditrichi* u myšic, *C. rubeyi* u stromových veverek, *C. ratti* a *C. occultus* u potkanů, *C. homai* u morčat (Čondlová et al. 2018; Horčíčková et al. 2019; Ježková et al. 2021; Kváč et al. 2018a; Li et al. 2015; Zahedi et al. 2017). Nicméně i řada druhů parazitujících u hospodářských zvířat, *C. bovis* a *C. ryanae* u skotu nebo *C. scrofarum* a *C. suis* u prasat, nezpůsobuje významná klinická onemocnění svých hostitelů (Fayer et al. 2005, 2008; Kváč et al. 2013; Ryan et al. 2004). U druhů a genotypů, např. *C. parvum*, *C. ubiquitum*, *C. canis*, *C. felis*, se kterými je nejčastěji spojována kryptosporidióza, je výskyt průjmů většinou pozorován u mladých zvířat (Adesiyun et al. 2001; Bjorkman et al. 2003; Fayer et al. 1998; Roy et al. 2006; Singh et al. 2006; Trotz-Williams et al. 2005). U dospělých savců je infekce kryptosporidiiemi převážně asymptomatická a počet vylučovaných oocyst je nízký

a přerušovaný. Infekce může být často chronická (Ramirez et al. 2004). Na základě terénních studií se předpokládalo, že volně žijící nebo pasená hospodářská zvířata mohou představovat zdroj infekce pro divoká zvířata, s nimiž sdílejí stanoviště a naopak (Dessi et al. 2020; Fayer et al. 2010). Nejčastěji se však jednalo o výskyt druhu *C. parvum*, který je infekční pro většinu savců a některé ptáky (Oliveira et al. 2017; Reboredo-Fernández et al. 2015; Shahbazi et al. 2020), u drobných savců (hlodavců a hmyzožravců) a jelenovitých (Olson et al. 2004). Nicméně studie v posledních letech naznačují, že většina volně žijících zvířat není primárním hostitelem *C. parvum*, a většina domácích a volně žijících savců je primárně infikována hostitelsky specifickými druhy kryptosporidií (Zhou et al. 2004).

2. 2. 4. Kryptosporidie a kryptosporidióza hlodavců

Hlodavci jsou druhově nejbohatší skupina savců. Jedná se většinou o malé pozemní živočichy obývající nejrůznější prostředí. Řada hlodavců se rychle množí a při přemnožení se stávají závažnými škůdci (Papáček et al. 1994). Hlodavci jsou ovšem pozoruhodní i z parazitologického hlediska, jelikož jsou považováni za rezervoáry různých zoonotických chorob jako je například toxoplazmóza, babezióza, leishmanióza a kryptosporidióza (Lv et al. 2009; Seifollahi et al. 2016). Poprvé byla přítomnost oocyst kryptosporidií ve výkalech a přítomnost endogenních stadií kryptosporidií ve tkáních myši popsána v letech 1907 a 1910 Tyzzerem. Od té doby byly u hlodavců nalezeny další druhy kryptosporidií. Přehled těchto druhů je uveden v tabulce 1. Jak je z tabulky patrné u hlodavců bylo doposud nalezeno 14 druhů kryptosporidií. Jedná se o druhy, které parazitují výhradně u hlodavců, ale také o druhy, které mají hlodavce jen jako jednoho z možných hostitelů.

Tabulka 1. Přehled druhů kryptosporidií nalezených u hlodavců.

Druh kryptosporidie	Typový hostitel	Hlavní hostitelé	Reference
<i>Cryptosporidium alticolis</i>	hraboš	hraboši	Horčíčková et al. 2019
<i>Cryptosporidium apodemi</i>	myšice temnopásá	myšice	Čondlová et al. 2018
<i>Cryptosporidium ditrichi</i>	myšice lesní	myšice	Čondlová et al. 2018
<i>Cryptosporidium homai</i>	morče	morčata	Zahedi et al. 2017
<i>Cryptosporidium microti</i>	hraboš	hraboši	Horčíčková et al. 2019
<i>Cryptosporidium muris</i>	myš domácí	hlodavci	Tyzzer 1910
<i>Cryptosporidium occultus</i>	krysa	krysy	Kváč et al. 2018a
<i>Cryptosporidium parvum</i>	myš domácí	přežvýkavci, hlodavci	Tyzzer 1912
<i>Cryptosporidium proliferans</i>	krysa	hlodavci	Kváč et al. 2016
<i>Cryptosporidium rattii</i>	krysa	krysy	Ježková et al. 2021
<i>Cryptosporidium rubeyi</i>	veverka	veverky	Li et al. 2015
<i>Cryptosporidium tyzzeri</i>	myš domácí	hlodavci	Ren et al. 2012
<i>Cryptosporidium ubiquitum</i>	skot	přežvýkavci, hlodavci	Fayer et al. 2010
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	morče	morčata	Vetterling et al. 1971

2. 2. 5. Kryptosporidie a kryptosporidióza nutrií

Poprvé byly kryptosporidie u nutrií identifikovány v roce 1991 v Polsku a na základě velikosti oocyst byly označeny jako *C. parvum* (Pavlásek et Kozakiewicz 1991). Další výskyt kryptosporidií u nutrií v Argentině zaznamenala studie z roku 2012 (Martino et al. 2012), ale podobně jako u Pavláška a Kozakiewicze (1991) nebyly izoláty geneticky charakterizovány. V dalších dvou studiích zabývajících se detekcí kryptosporidií u zdivočelých nutrií v Itálii a u chovaných nutrií v České republice nebyly kryptosporidie detekovány (Kellnerová et al. 2017; Zanzani et al. 2016). Poslední dosud uveřejněnou dílčí zprávou je výskyt kryptosporidií u zdivočelých nutrií na Slovensku (Kváč et al. 2018b). Výsledky této zprávy jsou základem této práce.

Cryptosporidium parvum

Cryptosporidium parvum je celosvětově nejrozšířenější kryptosporidií infikující člověka a zvířata (Bankier et al. 2003; Santoro et al. 2019). Průběh infekce a klinické příznaky onemocnění závisí na imunitním stavu hostitele, od asymptomatického průběhu u imunokompetentních jedinců, až po život ohrožující dlouhodobou infekci u imunokompromitovaných pacientů. U pacientů s AIDS je infekce spojena s vysokou mírou morbidity a mortality (Laksemi et al. 2020; Wang et al. 2018). Navzdory intenzivnímu úsilí za posledních 20 let neexistuje v současné době 100% účinná terapie (Amadi et al. 2009; Fayer et al. 2007; Hewitt 2000; Checkley et al. 2015; Rossignol et al. 1998; Sparks et al. 2015). Životní cyklus *C. parvum* je podobný životnímu cyklu jiných druhů kryptosporidií, což vede k tvorbě oocyst, které se vylučují stolicí/trusem infikovaných hostitelů (Abrahamsen et al. 2004). Oocysty *C. parvum* jsou vysoce rezistentní vůči environmentálním tlakům, včetně ošetření chlórem u komunálních vod. Parazit je tedy důležitým patogenem přenášeným vodou a potravinami (Korich et al. 1990).

Mezi hostitele *C. parvum* nepatří ovšem jen člověk, ale také zvířata, jak již bylo zmíněno výše. K nejčastějším zvířecím hostitelům tohoto druhu kryptosporidií patří přežvýkavci, zejména telata (Feng et al. 2018), u kterých bývá intenzita infekce velmi vysoká. Telata trpící kryptosporidiózou mají vodnatý průjem, ve kterém vylučují velké množství oocyst (až 10^7 oocyst na gram trusu) (Fayer et al. 1998). Navíc jediné tele může potenciálně vyprodukovat 10^{10} oocyst v průběhu infekce (Nydam et al. 2001). Četné studie prokázaly významnou korelaci mezi infekcí *C. parvum* a průjmem (Adesiyun et al. 2001; Bjorkman et al. 2003; Fayer et al. 1998; Roy et al. 2006; Singh et al. 2006; Trotz-Williams et al. 2005). Infekce u telat může být také doprovázena depresí, slabostí a anorexií (Howerth, 1981; Tzipori et al. 1983). Tento druh byl popsán u řady hlodavců jako například u norníka rudého (*Myodes glareolus*), hraboše polního (*Microtus arvalis*), myšice lesní (*Apodemus flavicollis*), myšice temnopásé (*Apodemus agrarius*), myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*), myši středozevní (*Mus spretus*), bělozubky tmavé (*Crocidura russula*) a nutrie říční (*Myocastor coypus*) (Bajer et al. 2002; Bednarska et al. 2003; Danišová et al. 2017; Pavlásek et Kozakiewicz 1991; Torres et al. 2000).

Ve studii Pavláška a Kozakiewiczze (1991) byly detekovány oocysty u nutrií o velikosti $4,8 - 5,2 \times 4,5 - 4,8 \mu\text{m}$ a označeny jako *C. parvum*. Žádné příznaky kryptosporidiózy nebyly u nutrií pozorovány (Pavlásek et Kozakiewicz 1991). Vývojový cyklus *C. parvum* probíhá na

epitelu tenkého a tlustého střeva (Heine et al. 1984; Tzipori et al. 1983) s nejčastějším výskytem v přední části tenkého střeva (Heine et al., 1984). Při infekci je často pozorována enteritida, snížení délky klků a fúze klků (Heine et al. 1984; Howerth 1981; Tzipori et al. 1983).

Cryptosporidium ubiquitum

Cryptosporidium ubiquitum bylo nejprve identifikováno jako *Cryptosporidium cervine* genotyp (Fayer et al. 2010). Obdobně jako u druhu *C. parvum*, hostitelské spektrum *C. ubiquitum* zahrnuje volně žijící a domestikované přežvýkavce, hlodavce, masožravce a primáty včetně lidí (Baroudi et al. 2018; Fayer et al. 2010; Kotková et al. 2016; Zhang et al. 2020). Oocysty *C. ubiquitum* měří $4,71 - 5,32 \times 4,33 - 4,98 \mu\text{m}$ a vývojová stádia byla nalezena v ileu (Fayer et al. 2010). Příznaky kryptosporidiózy v podobě průjmu byly pozorovány u kuandu (*Coendou*), zatímco u jiných hostitelů, u kterých byla infekce *C. ubiquitum* prokázána, nebyly žádné příznaky kryptosporidiózy pozorovány (Fayer et al. 2010; Kellnerová et al. 2017; Kotková et al. 2016).

3. CÍLE PRÁCE

Zpracovat literární rešerši o tématu. Popsat diverzitu a prevalenci kryptosporidií u hospodářsky chovaných a zdivočelých nutrií. V případě záchytu nových genotypů kryptosporidií popsat jejich morfologii, lokalizaci v hostiteli a hostitelskou specificitu. Porovnat výsledky s literaturou a vyvodit závěry s ohledem na epizootologii kryptosporidióz.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Materiál

Pro parazitologické vyšetření byly použity vzorky trusu od hospodářsky chovaných nutrií v České republice a zdivočelých nutrií z České republiky a Slovenska. Dále byl vyšetřen trus od experimentálně infikovaných zvířat, a to od nutrií (*Myocastor coypus*), pískomilů (*Meriones unguiculatus*), SCID myši, BALB/c myši (*Mus musculus*) a kuřat kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*).

4.1.1. Získávání biologického materiálu z nutrií

V letech 2016–2019 byly odebrány vzorky trusu ze zdivočelých nutrií na sedmi a 11 lokalitách v České republice a na Slovensku (obr. 1). U nutrií zabitých lovem byly vzorky odebrány z konečníku nebo tlustého střeva bezprostředně po usmrcení. V ostatních případech byly vzorky získány sběrem trusu ze země na březích řek. Každý vzorek trusu byl jednotlivě odebrán do sterilní plastové zkumavky a doručen do laboratoře ke zpracování. Dále bylo získáno 83 vzorků trusu nutrií z osmi farem v České republice. Z důvodu přání chovatelů nejsou lokality jednotlivých chovů zveřejněny.

4.1.2 Zvířata pro experimentální infekce

Šest dospělých nutrií (nutrie 0 a nutrie 1–5; *Myocastor coypus*), pět jeden týden starých a pět osm týdnů starých pískomilů (*Meriones unguiculatus*), pět jeden týden starých a pět osm týdnů starých myši SCID (*Mus musculus*; kmen CB-17), pět jeden týden a pět osm týdnů starých myši BALB/c a pět jednodenních kuřat (*Gallus gallus f. domestica*) bylo použito pro experimentální studie. Další tři zvířata od každého druhu/kmene a věkové skupiny byla použita jako negativní kontrola. Všechny nutrie použité pro studium experimentální infekce byly dva týdny před experimentální inokulací denně vyšetřovány na přítomnost specifické DNA a oocyst kryptosporidií. Myši a pískomilové byli jeden týden před experimentální inokulací vyšetřeni na přítomnost specifické DNA a na přítomnost oocyst kryptosporidií. Jednodenní kuřata byla vyšetřena v den vylíhnutí.

Z důvodu zabránění kontaminace chovného prostředí oocystami kryptosporidií byli pískomilové a myši umístěni ve ventilovaných klecích (Tecniplast, Buguggiate, Itálie) a kuřata byla umístěna v plastových boxech, které byly před použitím dezinfikovány při 80 ° C po dobu jedné hodiny. Nutrie byly chovány v boxech se zajištěnými stěnami. Jednotlivé boxy byly před

použitím dezinfikovány tlakovou párou. Klece a boxy byly dimenzovány v souladu s předpisy Evropské a České republiky o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.). V prvních pěti dnech byl u kuřat použit externí zdroj tepla. Každé zvíře dostalo sterilizované krmení a sterilizovanou vodu *ad libitum*. Ošetřovatelé zvířat nosili během péče o zvířata jednorázové ochranné prostředky. Podestýlka a ochranné pomůcky byly pravidelně odstraňovány z experimentální místnosti.

4.2 Metody

4.2.1. Mikroskopické vyšetření

Vzorky trusu byly vyšetřeny mikroskopicky pomocí barvení anilin-karbol-methyl-violetí dle Miláčka a Vítovce (1985), Ziehl-Neelsen (ZN) barvení (Henriksen et Pohlenz 1981) a dále byly využity *Cryptosporidium* specifické protilátky konjugované s FITC značící stěnu oocysty (IFA; Cryptosporidium IF Test, Cryptocel, Cellabs Pty Ltd., Brookvale, Austrálie).

Barvení nátěru trusu anilin-karbol-methyl-violetí dle Miláčka a Vítovce (1985)

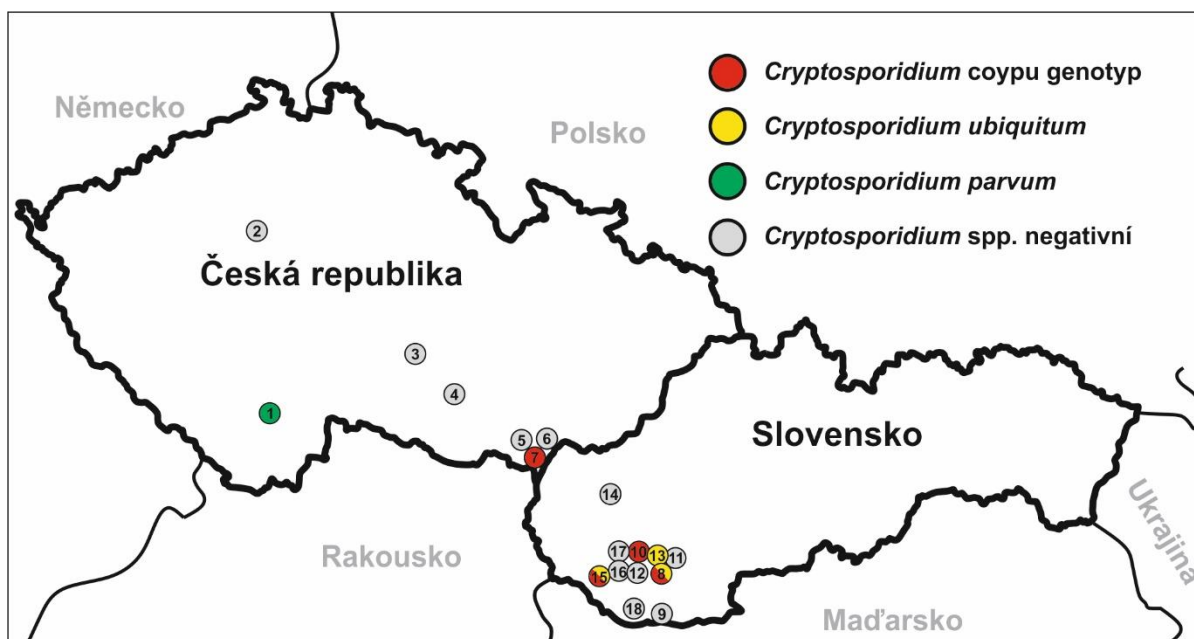
Pro barvení nátěru trusu dle Miláčka a Vítovce je potřeba mít tyto chemikálie: roztok methylvioleti (0,6 g methyl violeti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml alkoholu, 70 ml deionizované vody); roztok 2% kyseliny sírové; tartrazin (1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové).

Pracovní postup:

- Na podložní sklíčko udělat slabý nátěr trusu.
- Sklíčko s nátěrem zafixovat methanolem v plameni.
- Zafixovaná sklíčka barvit v roztoku methylvioleti po dobu 30 minut.
- Sklíčka opláchnout pod tekoucí vodou.
- Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 1 minuty.
- Sklíčka opláchnout vodou a dobarvit v tartrazinu po dobu 10 minut.
- Sklíčka opláchnout vodou a usušit.
- Prohlížet skla světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Oocysty kryptosporidií se barví temně fialově na žlutém, žlutohnědém nebo světle fialovém pozadí (záleží na typu vzorku).

Obrázek. 1: Odběr vzorků z lokalit v České republice a na Slovensku. Čísla označují názvy lokalit a barvy označují přítomnost *Cryptosporidium* spp. 1) Planá nad Lužnicí (N 49°21.11527', E 14°42.08325'), 2) Praha (N 50°4.78070', E 14°24.81330'), 3) Jihlava (N 49°23.09785', E 15°36.37422'), 4) Třebíč (N 49°12.58360', E 15°52.28832'), 5) Břeclav (N 48°46.34147', E 16°52.68835'), 6) Týnec (N 48°46.31570', E 17°0.66778'), 7) Lanžhot (N 48°43.41558', E 16°58.30782'), 8) Nové Zámky (N 47°98.61842', E 18°16.31414'), 9) Komárno (N 47°75.74078'N, E 18°12.98247'), 10) Šaľa (N 48°15.13789', E 17°87.48586'), 11) Dolný Ohaj (N 48°08.31022', E 18°25.34725'), 12) Topolníky (N 47°96.61242', E 17°78.32136'), 13) Palárikovo (N 48°04.41286', E 18°06.95797'), 14) Nitrianský Hrádok (N 48°06.99908', E 18°20.35394'), 15) Dunajská Streda (N 47°98.93750', E 17°62.02594'), 16) Vlčany (N 48°03.77642', E 17°95.26506'), 17) Diakovce (N 48°13.37875', E 17°84.13564'), 18) Lipové (N 47°84.01856', 17°85.55094')



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

Pro barvení dle Ziehl-Neelsena v modifikaci dle Henriksena a Pohlenze byly použity tyto chemikálie: roztok karbolfuchsinu (2,5 ml rozpuštěných fenolových krystalů, 5 ml 100% ethanolu, 0,5 g práškového basického fuchsinu, 50 ml deionizované vody), 1% kyselý alkohol (1 ml HCl, 100 ml 70% ethanolu), 0,8% fast green zeleň (0,8 g prášku light green, 100 ml deionizované vody).

Postup:

- Na podložní sklíčko udělat slabý nátěr trusu.
- Sklíčko s nátěrem zafixovat methanolem v plameni.
- Zafixované vzorky obarvit v roztoku karbolfuchsinu 2–3 hodiny.
- Sklíčka opláchnout pod tekoucí vodou.
- Odbarvit nabarvené roztěry v 1% kyselém alkoholu tak, že při odbarvování již neodtéká roztok červené barvy.
- Sklíčka opláchnout pod vodou po dobu 1 minuty.
- Barvit 1 minutu light green.
- Sklíčka opláchnout pod tekoucí vodou.
- Nechat vzorky oschnout při laboratorní teplotě a následně prohlížet mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Oocysty kryptosporidií se barví sytě červeně na zeleném pozadí.

Fluorescenční mikroskopie po značení stěny oocyst *Cryptosporidium* rodově specifickými protilátkami konjugovanými s FITC

Pro fluorescenční mikroskopii značenou pomocí specifických protilátek byly použity následující chemikálie: Crypto Cell reagent – fluorescenčně značené specifické monoklonální protilátky proti stěně oocysty; Mounting fluid, které jsou součástí komerčního kitu (*Cryptosporidium* IF Test, Cryptocel).

Pracovní postup:

- Na jamkové sklo kápnout 20 μ l vzorku s oocystami a nechat zaschnout.
- Fixovat 5 minut v metanolu, nechat zaschnout při laboratorní teplotě.
- Přidat 10 μ l Crypto Cell Reagentu.
- Sklíčko inkubovat v temnu ve vlhké komůrce po dobu 30 minut při teplotě 37 °C.

- Sklíčko omýt 1 minutu v PBS.
- Sklíčko osušit (může být uchováno 24 hodin při 2–8 °C).
- Před prohlížením kápnout na sklíčko 10 µl mounting fluid, překrýt krycím sklíčkem.
- Prohlížet skla fluorescenčním mikroskopem s filtrem WB 515 nm při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Oocysty kryptosporidií mají zelenou fluorescenci na tmavém pozadí.

Hodnocení intenzity infekce OPG

U mikroskopicky pozitivních vzorků byla intenzita infekce stanovena jako počet oocyst na gram trusu (OPG; Kváč et al. 2007).

Pracovní postup:

- Podložní sklo před nátěrem zvážit na 3 desetinná místa.
- Na zvážená skla udělat nátěr trusu.
- Sklo s nátěrem trusu opět zvážit na 3 desetinná místa.
- Vypočítat hmotnost nátěru.
- Spočítat počet oocyst na skle obarveném anilin-karbol-methyl violetí.
- Vypočítat počet oocyst na 1 gram trusu.

4.2.2. Molekulární vyšetření

4.2.2.1. Izolace DNA z trusu

Z trusu vyšetřovaných zvířat byla vyizolovaná DNA pomocí komerčně dodávaného kitu GeneAll® Exgene™ Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology, co., Ltd., Soul, Jižní Korea).

Pro izolaci DNA z trusu byl použit následující materiál: 1,5 ml mikrozkuhavky Safe-Lock Tube; skleněné kuličky; zirkonové kuličky; FL pufr; 0,7 ml mikrozkuhavky EzPass; 0,7 ml mikrozkuhavky mini spin kolonky; EB pufr; PB pufr; NW pufr.

Pracovní postup:

- Vzorek trusu dát do Safe-Lock Tube, přidat 0,5 ml skleněných kuliček (0,5 mm) a 3 zirkonové kuličky (1,0 mm).
- Ke vzorku (200 mg) napipetovat 1 ml FL pufru.

- Zvortexovat a zhomogenizovat vzorek v BeadBeateru (FastPrep MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
- Po homogenizaci nechat vzorek inkubovat při laboratorní teplotě 5 minut.
- Centrifugovat 5 minut při 14 000 g.
- Veškerý supernatant přepipetovat na mikrozkušavku EzPass, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Vylít odpad ze sběrné části EzPass mikrozkušavky, napipetovat 100 µl EB pufru na kolonku, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Vyhodit kolonku, do sběrné mikrozkušavky napipetovat 500 µl PB pufru, promíchat pipetováním, přenést všechny obsah na mini spin kolonku, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Vylít obsah ze sběrné mikrozkušavky a na střed kolony napipetovat 500 µl NW pufru, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Vylít obsah ze sběrné mikrozkušavky a opět centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Přenést kolonku na čistou mikrozkušavku a napipetovat 200 µl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Vyizolovanou DNA v mikrozkušavce skladovat při teplotě -20 °C.

4.2.2.2. Izolace DNA z tkáně

Pro prokázání přítomnosti specifické DNA kryptosporidií v konkrétních orgánech byla ze vzorků orgánů vyizolovaná DNA pomocí DNeasy Blood & Tissue kitu (QIAGEN).

Pro izolaci DNA z tkáně byl použit následující materiál: tkáň; 1,5 ml mikrozkušavky; skleněné a zirkonové kuličky; mini spin kolonka; ATL pufr; proteináza K; AL pufr; EtOH; AW 1 pufr; AW 2 pufr; AE pufr.

Pracovní postup:

- Do mikrozkušavky nastříhat asi 100–200 mg tkáně.
- Přidat 0,5 ml skleněných kuliček (0,5 mm) a 3 zirkonové kuličky (1,0 mm).
- Připipetovat 180 µl ATL pufru, vortexovat.
- Homogenizovat vzorek pomocí BeadBeateru (FastPrep MP Biomedicals) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.

- Centrifugovat přibližně 10 sekund při 6 000 g, připipetovat 20 µl proteinázy K.
- Inkubovat 1 hodinu při 56 °C, během inkubace pravidelně míchat.
- Centrifugovat 10 sekund při 6 000 g.
- Připipetovat 200 µl AL pufru, vortexovat.
- Připipetovat 200 µl 96 % EtOH, vortexovat, centrifugovat 10 sekund při 6 000 g.
- Veškerý supernatant přepipetovat na Mini spin kolonku, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetovat 500 µl AW1 pufru, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g, odstranit odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetovat 500 µl AW2 pufru, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g, odstranit odpad ze sběrné zkumavky.
- Sběrné zkumavky vyhodit, nahradit je novými mikrozukmavkami, přímo na membránu kolony napipetovat 200 µl AE pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.
- Vyizolovanou DNA v mikrozukmavce skladovat při teplotě -20 °C.

4.2.2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost specifické DNA kryptosporidií byla ve vyizolované DNA stanovena pomocí amplifikace fragmentů genů kódujících malou ribozomální podjednotku (SSU) (Jiang et al. 2005), 70 kDa heat-shock protein (HSP70) (Sulaiman et al. 2000), aktin (Sulaiman et al. 2002) a 60 kDa glykoprotein (gp60) (Peng et al. 2001). Pro primární i sekundární PCR reakci byl celkový objem reakčních směsí 20 µl. Primární PCR směs obsahovala 2 µl templátové DNA, 10 µl 2× AmpONE™ HS-Tag premix (GeneAll Biotechnology, co., Ltd., Soul, Jižní Korea), 200 nM každého primeru a molekulární vodu do celkového objemu 20 µl. Sekundární reakce byla shodná s primární, kromě použití 2 µl primární PCR jako templátové DNA. Reakce probíhala v termocycleru, po počáteční denaturaci 95 °C po dobu 3 minuty, bylo provedeno 35 cyklů zahrnujících denaturaci při 95 °C po dobu 45 sekund, hybridizaci podle nasedacích teplot specifických primerů (Tabulka 2) po dobu 45 sekund a syntézy nového řetězce DNA při 72 °C po dobu 60 sekund. Závěrečná syntéza při 72 °C trvala 10 minut.

Tabulka 2. Nukleotidové sekvence specifických primerů pro amplifikaci částečné sekvence genů kodujících malou podjednotku rRNA (SSU), 70 kDa Heat Shock Protein (HSP70), aktin a 60 kDa glykoprotein (gp60).

SSU (Jiang et al. 2005)

Primární reakce – nasedací teplota 50 °C

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

R1 5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'

Sekundární reakce – nasedací teplota 55 °C

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

R2 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCCA-3'

HSP70 (Sulaiman et al. 2000)

Primární reakce – nasedací teplota 50 °C

F1 5'- GCT CGT GGT CCT AAA GAT AA-3'

R1 5'-ACG GGT TGA ACC ACC TAC TAA T-3'

Sekundární reakce – nasedací teplota 45 °C

F2 5'-ACA GTT CCT GCC TAT TTC-3'

R2 5'-GCT AAT GTA CCA CGG AAA TAA TC-3'

AKTIN (Sulaiman et al. 2002)

Primární reakce – nasedací teplota 50 °C

F1 5'-ATG RGW GAA GAA GWA RYW CAA GC-3'

R1 5'-AGA ARC AYT TTC TGT GKA CAA T-3'

Sekundární reakce – nasedací teplota 45 °C

F2 5'-CAA GCW TTR GTT GTT GAY AA-3'

R2 5'-TTT CTG TGK ACA ATW SWT GG-3'

GP60 (Peng et al. 2001)

Primární reakce – nasedací teplota 50 °C

F1 5' TTT ACC CAC ACA TCT GTA GCG TCG 3'

R1 5' ACG GAC GGA ATG ATG TAT CTG A 3'

Sekundární reakce – nasedací teplota 50 °C

F2 5' ATA GGT GAT AAT TAG TCA GTC TTT AAT 3'

R2 5' CCA AAA GCG GCT GAG TCA GCA TC 3'

4.2.2.4. Gelová elektroforéza

Pro gelovou elektroforézu byl připraven agarózový gel. Na jeho přípravu byly použity tyto chemikálie: 50× TAE pufr (242 g tris báze, 47,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA); agaróza (Biotech, Heidelbergr, Německo); ethidium-bromid (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Příprava agarózového gelu:

- Pro gelovou elektroforézu byl připraven 1% agarózový gel.
- Naváženou agarózu smíchat s naměřeným TAE pufrem v Erlenmeyerově baňce a dát do mikrovlnné trouby, dokud se všechna agaróza nerozpustí.
 - Nosič malý: 0,4 g / 40 ml TAE pufru
 - Nosič střední: 0,8 g / 80 ml TAE pufru
 - Nosič velký: 1,2g / 120 ml TAE pufru
- Erlenmeyerovu baňku s gelem ochladit pod tekoucí vodou na teplotu, kdy je udržitelná v ruce.
- Přidat 1 µl EtBr (0,2 µg/ml), roztok promíchat.
- Nalít agarózový gel do nosiče, vložit hřeben a gel nechat 5–10 minut ztuhnout.
- Po ztuhnutí vložit gel do elektroforetické vany tak, aby starty ležely u záporné elektrody.
- Po vyjmutí hřebenu nanést do vzniklých jamek PCR produkty, do první jamky nanést velikostní marker (100 bp) (O'Gene Ruler™, Biogen, Londýn, Velká Británie).
- Nechat gel vyvíjet.
- Gel vložit do UV transiluminátoru a vyhodnotit pozitivní a negativní vzorky.

4.2.2.5. Izolace fragmentů DNA z gelu

Pozitivní fragmenty z elektroforézy byly vyizolovány pomocí komerčního kitu Gen Elute (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA).

K izolaci z gelu byly použity tyto chemikálie: Gel Solubilization Solution; PCR voda; Column Preparation Solution; isopropanol; Wash Solution G.

Postup:

- Vyříznout fragment DNA z gelu a vložit do mikrozkušavky.
- Do mikrozkušavky s fragmentem připipetovat 500 µl Gelu Solubilization Solution a nechat inkubovat 10 minut při 50 °C.
- Kontrolovat rozpouštění a každé 2–3 minuty promíchat.
- Dát inkubovat PCR vodu na 65 °C.
- Sestavit Binding kolonku G, napipetovat 500 µl Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Ke vzorku s DNA napipetovat 150 µl isopropanolu, promíchat a veškerý objem přenést na Binding kolonku G.
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky a sběrnou zkumavku opět použít s kolonou, na kolonu napipetovat 700 µl Wash Solution G, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět ji použít s kolonou, centrifugovat bez přídavku jakýchkoli roztoků 1 minutu při 16 000 g.
- Mikrozkušavku v centrifuze otočit o 180° a centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
- Vložit kolonu do nové mikrozkušavky a provést eluci 30 µl PCR vody předehřáté na 65 °C, inkubovat 1 minutu, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Získaný fragment DNA v mikrozkušavce uchovávat v lednici při teplotě 4 °C do té doby, než známe výsledky sekvencí.

4.2.2.6. Sekvenování a fylogenetické analýzy

Pozitivní PCR produkty byly sekvenovány pomocí sekundárních PCR primerů v Eurofins (Praha, Česká republika). Analýza chromatogramů byla dokončena pomocí Chromas Pro 2.1.4 (Technelysium, Pty, Ltd., South Brisbane, Austrálie) a identita sekvencí byla ověřena v

BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sekvence získané v této studii a referenční sekvence získané z GenBank byly srovnány pomocí online serveru MAFFT verze 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) pomocí metody vícenásobného zarovnání E-INS-i. Zarovnání byla ručně oříznuta a upravena v BioEdit v.7.0.5 (Hall, 1999). Fylogenetická analýza byla provedena pomocí metody maximální věrohodnosti (ML) s využitím evolučních modelů vybraných MEGAX (Kumar et al. 2018). Podpora Bootstrap byla vypočtena z 1 000 replikací. Fylogenetické stromy byly vypočítány v softwaru MEGAX (<https://www.megasoftware.net/>) a dále upraveny pro účely vizualizace pomocí aplikace Corel DrawX7 (<https://www.coreldraw.com>). Všechny získané nukleotidové sekvence byly uloženy v GenBank: MW274645-MW274661 pro SSU, MW274645-MW274661 pro aktin, MW280976-MW280992 pro HSP70 a MW280993-MW281009 pro gp60.

4.2.3 Purifikace oocyst

Pozitivní trus s novým druhem/genotypem kryptosporidií byl homogenizován ve třetí misce a přečištěn na sacharózovém gradientu a poté dočištěn na cesium chloridovém gradientu.

Sacharózový gradient (Arrowood a Stearling 1987)

Pro čištění na sacharózovém gradientu byly použity tyto chemikálie: Sheaterův roztok (259 ml deionizované vody; 405 g cukru; 7,29 g fenolu); PBS Tween (1% roztok); pracovní Sheaterovy roztoky 1+2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween), 1+4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

Postup čištění:

- Trus zbavit příměsí a přecedit přes sítko.
- Do 4 skleněných zkumavek (objem 100 ml) navrstvit gradient: 1. vrstva: 30 ml Sheaterova roztoku 1+2; 2. vrstva: 30 ml Sheaterova roztoku 1+4; 3. vrstva: 15 ml vzorku trusu.
- Zkumavky s gradientem centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
- Horní zbarvenou vrstvu (přibližně 1/3) odsát a zbylý supernatant přenést do čistých zkumavek.
- Zkumavky doplnit deionizovanou vodou a centrifugovat opět při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.

- Polovinu objemu odsát a vzorky doplnit deionizovanou vodou. Poté vzorky centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
- Předchozí krok zopakovat ještě jednou.
- Sedimenty přenést do 1 zkumavky a uchovat při 4 °C s přidavkem antibiotik nebo zalité 5% dichromanem sodným.

Cesium chloridový gradient

Pro dočištění na cesium chloridovém gradientu byly použity tyto chemikálie: Roztok cesium chloridu (1,15 g.ml⁻¹); PBS (0,025M; pH 7,2)

Postup čištění:

- Po čištění na sacharózovém gradientu vzorek centrifugovat při 4 °C po dobu 10 minut při 16 000 g.
- Všechny supernatant odsát, dále přidat 0,5 ml PBS a vzorek rozsuspendovat.
- Do čisté 1,7 ml mikrozkušavky napipetovat 1 ml CsCl.
- Na CsCl opatrně navrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
- Vzorek centrifugovat při 20 °C po dobu 3 minuty při 16 000 g.
- Odebrat 1 ml supernatantu s oocystami a poté naředit pomocí PBS.
- Vzorek centrifugovat při 20 °C po dobu 3 minuty při 16 000 g.
- Supernatant odebrat a vzorek opět centrifugovat při 20 °C po dobu 3 minuty při 16 000 g.
- Supernatant odebrat a vzorek skladovat v dichromanu draselném.

4.2.4. Design experimentu

Nutrie 0 byla orálně inokulována 5 000 čištěnými oocystami *Cryptosporidium* coypu genotyp v 500 µl deionizované vody, které byly izolované z přirozeně infikované nutrie (izolát 31132). Oocysty *Cryptosporidium* coypu genotyp získané z experimentálně infikované nutrie 0 byly molekulárně a morfometricky charakterizovány a použity k dalším experimentům. Zvířata v dalších experimentech byla inokulována 20 000 purifikovanými oocystami *Cryptosporidium* coypu genotypu v 500 µl (nutrie), 200 µl (myši a pískomilové) nebo 20 µl (kuřata) destilované vody. Zvířata sloužící jako negativní kontroly byla inokulována orálně 500 µl (nutrie), 200 µl (myši a pískomilové) nebo 20 µl (kuřata) deionizované vody. Vzorky trusu od každého zvířete byly denně vyšetřovány na přítomnost oocyst *Cryptosporidium* (barvení ACMV) a specifické

DNA kryptosporidií (amplifikace/sekvenování SSU). Všechny experimenty byly ukončeny 30 dní po infekci (DPI). Průběh infekce byl hodnocen na základě přítomnosti *Cryptosporidium* coypu genotypu specifické DNA a počtu oocyst na gram trusu dle výše popsané metodiky. Konzistence a barva trusu a zdravotní stav zvířat byl kontrolován denně pro každý vzorek, respektive zvíře. Z důvodu ověření identity *Cryptosporidium* coypu genotypu byly z každého experimentálně infikovaného zvířete navíc amplifikovány geny pro aktin, HSP70 a gp60 a to ze vzorků na začátku, v průběhu a na konce infekce. Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi původního izolátu.

4.2.5. Odběr vzorků, orgánů a tkání

Vzorky trusu od experimentálních zvířat byly pro parazitologické vyšetření odebírány 1× za 24 hodin po dobu 30 dnů. Trus byl odebrán do sterilních 2 ml mikrozkušavek, které byly řádně popsány, a uchovány při 4 °C do dalšího zpracování. Byla provedena pitva dvou zvířat z každé experimentální skupiny vždy 10. a 20. den po infekci. Vzorky tkáně (jícen, žaludek, duodenum, proximální, centrální a distální jejunum, ileum, slepé střevo, tlusté střevo, játra, slezina, ledviny, močový měchýř a plíce) od každého zvířete byly získány za použití různých sterilních pitevních nástrojů pro každé místo. Z každého orgánu byly odebrány vzorky pro PCR/sekvenování, histologii a skenovací elektronovou mikroskopii (SEM). Histologické řezy byly obarveny hematoxylinem a eosinem (HE) a periodic acid schiff (PAS), prohlíženy při zvětšení 100–400× a dokumentovány pomocí softwaru Olympus cell Sens Entry 2.1 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japonsko) a digitálního fotoaparátu (Olympus DP73). Vzorky pro SEM byly prohlíženy pomocí JEOL JSM-7401F-FE SEM vybaveného digitálním fotoaparátem.

4.2.5.1. Příprava histologických preparátů

Pro přípravu histologických preparátů byly použity tyto chemikálie:

- I. vzestupná alkoholová odvodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; aceton; xylén)
- parafinová řada (4 následné roztoky parafinu, 1:3, 1:1, 3:1, 100 % parafin)
- alkoholová sestupná řada, odparafinovací řada (xylén; alkohol 96%, alkohol 80%, alkohol 70%; dH₂O)

- II. vzestupná odvodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; karboxylen; xylen)
- kanadský balzám

Pracovní postup:

- Vzorky odvodňovat I. vzestupnou řadou, po 60 minutách vyměnit roztok.
- V posledním roztoku nechat 90 minut.
- Prosytit parafinem (2–4 hodiny v parafinu I; 4–6 hodin v parafinu II; 8–12 hodin v parafinu III, 8–12 hodin ve 100 % parafinu).
- Vzorky zalít do čistého parafinu, vytvořit bločky. Poté zhotovit 5 μm silné histologické řezy a připravit preparáty na podložní sklíčko a nechat 24 hodin na plotně o teplotě 42 °C.
- Preparáty odparafinovat alkoholovou sestupnou zavodňovací řadou vždy po 5 minutách.
- Vzorky nabarvit a po barvení pokračovat v odvodňování II. alkoholovou vzestupnou řadou vždy po 5 minutách, v karboxylenu a xylenu ponechat 1 minutu.
- Vzorky zamontovat do kanadského balzámu a ponechat k sušení při teplotě 37 °C.
- Poté prohlížet mikroskopem (Olympus IX70) při vhodném zvětšení.

Barvení hematoxylin-eosin

Pro barvení hematoxylin-eosinem byly použity tyto chemikálie: hematoxylin; dH₂O; síran hlinito-amonný; jodičnan sodný; kyselina octová; eosin

Pracovní postup:

- Připravit odparafinované řezy.
- Vzorky barvit 10 minut v hematoxylinu (0,5 g hematoxylinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 500 ml dH₂O + 25 g síranu hlinito-amonného + 0,1 g jodičnanu sodného + 20 ml kyseliny octové).
- 10 minut oplachovat pod tekoucí vodou.
- 5 minut barvit vzorky v eosinu (0,5 g eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 250 ml dH₂O + 10 ml kyseliny octové).
- 10 minut oplachovat pod tekoucí vodou.

Barvení periodic acid shiff (PAS)

Pro barvení periodic acid shiff byly použity tyto chemikálie: Schiffovo reagens (100 ml H₂O, 1 g basický fuchsin, 10 ml 1N kyselina chlorovodíková, 1 g pyrosiřičitan draselný, 0,5 g aktivního uhlí); siřičitá voda (5 ml 1N kyseliny chlorovodíkové, 0,5 g pyrosiřičitan draselný, 100 ml destilované H₂O); roztok kyseliny jodisté (0,8 g ve 100 ml destilované H₂O); hematoxylin; 96% alkohol; butylalkohol; xylén

Postup:

- Připravit odparifinované řezy.
- Řezy vložit do roztoku kyseliny jodisté na 10 minut.
- Oplachovat 10 minut pod tekoucí vodou.
- Vložit do Schiffova reagens na 30 minut.
- Oplachovat 5 minut v lázni siřičité vody.
- Oplachovat 15 minut pod tekoucí vodou.
- Ponořit do hematoxylinu na 1–2 minuty.
- Opláchnout v 96% alkoholu, butylalkoholu a xylenu.

Montování nabarvených řezů

Postup:

- Na preparát na podložním skle kápnout kapku kanadského balzámu.
- Přiložit krycí sklíčko tak, aby se nevytvořily vzduchové bubliny.
- Případné bublinky vytlačit mírným tlakem na krycí sklíčko.
- Hotový preparát vložit do termostatu (37 °C), kde zaschne montovací medium.

4.2.5.2 Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii

Pro přípravu preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii byly použity tyto chemikálie: 3 % glutaraldehyd; 0,1M kakodylátový pufr; 2 % oxid osmičelý; acetonová řada (25 %, 75 % a 100 % roztok)

Pracovní postup:

- Fixovat vzorky orgánů v glutaraldehydu v kakodylátovém pufru při 4 °C přes noc.
- Promýt vzorky v kakodylátovém pufru 3× 15 minut.

- Fixovat vzorky v oxidu osmičelém v kakodylátovém pufru po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě.
- Promýt vzorky v kakodylátovém pufru 3× 15 minut.
- Po dehydrataci vzestupnou acetonovou řadou vzorky vysušit metodou kritického bodu (CPD).
- Vysušené vzorky nalepit pomocí oboustranné lepicí pásky na hliníkový terčik.
- Nalepené vzorky pozlatit a prohlížet pomocí elektronového mikroskopu JOEL JSM-7401F-FE SEM.

5. Výsledky

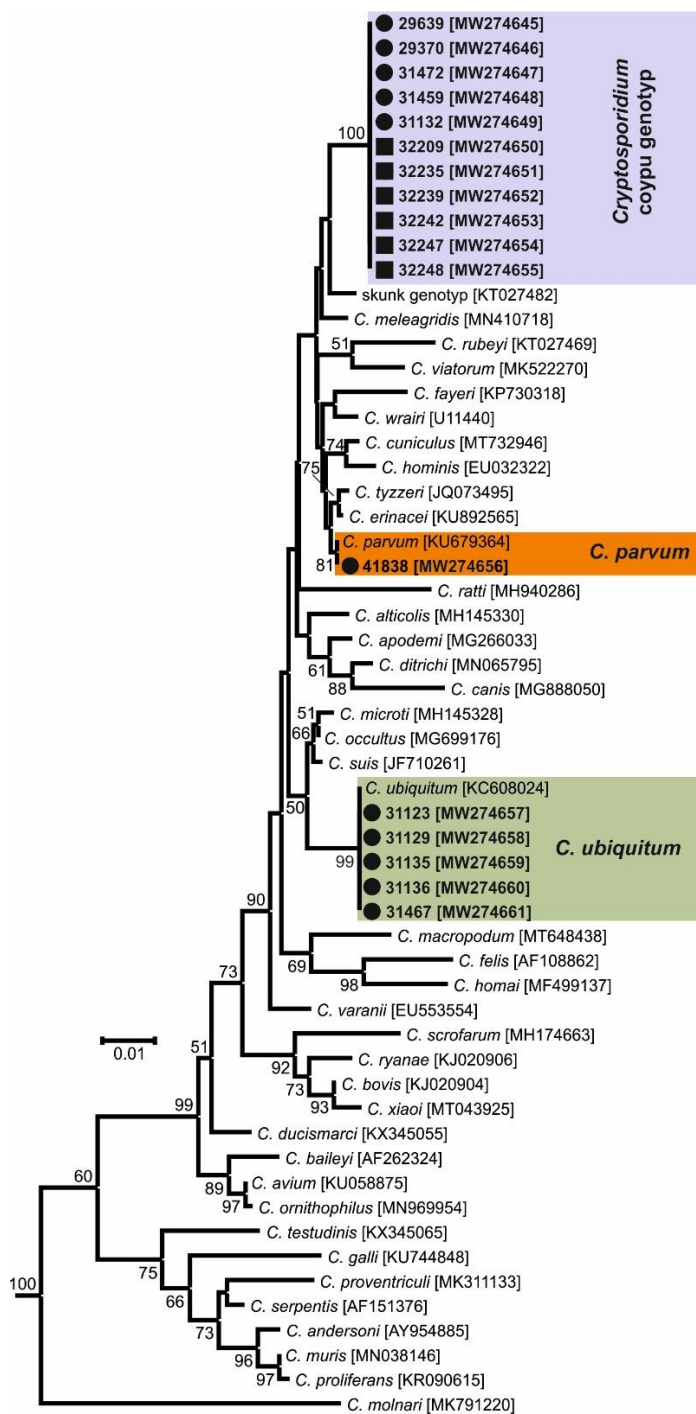
Celkem bylo vyšetřeno 83 a 78 vzorků trusu zdivočelých nutrií z České republiky a ze Slovenska (tabulka 3) a 86 vzorků trusu hospodářsky chovaných nutrií v České republice. Žádný ze vzorků trusu neměl konzistenci, která by naznačovala průjem. Vyšetření nátěrů trusu odhalilo přítomnost oocyst kryptosporidií ve třech vzorcích trusu zdivočelých nutrií s intenzitou infekce od 10 000 do 25 000 OPG (tabulka 3). Specifická DNA kryptosporidií byla detekována v 11 vzorcích trusu zdivočelých nutrií. Žádný z vyšetřených vzorků hospodářsky chovaných nutrií nebyl pozitivní na přítomnost oocyst nebo specifické DNA kryptosporidií (tabulka 3). Všechny vzorky trusu pozitivní na přítomnost oocyst kryptosporidií byly současně pozitivní i na přítomnost specifické DNA. Ze všech pozitivních vzorků byly získány sekvence genů SSU, aktin, HSP70 a gp60. Fylogenetické analýzy získaných genů prokázaly přítomnost *C. parvum* (n = 1), *C. ubiquitum* (n = 5) a nového genotypu kryptosporidie, který jsme pracovně nazvali *Cryptosporidium coypu* genotyp (n = 5; obrázky 2–5). V průběhu studie nebyla detekována žádná variabilita v získaných sekvencích SSU, aktinu a HSP70. Subtypizace *C. parvum* a *C. ubiquitum* na genu kódujícího 60 kDa glykoprotein ukázala přítomnost subtypu IIaA16G1R1, respektive XIId (tabulka 3, obrázek 5). V rámci *Cryptosporidium coypu* genotypu byly detekovány dva nové subtypy genu gp60, které jsme pojmenovali XXIa (n = 2) a XXIb (n = 3; Tabulka 3, obrázek 5). S ohledem na nález dosud neznámého genotypu kryptosporidie jsme se v práci podrobně zaměřili na popis jeho biologických vlastností.

Všechny vzorky trusu od chovaných nutrií byly mikroskopicky i PCR negativní.

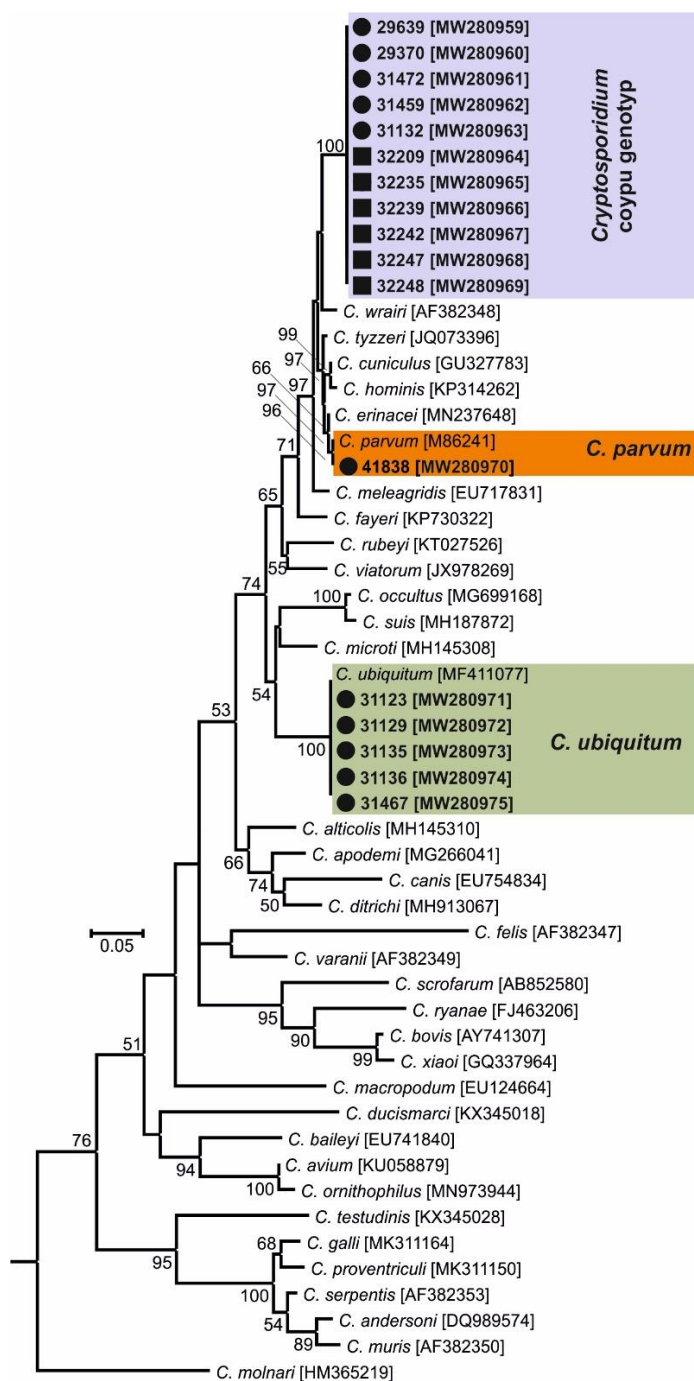
Tabulka 3. Výskyt a genetická rozmanitost *Cryptosporidium* spp. studovaných v této práci detekovaná na základě fragmentů genu malé podjednotky ribozomální rRNA (SSU), aktinu, 70 kDa heat-shock proteinu (HSP70) a 60 kDa glykoproteinu (gp60) u zdivočelých nutrií (*Myocastor coypus*) v České republice a na Slovensku (číslo lokality je identické s číslem v obrázku 1) a u hospodářsky chovaných nutrií na farmách v České republice.

Země	Lokalita (#)	Počet pozitivních/počet vyšetřených	ID pozitivního zvířete	Mikroskopicky pozitivní (OPG)	Genotypizace			
					SSU	Actin	HSP70	GP60
Česká republika	Planá nad Lužnicí (1)	1/16	41838	Ne	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	IIa
	Praha (2)	0/15	-	-	-	-	-	-
	Jihlava (3)	0/7	-	-	-	-	-	-
	Třebíč (4)	0/6	-	-	-	-	-	-
	Břeclav (5)	0/6	-	-	-	-	-	-
	Týnec (6)	0/15	-	-	-	-	-	-
	Lanžhot (7)	2/18	29369	Ne	coypu genotyp	coypu genotyp	coypu genotyp	XIXb
			29370	Ne	coypu genotyp	coypu genotyp	coypu genotyp	XIXa
	Farma 1	0/11	-	-	-	-	-	-
	Farma 2	0/8	-	-	-	-	-	-
	Farma 3	0/11	-	-	-	-	-	-
	Farma 4	0/12	-	-	-	-	-	-
	Farma 5	0/11	-	-	-	-	-	-
	Farma 6	0/11	-	-	-	-	-	-
	Farma 7	0/10	-	-	-	-	-	-
Farma 8	0/12	-	-	-	-	-	-	
Slovensko	Nové Zámky (8)	2/12	31467	Ne	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	XIIId
			31472	Ne	coypu genotyp	coypu genotyp	coypu genotyp	XIXb
	Komárno (9)	0/3	-	-	-	-	-	-
	Šaľa (10)	1/5	31459	Ano (25000)	coypu genotyp	coypu genotyp	coypu genotyp	XIXa
	Dolný Ohaj (11)	0/7	-	-	-	-	-	-
	Topoľníky (12)	0/10	-	-	-	-	-	-
	Palárikovo (13)	0/6	-	-	-	-	-	-
	Nitrianský Hrádok (14)	0/5	-	-	-	-	-	-
			31123	Ne	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	XIIId
			31129	Ano (18,000)	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	XIIId
	Dunajská Streda (15)	5/19	31135	Ne	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	XIIId
			31136	Ne	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	XIIId
			31132	Ano (10,000)	coypu genotyp	coypu genotyp	coypu genotyp	XIXa
Vlčany (16)	0/6	-	-	-	-	-	-	
Diakovce (17)	0/1	-	-	-	-	-	-	
Lipové (18)	0/4	-	-	-	-	-	-	

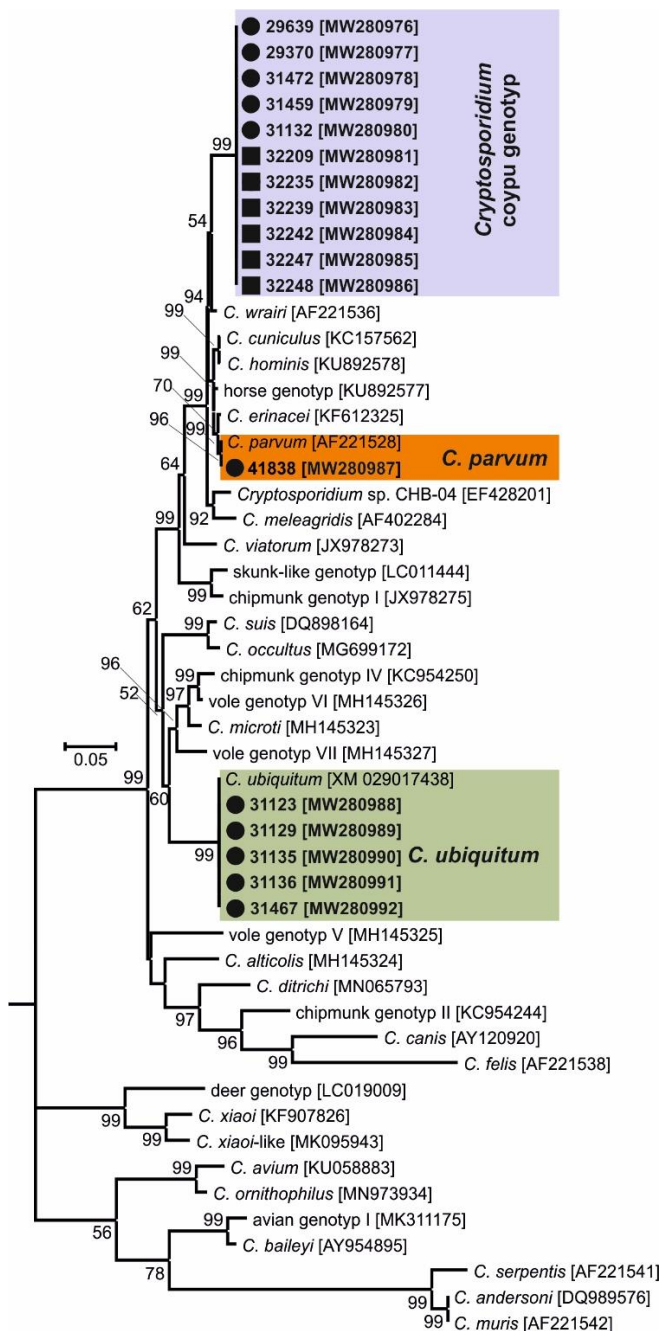
Obrázek 2. Maximum likelihood fylogenetický strom zkonstruovaný na základě částečných sekvencí genu kódujícího malou podjednotku rRNA získaných v této práci (tučně) a sekvencí *Cryptosporidium* spp. uložených v genové bance (GenBank). Číslo izolátu je identické s číslem v tabulce 3. V hranatých závorkách jsou uvedeny identifikační čísla sekvencí v GenBank. Černý kruh značí sekvenci získanou ze zvířat při terénním výzkumu, černý čtverec značí sekvence získané z experimentálně infikovaných zvířat. Čísla v uzlech představují bootstrapové hodnoty s více než 50% podporou.



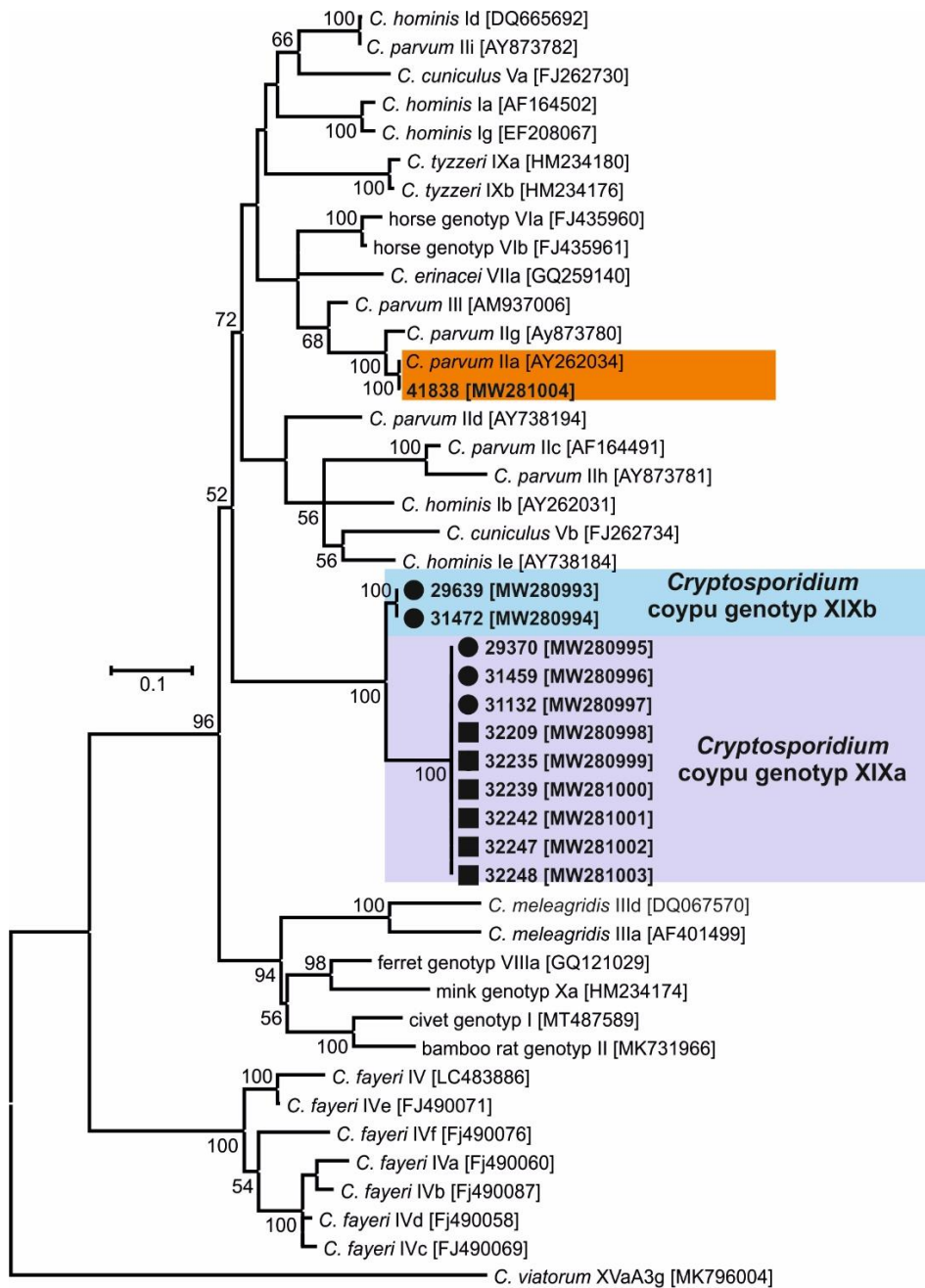
Obrázek 3. Maximum likelihood fylogenetický strom zkonstruovaný na základě částečných sekvencí genu aktin získaných v této práci (tučně) a sekvencí *Cryptosporidium* spp. uložených v genové bance (GenBank). Číslo izolátu je identické s číslem v tabulce 3. V hranatých závorkách jsou uvedeny identifikační čísla sekvencí v GenBank. Černý kruh značí sekvenci získanou ze zvířat při terénním výzkumu, černý čtverec značí sekvence získané z experimentálně infikovaných zvířat. Čísla v uzlech představují bootstrapové hodnoty s více než 50% podporou.



Obrázek 4. Maximum likelihood fylogenetický strom zkonstruovaný na základě částečných sekvencí genu kódujícího 70 kDa heat-shock protein (HSP70) získaných v této práci (tučně) a sekvencí *Cryptosporidium* spp. uložených v genové bance (GenBank). Číslo izolátu je identické s číslem v tabulce 3. V hranatých závorkách jsou uvedeny identifikační čísla sekvencí v GenBank. Černý kruh značí sekvenci získanou ze zvířat při terénním výzkumu, černý čtverec značí sekvence získané z experimentálně infikovaných zvířat. Čísla v uzlech představují bootstrapové hodnoty s více než 50% podporou.



Obrázek 5. Maximum likelihood fylogenetický strom zkonstruovaný na základě částečných sekvencí genu kódujícího 60 kDa glykoprotein (GP60) získaných v této práci (tučně) a sekvencí *Cryptosporidium* spp. uložených v genové bance (GenBank). Číslo izolátu je identické s číslem v tabulce 3. V hranatých závorkách jsou uvedeny identifikační čísla sekvencí v GenBank. Černý kruh značí sekvenci získanou ze zvířat při terénním výzkumu, černý čtverec značí sekvence získané z experimentálně infikovaných zvířat. Čísla v uzlech představují bootstrapové hodnoty s více než 50% podporou.



Oocysty *Cryptosporidium* coypu genotyp získané z přirozeně infikovaných nutrií (izolát 31132) byly infekční pro hospodářsky chovanou nutrii (nutrie 0). Nutrie 0 začala 5. den po infekci vylučovat oocysty, které byly morfometricky a geneticky identické s oocystami použitými jako inokulum (tabulka 4; obr. 2–5). Oocysty *Cryptosporidium* coypu genotypu získané z nutrie 0 byly infekční pro pět chovaných nutrií (nutrie 1–5). Experimentálně infikované nutrie 1–5 začaly vylučovat oocysty, respektive specifickou DNA *Cryptosporidium* coypu genotyp od 5. až 6. DPI a všechna zvířata zůstala infekční až do konce experimentu (obr. 7). Intenzita infekce se pohybovala od 2 000 do 62 000 OPG. Nejvyšší intenzita infekce, 20 000–62 000 OPG, byla pozorována od 6 do 11 DPI a počínaje dvanáctým dnem po infekci došlo u všech nutrií k poklesu intenzity infekce, na hodnoty okolo 10 000–15 000 OPG (obr. 7). Žádné ze zvířat nevykazovalo známky kryptosporidiózy a konzistence trusu odpovídala věku zvířete a příjmu potravy. Přítomnost vývojových stádií a specifické DNA *Cryptosporidium* coypu genotypu byla detekována výhradně v jejunu a ileu (obr. 8 a 9). Histologické a SEM analýzy ukázaly nízkou intenzitu infekce, přičemž v jejunu a ileu byla detekována jedna nebo dvě vývojová stadia na každém klku (obr. 8 a 9). Nebyly zjištěny rozdíly v infekci různých částí zasažených střev. Mikrovily sousedící s přichyceným vývojovým stádiem reagovaly na přítomnost parazita prodloužením. Velikost prodloužených mikroklků se zvětšovala s velikostí vývojového stadia a došlo k prodloužení o více než 2 μm (obr. 9). *Lamina propria* v jejunu a ileu byla mírně edematózní, ale tyto změny pravděpodobně nesouvisely s infekcí kryptosporidií. Oocysty *Cryptosporidium* coypu genotypu získané z experimentálně infikovaných nutrií (nutrie 0 a 1) byly morfometricky identické s těmi získanými z přirozeně infikovaných nutrií (izoláty 31132 a 31459; tabulka 4).

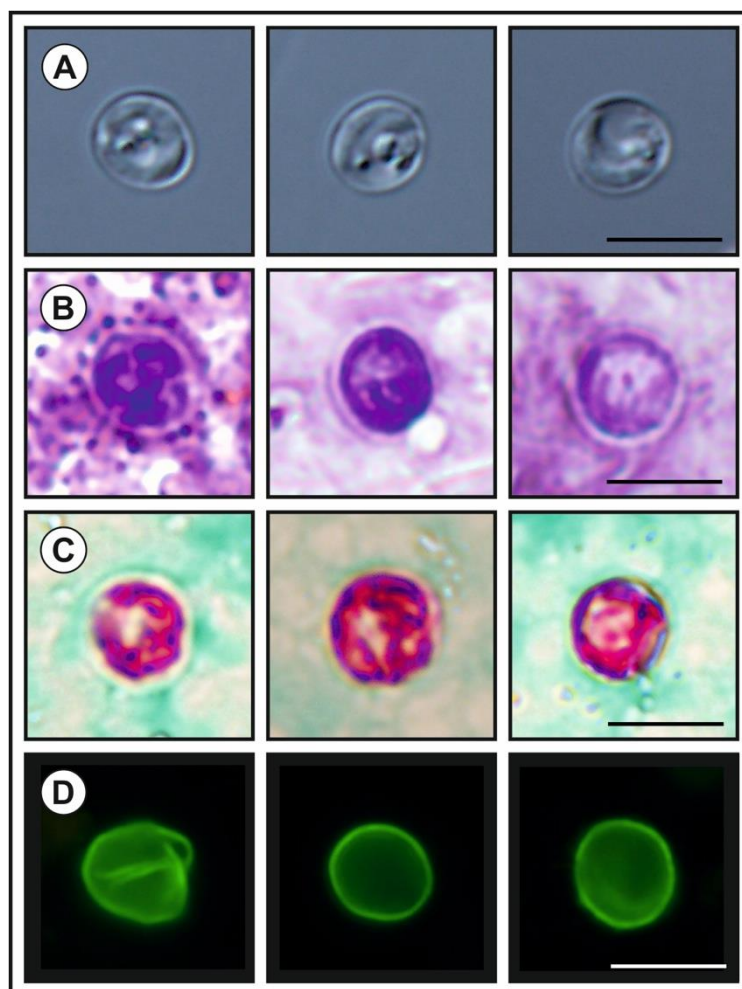
Mikroskopická a molekulární analýza trusu inokulovaných týdenních a osmitýdenních myší BALB /c a SCID, pískomilů a jednodenních kuřat neprokázala přítomnost oocyst a specifické DNA *Cryptosporidium* coypu genotypu v žádném z vyšetřovaných vzorků. Taktéž histologické a PCR vyšetření jednotlivých částí zažívacího traktu neukázala přítomnost vývojových stádií, respektive specifické DNA *Cryptosporidium* coypu genotyp.

Tabulka 4. Velikost oocyst *Cryptosporidium* coypu genotypu získané z přirozeně¹ a experimentálně² infikovaných nutrií (*Myocastor coypu*).

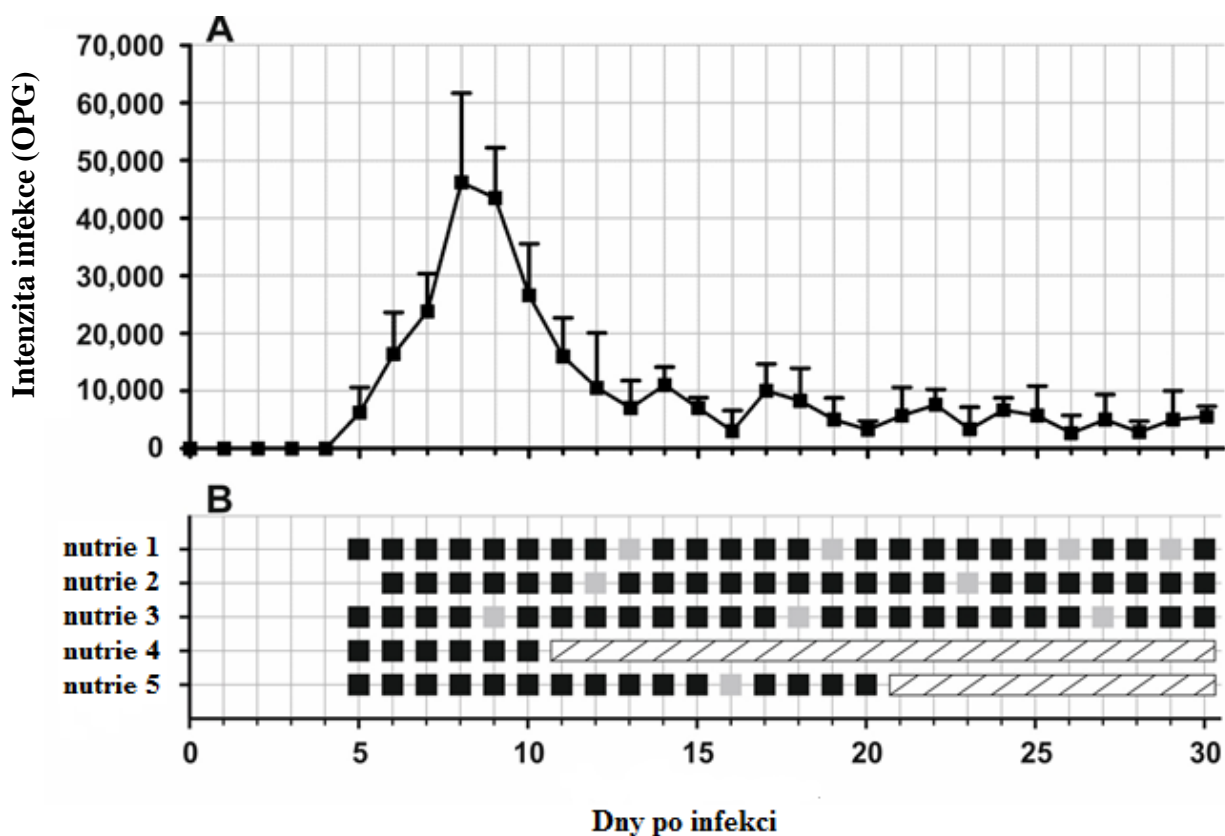
Izolát	Délka (μm)	Šířka (μm)	Délka/šířka poměr
	Rozsah (průměr ± s _x)	Rozsah (průměr ± s _x)	Rozsah (průměr ± s _x)
Nutrie 31132 ¹	4,8–5,2 (5,02±0,13)	4,7–5,0 (4,85±0,10)	1,00–1,08 (1,04±0,02)
Nutrie 31459 ¹	4,8–5,3 (5,01±0,14)	4,7–5,0 (4,81±0,10)	1,00–1,06 (1,04±0,01)
Nutrie N0 ²	4,8–5,2 (5,00±0,12)	4,7–5,0 (4,79±0,09)	1,02–1,09 (1,04±0,02)
Nutrie N1 ²	4,8–5,3 (5,02±0,14)	4,6–5,1 (4,85±0,14)	1,02–1,07 (1,03±0,01)

Poznámka: Délka a šířka 30 oocyst z každého izolátu byly měřeny pod DIC při 1000 násobném zvětšení a z nich byl pro výpočet použit poměr délky k šířce každé z oocyst.

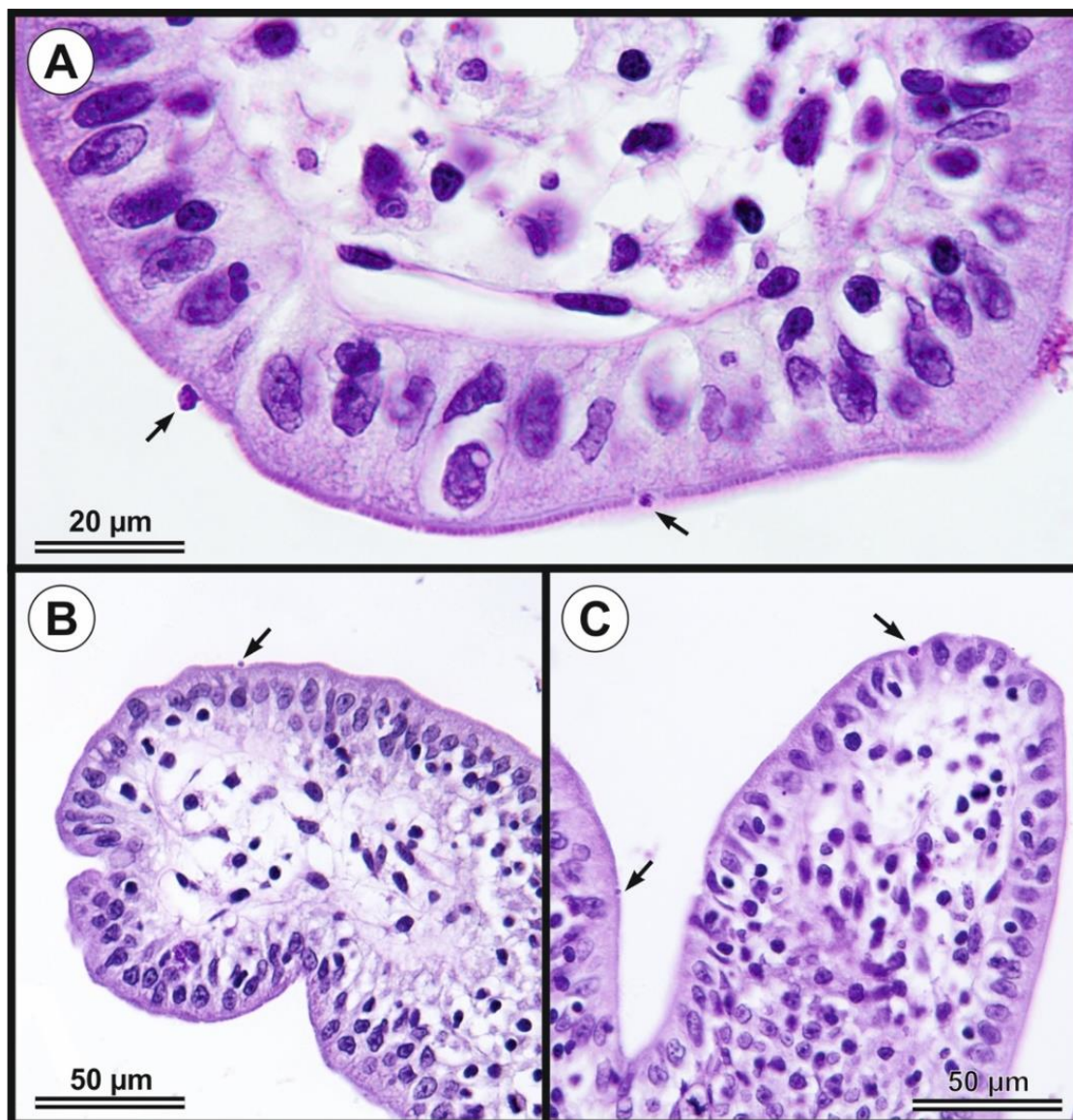
Obrázek 6. Oocysty *Cryptosporidium* coypu genotyp A) v diferenciální interferenční kontrastní mikroskopii, B) obarvené anilin-karbol-methyl-violetí, C) obarvené Ziehl-Nielsenovým barvením a D) značeno anti-*Cryptosporidium* FITC konjugovanou protilátkou. měřítko = 5 μm.



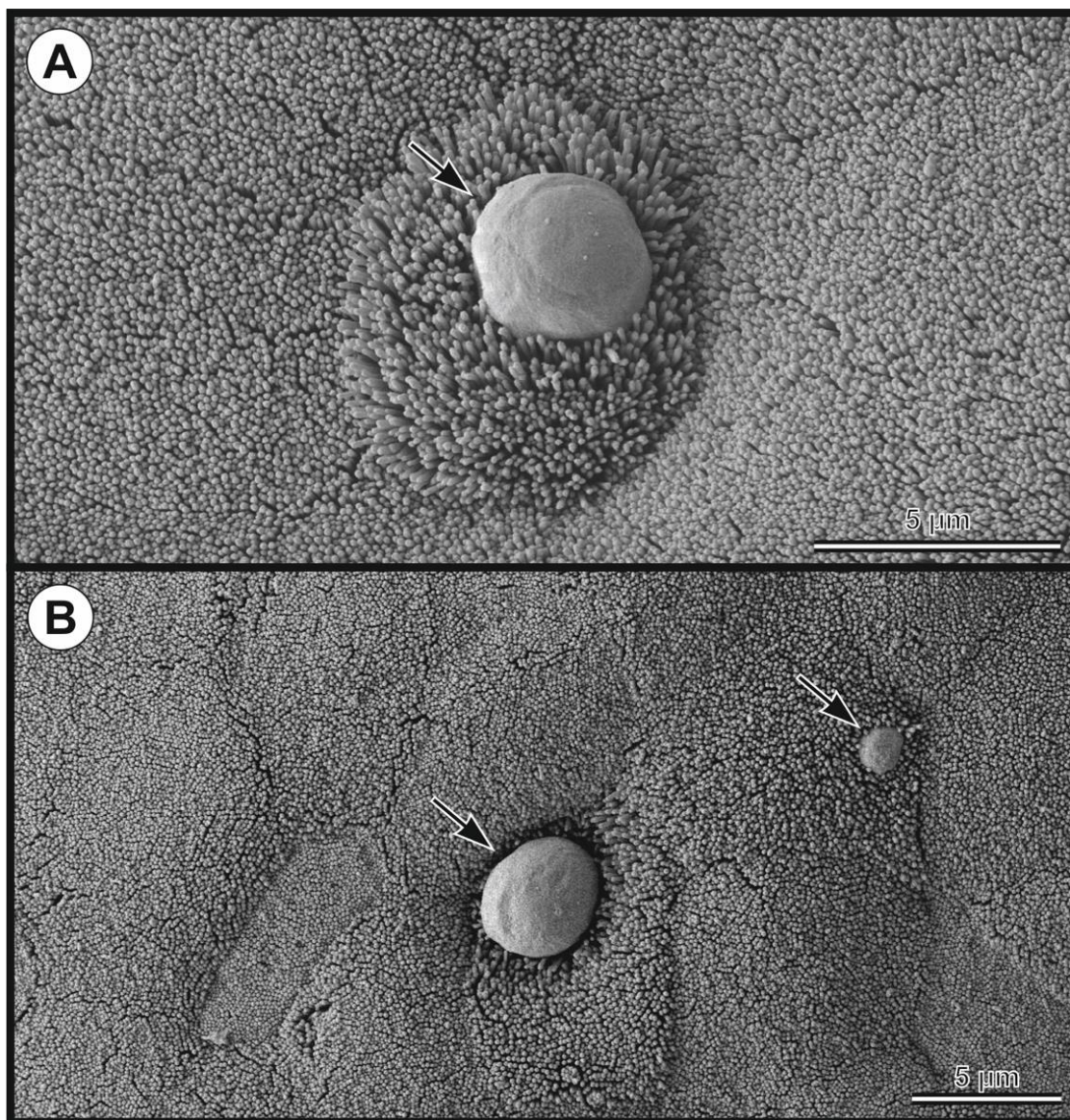
Obrázek 7. Průběh infekce *Cryptosporidium coypu* genotyp u experimentálně infikovaných nutrií (*Myocastor coypu*). **A)** Intenzita infekce vyjádřená jako počet oocyst na gram trusu (OPG), **B)** detekce oocyst na základě molekulárního a mikroskopického vyšetření vzorků trusu. Černé čtverečky označují přítomnost oocyst a specifické DNA *Cryptosporidium coypu* genotyp; šedé čtverečky označují pouze přítomnost specifické DNA bez detekce oocyst. Šrafované obdélníky označují chybějící zvíře, které bylo utraceno pro účely histologického vyšetření.



Obrázek 8. Histologické řezy obarvené periodic acid shiff (PAS) ukazující vývojová stadia *Cryptosporidium* coypu genotypu (šipka) na sliznici epitelu A) jejunu a B) ilea u experimentálně infikované dospělé nutrie (*Myocastor coypu*), která byla usmrcena 10 dní po infekci. Měřítko v každém obrázku.



Obrázek 9. Mikrofotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu ukazující vývojová stadia *Cryptosporidium* coypu genotypu (šipka) na slizničním epitelu **A**) jejunu a **B**) ilea u experimentálně infikované nutrie (*Myocastor coypu*), která byla usmrcena 10 dní po infekci. Měřítko obsažené v každém obrázku.



6. Diskuze

Tato studie je nejkompexnější studií o kryptosporidiích u zdivočelých nutrií. Zdivočelé populace tohoto globálně rozšířeného hlodavce dosud nebyly na přítomnost kryptosporidiových infekcí zkoumány. Prevalence kryptosporidií u zdivočelých nutrií byla relativně nízká (6,8 %). Naše výsledky odpovídají studii z Argentiny, ve které bylo vyšetřeno 108 volně žijících nutrií s prevalencí infekce kryptosporidii 3,7 % (Martino et al. 2012). V této studii byly oocysty detekovány mikroskopicky, tedy metodou méně citlivější než PCR metoda použitá v této práci. Lze předpokládat, že skutečná prevalence mohla být vyšší. Prevalence kryptosporidií u jiných vodních hlodavců je také nízká. Ve studii z Brazílie, ve které bylo vyšetřeno 145 kapybar (*Hydrochoerus hydrochaeris*), je uváděna prevalence 5,5 % (Meireles et al. 2007). Zhou et al. (2004) nezjistili přítomnost kryptosporidií u žádného z 84 severoamerických bobrů (*Castor canadensis*), které testovali v USA, ale na druhou stranu uvedli, že téměř 12 % z 237 ondatr (*Ondatra zibethicus*) bylo pozitivních. Paziewska et al. (2007) uvedli, že 7,7 % z 22 bobrů evropských (*Castor fiber*) v Polsku, mělo ve vzorcích trusu protilátky proti kryptosporidiím. Vzhledem k tomu, že infekce kryptosporidii jsou často spojeny s přenosem kontaminovanou vodou (Hamilton et al. 2018; Nasser et al. 2016), může být nízká prevalence u nutrií a dalších vodních hlodavců v této a dalších studiích překvapující. Budoucí studie by se měly zabývat tím, jak jsou kryptosporidie přenášeny u vodních savců: je přenos přes vodu důležitý, nebo existuje nějaká jiná cesta, jako je kontaminovaná potrava nebo přímý kontakt mezi jednotlivci? V této souvislosti je pozoruhodné, že *Cryptosporidium* coypu genotyp nebyl detekován v žádné ze studií zabývajících se výskytem kryptosporidií v povrchových vodách (Smith et al. 2010). Tuto absenci lze vysvětlit buď nízkou prevalencí v populaci nutrií spolu s nízkou intenzitou infekce, nebo spíše omezeným počtem studií sledujících kontaminaci vody v oblastech výskytu nutrií.

Pavlásek et al. (1991) popsal u chovaných nutrií výskyt *C. parvum* na základě morfologie oocyst. Přestože má *C. parvum* širokou hostitelskou specificitu, je u volně žijících druhů živočichů identifikováno zřídka (Čondlová et al. 2019; Feng 2010; Hattori et al. 2018; Huang et al. 2018; Horčíčková et al. 2019; Perz et al. 2001). Také v této studii byl tento druh nalezen jen v jediné nutrii. Na druhou stranu, je možné, že Pavlásek et Kozakiewicz (1991) opravdu detekovali *C. parvum*. Kromě morfometrické charakterizace izolátu autoři prokázali, že oocysty z přirozeně infikovaných nutrií byly infekční pro čtyřdenní laboratorní myši za experimentálních podmínek, což je charakteristické pro *C. parvum*, ale nikoli pro

Cryptosporidium coypu genotyp, jak jsme ukázali v této práci. Na základě našich současných znalostí však víme, že morfologie oocyst nedokáže spolehlivě rozlišit jednotlivé druhy kryptosporidií (Kváč et al. 2014a) a velikost oocyst uváděná Pavláskem a Kozakiewiczem (1991) ($5,0 \times 4,75 \mu\text{m}$) je podobná *Cryptosporidium* coypu genotyp ($5,02 \times 4,85 \mu\text{m}$) a *C. ubiquitum* ($5,04 \times 4,66 \mu\text{m}$), dvěma druhům, u kterých jsme zjistili, že se u nutrií vyskytují častěji než *C. parvum* ($5,19 \times 4,9 \mu\text{m}$). Také druhové určení kryptosporidií nalezených u volně žijících nutrií v Argentině, které měřily $4 \text{ až } 4,5 \times 4,0 \mu\text{m}$, je s ohledem na překrývající se velikosti oocyst jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií nemožné (Martino et al. 2012).

Nález *C. ubiquitum* a *Cryptosporidium* coypu genotyp u několika zvířat na různých lokalitách naznačuje, že tyto druhy jsou běžné u zdivočelých nutrií. *Cryptosporidium ubiquitum*, druh se širokým hostitelským spektrem, byl popsán u domácích a divokých přežvýkavců, hlodavců, masožravců a primátů (Kotková et al. 2016; Li et al. 2016; Mi et al. 2014; Tzanidakis et al. 2014; Wang et al. 2014). Subtyp gp60 XIIId *C. ubiquitum*, který jsme detekovali u nutrií v této práci, byl dříve popsán u lidí, makaků, jelenů, mývalů, lesních svišťů, činčil nebo norků (Chen et al. 2019; Kellnerová et al. 2017; Kotková et al. 2016; Kubota et al. 2019; Li et al. 2014; Qi et al. 2015), což naznačuje jeho adaptaci na různé hostitele. Naopak *Cryptosporidium* coypu genotyp považujeme za kryptosporidii s úzkou hostitelskou specificitou. Původ *Cryptosporidium* coypu genotyp v nutriích ve střední Evropě nelze objasnit bez dalších studií. Lze předpokládat, že tento druh byl do Evropy zavlečen s dováženými nutriemi v minulosti, podobně jako v případě *Cryptosporidium* skunk genotyp, který byl do Evropy zavlečen s veverkami popelavými (Prediger et al. 2017).

Adaptace na jednoho hostitele není v rámci rodu *Cryptosporidium* jedinečná. Ačkoli se adaptace na jednoho hostitele dříve přisuzovala druhům parazitujícím na obojživelnících, plazech a rybách, kvůli malému počtu studií existuje několik savčích kryptosporidií, které infikují pouze jeden hostitelský druh. V minulosti bylo častým příkladem *C. wairi*, přičemž jediným známým hostitelem bylo morče (*Cavia porcellus*). Také *Cryptosporidium homai* parazitující výlučně na morčatech a *C. scrofarum* a *C. suis* u prasat (*Sus scrofa*), *C. bovis* u skotu (*Bos taurus*), *C. occultus* u potkanů (*Rattus* spp.) nebo *C. macropodum* u klokanů představují druhy přizpůsobené jednomu druhu hostitele (Fayer et al. 2005; Kváč et al. 2013, 2018a; Power et al. 2008; Ryan et al. 2004). Nálezy těchto druhů u jiných hostitelů představují spíše ojedinělé případy nebo mechanický průchod než adaptaci na hostitele (Khan et al. 2010; Kváč et al. 2009; Navarr-I-Martinez et al. 2007).

Prepatentní perioda *Cryptosporidium* coypu genotyp (5–6 DPI) odpovídá délce vývojového cyklu ostatních střevních kryptosporidií, které jsou specifické pro hlodavce, jako je *C. rattii* u potkanů (4–5 DPI), *C. alticolis* u hrabošů (3–4 DPI), *C. tyzzeri* u myší (4–7 DPI) nebo jiné savce, jako je *C. parvum* u telat (2–7 DPI) a *C. scrofarum* u prasat (4–6 DPI) (Horčíčková et al. 2018; Ježková et al. 2021; Kváč et al. 2013,2018c; Ren et al. 2012; Tzipori et al. 1983).

Žádná z nutrií pozitivních na *C. parvum* nebo *C. ubiquitium* neměla ve výkalech detekovatelné oocysty, což naznačuje nízkou úroveň infekce, což je v souladu s naším předchozím nálezem (Kváč et al. 2018b). Tři z pěti nutrií přirozeně infikovaných *Cryptosporidium* coypu genotyp vylučovaly oocysty na úrovních mezi 10 000 a 20 000 OPG a podobné počty byly detekovány u experimentálně infikovaných nutrií. Při pitvě pozitivních nutrií infikovaných *Cryptosporidium* coypu genotyp nebyly pozorovány žádné makroskopické změny ve střevní sliznici. Nízká úroveň vylučování oocyst byla v souladu s množstvím vývojových stadií detekovaných ve střevním epitelu a absencí klinických příznaků. Podobný vztah mezi intenzitou infekce, tkání zažívacího traktu a vylučováním oocyst byl pozorován i u jiných druhů kryptosporidií infikujících tenké střevo (Čondlová et al. 2018; Deming et al. 2008; Horčíčková et al. 2019; Ježková et al. 2021; Kváč et al. 2014b; Tzipori et al. 1982). Vyšetření skenovací elektronovou mikroskopií ukázalo prodloužení mikroklků kolem vývojových stadií *Cryptosporidium* coypu genotyp, které bylo dříve pozorováno také u SCID myší infikovaných *C. parvum* (Umemiya et al. 2005). Bohužel, u většiny dosud popsaných druhů kryptosporidií nebyly provedeny analýzy pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, a proto není možné zcela posoudit, zda prodlužování mikroklků je výsledkem interakce *Cryptosporidium* coypu genotyp a epitelu střeva nutrie nebo se vyskytuje i u jiných hostitelů s kryptosporidiovými infekcemi. Klinické příznaky kryptosporidiových infekcí, stejně jako v této studii, se u volně žijících zvířat infikovaných hostitelsky specifickými druhy kryptosporidií vyskytují jen zřídka (Fayer et al. 2010; Hofmannová et al. 2016; Holubová et al. 2020).

Žaludeční kryptosporidie savců infikují výlučně žlázovou část žlázového žaludku, zatímco střevní druhy jsou přizpůsobeny různým částem tenkého nebo tlustého střeva. Podobné orgánové adaptace byly popsány u kokcií rodu *Eimeria* (Lopez-Osorio et al. 2020). Stejně jako *C. rattii* nebo *C. scrofarum* je životní cyklus *Cryptosporidium* coypu genotyp lokalizován v zadním jejunu a ileu (Ježková et al. 2021; Kváč et al. 2013). Výsledky naší studie ukazují, že *Cryptosporidium* coypu genotyp neinfikuje přední část tenkého střeva, kde probíhá infekce

např. druhem *C. parvum*, ani tlusté a slepé střevo, kde probíhá životní cyklus např. *C. occultus*, *C. suis* nebo *C. ornithophilus* (Hofmannová et al. 2016; Kváč et al. 2018a; Ryan et al. 2004).

Pro druhovou determinaci kryptosporidií se více jak 20 let používá gen kódující SSU (Koehler et al. 2019). Avšak kryptosporidie, stejně jako příbuzné *Plasmodium* a *Eimeria*, mají ve svém genomu paralogní kopie genu SSU (El-Sherry et al. 2013; Le Blancq et al. 1997; Nishimoto et al. 2008; Qari et al. 1994; Tang et al. 2016). Naše i předchozí výsledky ukázaly, že použití pouze sekvencí SSU k odvození evolučních vztahů kryptosporidií může vést k mylným závěrům a topologie stromu SSU se může částečně lišit od stromů konstruovaných na základě genů kódujících proteiny (Čondlová et al. 2019; Li et al. 2014; Stenger et al. 2015). Proto je nutné ve fylogenetických analýzách použít další polymorfni lokusy, jako jsou geny HSP70, aktin nebo COWP (Čondlová et al. 2019; Tang et al. 2016). *Cryptosporidium* coypu genotyp tvořil v ML stromech SSU, aktinu a HSP70 samostatnou větev, přičemž nejbližší příbuzná skupina obsahovala druhy jako *C. parvum*, *C. cuniculi* a *C. wrairi*. Tyto výsledky podporují genetickou jedinečnost *Cryptosporidium* coypu genotyp a jeho postavení jako samostatného druhu rodu *Cryptosporidium*.

7. Závěry

Nebyly detekovány žádné kryptosporidiové infekce u farmově chovaných nutrií v České republice.

Prevalence kryptosporidií u zdivočelých nutrií v České republice a na Slovensku byla poměrně nízká (6,8 %).

U zdivočelé nutrie byly parazitovány *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium ubiquitum* a *Cryptosporidium coypu* genotyp u kterého byly popsány biologické vlastnosti.

Oocysty *Cryptosporidium coypu* genotyp měřily $4,8-5,2 \times 4,7-5,0 \mu\text{m}$.

Experimentální infekce ukázaly, že *Cryptosporidium coypu* genotyp je infekční pouze pro nutrie, u ostatních experimentálních zvířat nebyla infekce prokázána.

Vývojový cyklus *Cryptosporidium coypu* genotyp je lokalizován v zadním jejunu a ileu.

Příznaky kryptosporidiózy nebyly pozorovány u žádného zvířete.

8. Literatura

- Abrahamsen M. S., Templeton T. J., Enomoto S., Abrahante J. E., Zhu G., Lancto CH. A., Deng M., Chang L., Widmer G., Tzipori S., Buck G. A., Xu P., Bankier A. T., Dear P. H., Konfortov B. A., Spriggs H. F., Iyer L., Anantharaman V., Aravind L., Kapur V. 2004:** Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* 304: 441–445.
- Adesiyun A. A., Kaminjolo J. S., Ngeleka M., Mutani A., Borde G., Harewood W., Harper W. 2001:** A longitudinal study on enteropathogenic infections of livestock in Trinidad. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 29–35.
- Aliev E. F. 1967:** Numerical changes and the population structure of the coypu, *Myocastor coypus* (Molina, 1782), in different countries. *Seaugetierkunkliche Mitteilungen* 15: 238–242.
- Amadi B., Mwiya M., Sianongo S., Payne L., Watuka A., Katubulushi M., Kelly P. 2009:** High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. *BMC Infectious Diseases* 9:195.
- Anděra M., Červený J. 2003:** Výskyt nutrie (*Myocastor coypus*) v České republice. *Lynx* (Praha), n. s., 34: 512.
- Appelbee A. J., Thompson R. C., Olson M. E. 2005:** *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife—current status and future needs. *Trends in Parasitology* 21: 370–376.
- Babero B. B., Lee J. W. 1961:** Studies on the helminths of nutria, *Myocastor coypus* (Molina), in Louisiana with check-list of other worm parasites from this host. *Journal of Parasitology* 47: 378–390.
- Bajer A., Bednarska M., Pawelczyk A., Behnke J. M., Gilbert F. S., Sinski E. 2002:** Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology* 125: 21–34.
- Banfield A. W. F., Brooks A., Matthews G. J., Wilcox J. 1974:** The mammals of Canada. Toronto: Published for the National Museum of Natural Sciences, National Museums of Canada by University of Toronto Press, pp. 352.
- Bankier A. T., Spriggs H. F., Fartmann B., Konfortov B. A., Madera M., Vogel Ch., Teichmann S. A., Ivens A., Dear P. H. 2003:** Integrated Mapping, Chromosomal Sequencing and Sequence Analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Genome Research* 13: 1787–1799.

- Baroudi D., Hakem A., Adamu H., Amer S., Khelef D., Adjou K., Dahmani H., Chen X., Roellig D., Feng Y., Xiao L. 2018:** Zoonotic *Cryptosporidium* species and subtypes in lambs and goat kids in Algeria. *Parasites & Vectors* 11: 582.
- Bednarska M., Bajer A., Kulis K., Sinski E. 2003:** Biological characterisation of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10(2): 163–169.
- Bjorkman C., Svensson C., Christensson B., de Verdier K. 2003:** *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 44: 145–152.
- Blagburn B. L., Lindsay D. S., Giambrone J. J., Sundermann C. A., Hoerr F. J. 1987:** Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens. *Poultry Science* 66(3): 442–449.
- Bones A. J., Jossé L., More Ch., Miller Ch. N., Michaelis M., Tsaousis A. D. 2019:** Past and future trends of *Cryptosporidium* in vitro research. *Experimental Parasitology* 196: 28–37.
- Bounds D. L. 2000:** Nutria: an invasive species of national concern. *Wetland Journal* 12: 9–16.
- 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.
- Carter J., Foote A. L., Johnson L. A. 1999:** Modeling the effect of nutria (*Myocastor coypus*) on wetland loss. *Wetlands* 29: 209–219.
- Carter J., Leonard B. P. 2002:** A Review of the Literature on the Worldwide Distribution, Spread of, and Efforts to Eradicate the Coypu (*Myocastor coypus*). *Wildlife Society Bulletin* 30(1): 162–175.
- Current W. L. 1988:** The biology of *Cryptosporidium*. *ASM News* 54: 605–611.
- Current W. L. 1985:** Cryptosporidiosis, a protozoologist's view of an emerging zoonosis. *Microbial Ecology* 15: 165–200.
- Current W. L., Reese N. C. 1986:** A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *Journal of Protozoology* 33: 98–108.
- Curtiss J. B., Leone A. M., Wellehan J. F. X., Emerson J. A., Howerth E. W., Farina L. L. 2015:** Renal and cloacal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* avian genotype V) in a major mitchell's cockatoo (*Lophochroa leadbeateri*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 46(4): 934–937.

- Čondlová S., Horčíčková M., Havrdová N., Sak B., Hlásková L., Perec-Matysiak A., Kicia M., McEvoy J., Kváč M. 2019:** Diversity of *Cryptosporidium* spp. in *Apodemus* spp. in Europe. *European Journal of Protistology* 69: 1–13.
- Čondlová Š., Horčíčková M., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R., Stanko M., McEvoy J., Kváč M. 2018:** *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. *European Journal of Protistology* 63: 1–12.
- Danišová O., Valenčáková A., Stanko M., Luptáková L., Hatalová E., Čanády A. 2017:** Rodents as a reservoir of infection caused by multiple zoonotic species/genotypes of *C. parvum*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. scrofarum*, and the first evidence of *C. muskrat* genotypes I and II of rodents in Europe. *Acta Tropica* 172: 29–35.
- Deming C., Greiner E., Uhl E. W. 2008:** Prevalence of *Cryptosporidium* infection and characteristics of oocyst shedding in a breeding colony of leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39: 600–607.
- Dessi G., Tamponi C., Varcasia A., Sanna G., Pipia A. P., Carta S., Salis F., Díaz P., Scala A. 2020:** *Cryptosporidium* infections in sheep farms from Italy. *Parasitology Research* 119: 4211–4218.
- Dozier H. L. 1952:** The present status and future of nutria in the southeast states. *Proceedings of the Annual Conference of the Southeastern Association of Game and Fish Commissioners* 6: 368–373.
- Ehrlich S. 1967:** Field studies in the adaptation of nutria to seasonal variations. *Mammalia* 31: 347–360.
- El-Sherry S., Ogedengbe M. E., Hafeez M. A., Barta J. R. 2013:** Divergent nuclear 18S rDNA paralogs in a turkey coccidium, *Eimeria meleagrimitis*, complicate molecular systematics and identification. *International Journal for Parasitology* 43: 679–685.
- Evans J. 1970:** About nutria and their control. *United States Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Denver Wildlife Research Center, Denver, Colorado, USA* 86: 1–74.
- Fayer R. 2004:** *Cryptosporidium*: a waterborne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* 126: 37–56.
- Fayer R., Gasbarre L., Pasquali P., Canals A., Almeria S., Zarlenga D. 1998:** *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology* 28: 49–56.
- Fayer R., Santín M., Macarisin D. 2010:** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology* 172 : 23–32.

- Fayer R., Santín M., Trout J. M. 2007:** Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in the eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology* 145: 260–266.
- Fayer R., Santín M., Xiao L. 2005:** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology* 91: 624–629.
- Fayer R., Speer C., Dubey J. 1997:** The general biology of *Cryptosporidium* in *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 530 pp.
- Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P. 1990:** General biology of *Cryptosporidium*, in *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–29.
- Fayer R., Trout J. M., Xiao L., Morgan U. M., Lal A. A., Dubey J. P. 2001:** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology* 87(6): 1415–1422.
- Fayer R., Xiao L. 2007:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Eds, CRC Press, New York, 560 pp.
- Fayer R., Xiao L. 2008:** The general biology of *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL. 1–42.
- Feng Y. 2010:** *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Experimental Parasitology* 124: 128–137.
- Feng Y., Alderisio 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. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6475–6483.
- Feng Y., Ryan U. M., Xiao L. 2018:** Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology* 34: 997–1011.
- Fleta J., Sanchez-Acedo C., Clavel A., Quilez J. 1995:** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extraintestinal tissues of sheep and pigs. *Veterinary Parasitology* 59: 201–205.
- Gosling L. M., Baker S. J. 1987:** Planning and monitoring an attempt to eradicate coypus from Britain. *Symposia of the Zoological Society of London* 58: 99–113.
- Grace J. B. 1992:** The impact of nutria (*Myocastor coypus*) on Gulf Coast wetlands; Symposium Introduction. In *Proceedings of the thirteenth annual meeting of the American Society of Wetland Scientists*. New Orleans, Louisiana, USA 70–74 pp.
- Hamilton K. A., Waso M., Reyneke B., Saeidi N., Levine A., Lalancette C., Besner M. C., Khan W., Ahmed W. 2018:** *Cryptosporidium* and *Giardia* in Wastewater and Surface Water Environments. *Journal of Environmental Quality* 47: 1006–1023.

- Hattori K., Donomoto T., Manchanayake T., Shibahara T., Sasai K., Matsubayashi M. 2018:** First surveillance and molecular identification of the *Cryptosporidium* skunk genotype and *Cryptosporidium parvum* in wild raccoons (*Procyon lotor*) in Osaka, Japan. *Parasitology Research* 117: 3669–3674.
- Heine J., Pohlenz J. F., Moon H. W., Woode G. N. 1984:** Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *The Journal of Infectious Diseases* 150: 768–775.
- Henriksen S. A., Pohlenz J. F. 1981:** Staining of *cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica* 22: 594–596.
- Hewitt R. G., Yiannoutsos C. T., Higgs E. S., Carey J. T., Geiseler P. J., Soave R., Rosenberg R., Vazquez G. J., Wheat L. J., Fass R. J. 2000:** Paromomycin: No More Effective than Placebo for Treatment of Cryptosporidiosis in Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases* 31(4): 1084–1092.
- Hofmannová L., Hauptman K., Huclová K., Květoňová D., Sak B., Kváč M. 2016:** *Cryptosporidium erinacei* and *C. parvum* in a group of overwintering hedgehogs. *European Journal of Protistology* 56: 15–20.
- 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. *Parasitology Research* 115: 2243–2251.
- Holubová N., Tůmová L., Sak B., Hejzlerová A., Konečný R., McEvoy J., Kváč M. 2020:** Description of *Cryptosporidium ornithophilus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) as a new species and diversity in farmed ostriches. *Parasites & Vectors* 13: 340.
- Holubová N., Zikmundová V., Limpouchová Z., Sak B., Konečný R., Hlásková L., Rajský D., Kopacz Z., McEvoy J., Kváč M. 2019:** *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *European Journal of Protistology* 69: 70–87.
- Horčíčková M., Čondlová Š., Holubová N., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R., Sedláček F., Clark M., Giddings C., McEvoy J., Kváč M. 2019:** Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology* 146(2): 220–233.
- Howerth E. W. 1981:** Bovine cryptosporidiosis. *Journal of the South African Veterinary Association* 52: 251–253.

- Huang B. Q., Chen X. M., LaRusso N. F. 2004:** *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro, a morphological study. *Journal of Parasitology* 90: 212–221.
- Huang J. Y., Zhang Z. J., Zhang Y. Q., Yang Y., Zhao J. F., Wang R. J., Jian F. C., Ning C. S., Zhang W. Y., Zhang L. X. 2018:** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in deer in Henan and Jilin, China. *Parasites & Vectors* 11: 239.
- Checkey W., White A. C., Jaganath D., Arrowood M. J., Chalmers R. M., Chen X. M., Fayer R., Griffiths J. K., Guerrant R. L., Hedstrom L., Huston Ch., Kotloff K., Kang G., Mead J. R., Miller M., Petri W. A., Priest J. W., Roos D. S., Houpt E. R. 2015:** A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *cryptosporidium*. *The Lancet Infectious Diseases* 15: 85–94.
- Chen L., Hu S. H., Jiang W., Zhao J.G., Li N., Guo Y.Q., Liao C. H., Han Q., Feng Y. Y., Xiao L. H. 2019:** *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* subtypes in crab-eating macaques. *Parasites & Vectors* 12: 350.
- Jenžková J., Prediger J., Holubová N., Sak B., Konečný R., Feng Y., Xiao L., Rost M., McEvoy J., Kváč M. 2021:** *Cryptosporidium ratti* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in the Czech Republic. *Parasitology* 148(1): 84–97.
- 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.
- Kellnerová K., Holubová N., Jandová A., Vejčik A., McEvoy J., Sak B., Kváč M. 2017:** First description of *Cryptosporidium ubiquitum* XIIa subtype family infarmed fur animals. *European Journal of Protistology* 59: 108–113.
- Khan S. M., Debnath C., Pramanik A. K., Xiao L., Nozaki T., Ganguly S. 2010:** Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. *Veterinary Parasitology* 171: 41–47.
- Kinler N. W. 1992a:** Biology and ecology of nutria. In Proceedings of the thirteenth annual meeting of the American Society of Wetland Scientists 31 May- 6 June 1992, New Orleans, Louisiana, USA 75 pp.
- Kinler N. W. 1992b:** Historical and biological overview. In Nutria and muskrat management symposium. Louisiana Cooperative Extension Service, 8-9 October 1992, Baton Rouge, USA pp. 8–14.

- Kinler N. W., Linscombe G., Ramsey P. R. 1987:** Nutria. In M. Novak, J. A. Baker, M.E. Obbard, and B. M editors. Wild furbearer management and conservation in North America. The Ontario Trappers Association, Ontario Ministry of Natural Resources Toronto, Canada pp. 326–343.
- Koehler A. V., Šlapeta J. 2019:** Use of Markers to Determine *Cryptosporidium* Genotypes for Epidemiology Tracking and Detection. In *Cryptosporidium* Methods and Protocols, Mead J. R., Arrowood M. J., Eds. Humana Press: Netherlands, pp. 117–127.
- Korich D. G., Mead J. R., Madore M. S., Sinclair N. A., Sterling C. R. 1990:** Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. Applied and Environmental Microbiology 56: 1423–1428.
- Kotková M., Němejc K., Sak B., Hanzal V., Květoňová D., Hlásková L., Čondlová S., McEvoy J., Kváč M. 2016:** *Cryptosporidium ubiquitum*, *C. muris* and *Cryptosporidium* deer genotype in wild cervids and caprines in the Czech Republic. Folia Parasitologica 63: 003.
- Kruse H., Kirkemo A. M., Handeland K. 2004:** Wildlife as source of zoonotic infections. Emerging Infectious Diseases 10: 2067–2072.
- Kubota R., Matsubara K., Tamukai K., Ike K., Tokiwa T. 2019:** Molecular and histopathological features of *Cryptosporidium ubiquitum* infection in imported chinchillas *Chinchilla lanigera* in Japan. Parasitology International 68: 9–13.
- Kváč M., Havrdová N., Hlásková L., Daňková T., Kanděra J., Ježková J., Vítovec J., Sak B., Ortega Y., Lihua X., Modrý D., Chelladurai J. R. J.J., 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(1): e0147090.
- Kváč M., Hofmannová L., Hlásková L., Květoňová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B. 2014b:** *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. Veterinary Parasitology 201: 9–17.
- Kváč M., Horčíčková M., Holubová N., Květoňová D., Hlásková L., McEvoy J., Rajský D., Sak B. 2018b:** *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium* coypu genotype in wild coypu (*Myocastor coypus*). In 14th International Congress of Parasitology Daegu, Korea.
- Kváč M., Kestránová M., Pinková M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B. 2013:**

- Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology* 191: 218–227.
- Kváč M., Květoňová D., Sak B., Ditrich O. 2009:** *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. *Emerging Infectious Diseases journal* 15: 982–983.
- Kváč M., McEvoy J., Stenger B., Clark M. 2014a:** Cryptosporidiosis in other vertebrates. In Cacciò, S. M., and Widmer, G. eds. *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, Wien, pp. 237–326.
- Kváč M., Vlnatá G., Ježková J., Horčíčková M., Konečný R., Hlásková L. McEvoy J., Sak B. 2018c:** *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *European Journal of Protistology* 63: 96–104.
- Kváč M., Vlnatá G., Ježková J., Hořčíčková M., Konečný R., Hlásková L., McEvoy J., Sak B. 2018a:** *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *European Journal of Protistology* 63: 96–104.
- Laksemi D. A., Suwanti L. T., Mufasirin M., Suastika K., Sudarmaja M. 2020:** Opportunistic parasitic infections in patients with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome: A review. *Veterinary World* 13(4): 716–725.
- 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.
- Levine R. J. 1988:** Uncertainty in Clinical Research. *Law Medicine and Health Care* 16: 174–182.
- 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., Roellig D., Feng Y. 2014:** Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases* 20: 217–224.
- Li P., Cai J., Cai M., Wu W., Li C., Lei M., Xu H., Feng L., Ma J., Feng Y., Xiao L. 2016:** Distribution of *Cryptosporidium* species in Tibetan sheep and yaks in Qinghai, China. *Veterinary Parasitology* 215: 58–62.
- Li X., Pereira M. G. C., Larsen R., Xiao Ch., 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(3): 343–50.

- Linscombe G., Kinler N. 1997:** A survey of vegetative damage caused by nutria herbivory in the Barataria and Terrebonne Basins. Barataria-Terrebonne National Estuary Program. Eds. Nicholls State University Thibodaux, Louisiana, USA pp. 118–135.
- Linscombe G., Kinler N., Wright V. 1981:** Nutria population density and vegetative changes in brackish marsh in coastal Louisiana. In Proceedings of the Worldwide Furbearer Conference. Frostburg, Maryland, USA, pp. 129–141.
- Liu CH., Wang L., Lancto CH. A., Abrahamsen M. S. 2009:** Characterization of a *Cryptosporidium parvum* protein that binds single-stranded G strand telomeric DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology* 165: 132–141.
- Lopez-Osorio S., Chaparro-Gutierrez J. J., Gomez-Osorio L. M. 2020:** Overview of Poultry Eimeria Life Cycle and Host-Parasite Interactions. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 384.
- Lowery G. H. 1974:** The mammals of Louisiana and its adjacent waters. Louisiana State University, Baton Rouge, USA, pp. 65–83.
- 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. *Applied and environmental microbiology* 75(24): 7692–7699.
- Martino P. E., Radman N. E., Gamboa M. I., Samartino L. E., Parrado E. J. 2018:** Ectoparasites from some *Myocastor coypus* (Molina, 1782) populations (Coypus or Nutria) in Argentina. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria* 27: 254–257.
- Martino P. E., Radman N., Parrado E., Bautista E., Cisterna C., Silvestrini M. P., Corba S. 2012:** Note on the occurrence of parasites of the wild nutria (*Myocastor coypus*, Molina, 1782). *Helminthologia* 49: 164–168.
- Meireles M. V., Soares R. M., Bonello F., Gennari S. M. 2007:** Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. *Veterinary Parasitology* 147: 166–170.
- Mi R., Wang X., Huang Y., Zhou P., Liu Y., Chen Y., Chen J., Zhu W., Chen Z. 2014:** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in goats across four provincial level areas in China. *PLoS One* 9: e111164.
- 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.

- Nakamura A. A., Meireles M. V. 2015:** *Cryptosporidium* infections in birds--a review. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology 24: 253–267.
- Nasser A. M. 2016:** Removal of *Cryptosporidium* by wastewater treatment processes: a review. Journal of Water and Health 14: 1–13.
- Navarr-I-Martinez L., da Silva A. J., Bornay-Llinares F. J., Moura I. N. S., del Aguila C., Oleaga A., Pieniazek N. J. 2007:** Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium bovis*-like isolate from a newborn lamb in Spain. Journal of Parasitology 93: 1536–1538.
- 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.
- Nydam D. V., Wade S. E., Schaaf S. L., Mohammed H. O. 2001:** Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* cysts shed by dairy calves after natural infection. American Journal of Veterinary Research 62: 1612–1615.
- O’Donoghue P. J. 1995:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. International Journal for Parasitology 25: 139–195.
- Oliveira B. C. M., Ferrari E. D., Panegossi M. F. C. P., Nakamura A. A., Corbucci F. S., Nagata W. B., Sanots B. M., Gomes J. F., Meireles M. V., Widmer G., Bresciani K. D. S. B. 2017:** First description of *Cryptosporidium parvum* in carrier pigeons (*Columba livia*). Veterinary Parasitology 243: 148–150.
- Olson M. E., O’Handley R. M., Ralston B. J., McAllister T. A., Thompson R.C. 2004:** Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. Trends in Parasitology 20: 185–191.
- Papáček M., Matěnová V., Matěna J., Soldán T. 1994:** Zoologie. Eds. Scientia, spol. s. r. o. Praha 285 pp.
- Pavlásek I., Kozakiewicz B. 1991:** Coypus (*Myocastor coypus*) as a new host of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). Folia Parasitologica 38: 90.
- Paziewska A., Bednarska M., Niewegłowski H., Karbowski G., Bajer A. 2007:** Distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in selected species of protected and game mammals from north-eastern Poland. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 14: 265–270.
- Peng M. M., Matos O., Gatei W., Das P., Stantic-pavlinic M., Bern C., Sulaiman I. M., Glaberman S., Lal A. A., Xiao L. 2001:** A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. Journal of Eukaryotic Microbiology 10: 28–31.

- Perz J. F., Le Blancq S. M. 2001:** *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1154–1162.
- 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.
- Prediger J., Horčíčková M., Hofmannová L., Sak B., Ferrari N., Mazzamuto M. V., Romeo C., Wauters L. A., McEvoy J., Kváč M. 2017:** Native and introduced squirrels in Italy host different *Cryptosporidium* spp. *European Journal of Protistology* 61: 64–75.
- 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.
- Qi M., Luo N., Wang H., Yu F., Wang R., Huang J., Zhang L. 2015:** Zoonotic *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in pet chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in China. *Parasitology International* 64: 339–341.
- Ramirez N. E., Ward L.A., Sreevatsan S.A. 2004:** Review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection* 6: 773–785.
- Reboredo-Fernández A., Ares-Mazás E., Martínez-Cedeira J. A., Romeo-Suances R., Caccio M., Gómez-Couso H. 2015:** *Giardia* and *Cryptosporidium* in cetaceans on the European Atlantic coast. *Parasitology Research* 114: 693–698.
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning Ch., Jian F., Wang R., Lv Ch., Wang Q., Arrowood M. J., Xiao L. 2012:** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology* 130: 274–281.
- Rossignol J.-F., Hidalgo H., Feregrino M., Higuera F., Gomez W. H., Romero J. L., Padierna J., Geyne A., Ayers M. S. 1998:** A double-‘blind’ placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhoea in aids patients in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92(6): 663–666.
- Roy S. S., Sarkar S., Batabyal S., Pramanik A. K., Das P. 2006:** Observations on the epidemiology of bovine cryptosporidiosis in India. *Veterinary Parasitology* 141: 330–333.
- 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., Paparini A., Tong K. S., Yang R. C., Gibson-Kueh S., O'Hara A., Lymbery A., Xiao L. H. 2015:** *Cryptosporidium huwi* n. sp (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology* 150: 31–35.
- Ryan U., Xiao L. 2014:** Taxonomy and molecular taxonomy S.M. Cacciò, G. Widmer Eds., *Cryptosporidium: Parasite and Disease* (1st ed.), Springer, Wien, pp. 3–42.
- Santoro A., Dorbek-Kolin E., Jeremejeva J., Tummeleht L., Toomas O. 2019:** Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. in calves in Estonia: high prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding and 10 subtypes identified. *Parasitology* 146(2): 261–267.
- 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.
- Seifollahi Z., Sarkari B., Motazedian M. H., Asgari Q., Ranjbar M. J., Khabisi S. A. 2016:** Protozoan Parasites of Rodents and Their Zoonotic Significance in Boyer-Ahmad District, Southwestern Iran. *Veterinary Medicine Internationa* 15: 21–27.
- Shahbazi P., Aligolzadeh A., Khordadmehr M., Farhang H. H., Katirae F. 2020:** Molecular study and genotyping of *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium parvum* from free-range and commercial broiler chickens in Guilan province, Iran. *Microbiology and Infectious Diseases* 69: 101411.
- Singh B. B., Sharma R., Kumar H., Banga H. S., Aulakh R. S., Gill J. P., Sharma J. K. 2006:** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Veterinary Parasitology* 140: 162–165.
- Smith H. V., Nichols R. A. B. 2010:** *Cryptosporidium*: Detection in water and food. *Experimental Parasitology* 124: 61–79.
- Sparks H., Nair G., Castellanos-Gonzalez A., White A. C. 2015:** Treatment of *Cryptosporidium*: What We Know, Gaps, and the Way Forward. *Current Tropical Medicine Reports* 2: 181–187.
- Stenger B. L. S., Horčíčková M., Clark M. E., Kváč M., Čondlová S., Khan E., Widmer G., Xiao L., Gidding C. W., Pennil C., Stanko M., Sak B., McEvoy J. M. 2017:** *Cryptosporidium* infecting wild cricetid rodents from the subfamilies Arvicolinae and Neotominae. *Parasitology* 145: 326–334.
- 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.
- Sulaiman I. M., Lal A. A., Xiao L. H. 2002:** Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *Journal of Parasitology* 88: 388–394.
- Sulaiman I. M., Morgan U. M., Thompson R. C., Lal A. A., Xiao L. 2000:** Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2385–2391.
- Taghipour A., Olfatifar M., Foroutan M., Bahadory S., Malih N., Norouzi M. 2020:** Global prevalence of *Cryptosporidium* infection in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine* 182: 105–119.
- Tang Y., Li N., Song M., Roellig 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* 5: 256–261.
- 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.
- Torres J., Gracenea M., Gómez M. S., Arrizabalaga A., González-Moreno 2000:** The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Veterinary Parasitology* 92: 253–260.
- Trotz-Williams L. A., Jarvie B. D., Martin S. W., Leslie K. E., Peregrine A. S. 2005:** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Canadian Veterinary Journal* 46: 349–351.
- Tsiamis K., Gervasini E., Deriu I., D’Amico F., Nunes A. L., Addamo A.M. 2017:** Baseline Distribution of Invasive Alien Species of Union concern. (ed. Commission, E.), JRC Science for Policy Report, Luxembourg, pp. 96.
- Tyzzar 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.
- Tyzzar 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.
- 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.
- Tzanidakis N., Sotiraki S., Claerebout E., Ehsan A., Voutzourakis N., Kostopoulou D., Stijn C., Vercruyse J., Geurden T. 2014:** Occurrence and molecular characterization of

- Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats reared under dairy husbandry systems in Greece. *Parasite* 21: 45.
- Tzipori S., Smith M., Halpin C., Angus K. W., Sherwood D., Campbell I. 1983:** Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *Veterinary Record* 112: 116–120.
- Tzipori S., Smith M., Makin T., Halpin C. 1982:** Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from calf faeces. *Veterinary Parasitology* 11: 121–126.
- Umemiya R., Fukuda M., Fujisaki K., Matsui T. 2005:** Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice. *Journal of Parasitology* 91: 1034–1039.
- Valigurová A., Jirků M., Koudela B., Gelnar M., Modrý D., Šlapeta J. 2008:** *Cryptosporidia*: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *International Journal for parasitology* 38: 913–922.
- Vetterling J. M., Jervis H. R., Merrill T. G., Sprinz H. 1971:** *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *The Journal of Protozoology* 18: 243–247.
- Wang R., Li G., Cui B., Huang J., Cui Z., Zhang S., Dong H., Yue D., Zhang L., Ning C., Wang M. 2014:** Prevalence, molecular characterization and zoonotic potential of *Cryptosporidium* spp. in goats in Henan and Chongqing, China. *Experimental Parasitology* 142: 11–16.
- Wang R., Li J., Chen Y., Zhang L., Xiao L. 2018:** Widespread occurrence of *Cryptosporidium* infections in patients with HIV/AIDS: Epidemiology, clinical feature, diagnosis, and therapy. *Acta Tropica* 187: 257–263.
- Wei Z., Liu Q., Zhao W., Jiang X., Zhang Y., Zhao A., Jing B., Lu G., Qi M. 2019:** Prevalence and diversity of *Cryptosporidium* spp. in bamboo rats (*Rhizomys sinensis*) in South Central China. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 9: 312–316.
- 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.

- Xiao L., Alderisio K., Limor J., Royer M., Lal A. A. 2000:** Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5492–5498.
- Xiao L., Fayer R. 2008:** Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology* 38: 1239–1255.
- Xiao L., Ryan U. M. 2004:** Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17: 483–490.
- Zahedi A., Durmic Z., Gofton A. W., Kueh S., Austen J., Lawson M., Callahan L., Jardine J., Ryan U. 2017:** *Cryptosporidium homai* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidii) from the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Veterinary Parasitology* 245: 92–101.
- Zanzani S. A., Di Cerbo A., Gazzonis A. L., Epis S., Invernizzi A., Tagliabue S., Manfredi M. T. 2016:** Parasitic and Bacterial Infections of *Myocastor coypus* in a Metropolitan Area of Northwestern Italy. *Journal of Wildlife Diseases* 52: 126–130.
- Zhang Q., Li J., Li Z., Xu CH., Hou M., Qi M. 2020:** Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in alpacas (*Vicugna pacos*) in China. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 12: 181–184.
- Zhang X. X., Cong W., Ma J. G., Lou Z. L., Zheng W. B., Zhao Q., Zhu X. Q. 2016:** First report of *Cryptosporidium canis* in farmed Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in China. *Parasites & Vectors* 9: 126.
- Zhou L., Fayer R., Trout J. M., Ryan U. M., Schaefer F. W. 3rd, Xiao L. 2004:** Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7574–7577.
- Ziegler P. E., Wade S. E., Schaaf S. L., Stern D. A., Nadareski C. 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.
- Zintl A., Neville D., Maguire D., Fanning S., Mulcahy G., Smith H. V., De Waal T. 2007:** Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. *Parasitology* 134: 1575–1582.

<https://invaznidruhy.nature.cz/res/archive/318/039183.pdf?seek=1473326128>

