

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH**

FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

**Kryptosporidie a kryptosporidióza stromových a
zemních veverek**

Cryptosporidium and cryptosporidiosis of tree and
ground squirrels

Disertační práce

MVDr. Jitka Prediger

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

České Budějovice 2022

Disertační práce

Prediger, J. 2022: Kryptosporidie a kryptosporidióza stromových a zemních veverek [*Cryptosporidium and cryptosporidiosis of tree and ground squirrels*]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská a technologická, 121 s.

Prohlášení

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě disertační práci zpracovanou na závěr doktorského studia na Fakultě zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Prohlašuji tímto, že jsem práci vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a dostupných zdrojů uvedených v seznamu, jenž je součástí této práce. Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Fakultou zemědělskou a technologickou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné sekci databáze STAG, provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlášení o vědeckém příspěvku výsledků práce

Tato disertační práce je založena na výsledcích vědeckých publikací, které vznikly za účasti dalších spoluautorů. Na tomto místě prohlašuji, že jsem v rámci studia kryptosporidií a kryptosporidiózy stromových a zemních veverek provedla většinu původního výzkumu a tato práce je založena na vědeckých výsledcích, jichž jsem hlavní autorkou nebo jsem se na výzkumu podílela významnou měrou.

V Českých Budějovicích dne 25.07.2022

.....
MVDr. Jitka Prediger

Seznam impaktovaných publikací

Disertační práce vychází z těchto publikací:

- **Prediger J.**, Ježková J., Holubová N., Sak B., Konečný R., Rost M., McEvoy J., Rajský D., Kváč M. 2021: *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Microorganisms* 9: 2050.
- **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.
- Stenger B.L.S., Clark M.E., Kváč M., Khan E., Giddings C.W., **Prediger J.**, McEvoy J.M. 2015: North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes. *Infection, Genetics and Evolution* 36: 287–293.

Prohlášení spoluautorů

Všichni níže uvedení spoluautoři prohlásili, že MVDr. Jitka Prediger se podstatným způsobem podílela na přípravě a publikování rukopisu Stenger et al. 2015. Souhlas jednotlivých spoluautorů byl elektronicky zaslán školiteli doktorandky prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., a byl ověřen předsedou OR DSP Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat Zemědělské a technologické fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích prof. Ing. Janem Trávníčkem, CSc.

prof. Mark Clark, Ph.D.

Catherine Giddings

prof. John McEvoy, Ph.D.

prof. Eakalak Khan, Ph.D., P.E.

prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Brianna L.S. Stenger, Ph.D.

V zastoupení všech spoluautorů:

prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

.....

školitel

Ověřil:

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

.....

předseda OR DSP

V Českých Budějovicích dne 17.06.2022

Další impaktované publikace, na kterých jsem spolupracovala a které se přímo netýkají tématu disertační práce (nejsou součástí práce):

- Ježková 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: 84–97.
- Kváč M., Hořická A., Sak B., **Prediger J.**, Salát J., Širmarová J., Bartonička T., Clark M., Chelladurai J.R., Gillam E., McEvoy J. 2015: Novel *Cryptosporidium* bat genotypes III and IV in bats from the USA and Czech Republic. *Parasitology Research* 114: 3917–3921.
- Ježková J., Limpouchová Z., **Prediger J.**, Holubová N., Sak B., Konečný R., Květoňová D., Hlásková L., Rost M., McEvoy J., Rajský D., Feng Y., Kváč M. 2021: *Cryptosporidium myocastoris* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae), the species adapted to the nutria (*Myocastor coypus*). *Microorganisms* 9: 813.

Seznam příspěvků na konferencích

- **Prediger J.**, Ježková J., Kváč M. 2021: Diversity and biology of *Cryptosporidium* spp. in ground and tree squirrels. Celouniverzitní konference doktorandů, JČU, 3. – 4. 11. 2021 (přednáška).
- Havrdová N., Kváč M., **Prediger J.** 2017: Laparotomy infections hosts intestinal and gastric *Cryptosporidium*. 47th Jírovec's Protozoological Days, Nové Hradky, Česká republika, 24. – 28. 4. 2017 (poster).
- Horčíčková M., Ježková J., **Prediger J.**, Sak B., Kváč M. 2017: Diversity of *Cryptosporidium* of wild rodents of genus *Rattus*. 47th Jírovec's Protozoological Days, Nové Hradky, Česká republika, 24. – 28. 4. 2017 (poster).
- **Prediger J.**, Horčíčková M., Hofmannová L., Sak B., Ferrari N., Mazzamutoe M.V., Romeo C., Wauterse L.A., McEvoy J., Kváč M. 2017: Native and introduced squirrels in Italy host different *Cryptosporidium* spp. International Workshops on Opportunistic Protists. August 10–12, 2017, Cincinnati, Ohio, USA (poster).
- Horčíčková M., Ježková J., **Prediger J.**, Sak B., Kváč M. 2017: *Cryptosporidium* spp. in wild rodents of genus *Rattus*. International Workshops on Opportunistic Protists. August 10–12, 2017, Cincinnati, Ohio, USA (poster).
- Havrdová N., Kváč M., **Prediger J.** 2017: *Cryptosporidium* oocysts do not require activation in stomach for successful intestinal infection. International Workshops on Opportunistic Protists. August 10–12, 2017, Cincinnati, Ohio, USA (poster).
- **Prediger J.**, Ježková J., Sak B., Kváč M. 2016: Diverzita kryptosporidií volně žijících hlodavců rodu *Rattus* v České republice a na Novém Zélandu. XII. české a slovenské parazitologické dny, Ledec nad Sázavou, 16. – 20. 5. 2016 (poster).
- **Prediger J.**, Sak B., Prediger P., Kváč M. 2015: Diversity of *Cryptosporidium* of wild rodents of genus *Rattus* in the Czech Republic, Slovakia and Kenya. 45th Jírovec's Protozoological Days, Dubovice, 11. – 15. 5. 2015 (přednáška).

- **Prediger J.**, Sak B., Prediger P., Kváč M. 2014: Diversity of *Cryptosporidium* of wild rodents of genus *Rattus* in central Europe and Kenya. 13th International Workshop on Opportunistic Protists, November 13–15, 2014, Sevilla, Spain (poster).

Práce vznikla za podpory následujících grantů

- **GAJU 072/2017/Z** – Diverzita a koevoluce kryptosporidií parazitujících u hlodavců rodu *Rattus*. (2017; řešitelka: Ing. Michaela Horčíčková, **spoluřešitelka: MVDr. Jitka Prediger**)
- **GAJU 011/2013/Z** – Zdraví hospodářských zvířat a zdravotní bezpečnost potravin – genetické, parazitární a nutriční aspekty. (2013–2015; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.). – **členka týmu**
- **GAČR 15-01090S** – Rozkrývání rozmanitosti kryptosporidií: propojení studia genetické variability a biologie parazitů (2015–2017; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.). – **členka týmu**
- **MSMT LTAUSA17165** – Diverzita a koevoluce kryptosporidií hlodavců: propojení studia genetické variability a biologie parazitů (2017–2020; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.). – **členka týmu**
- **GAJU 028/2019/Z** – Genetika, zdraví zvířat a biologicky a senzoricky aktivní látky jako základní předpoklad kvalitních potravin a zemědělských surovin (2019–2021; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.). – **členka týmu**

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat panu prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za odborné vedení v průběhu celého studia, za cenné rady a zkušenosti, za čas, který mi věnoval, za podporu a trpělivost, se kterou ke mně přistupoval, a v neposlední řadě za zprostředkování stáží, které pro mě byly inspirací a motorem v mém studiu.

Mé poděkování patří také všem kolegům a spolupracovníkům z Laboratoře veterinární a medicínské protistologie za poskytnutí zázemí a za vytvoření přátelského a příjemného pracovního prostředí. Jmenovitě bych chtěla poděkovat RNDr. Daně Květoňové, Ing. Lence Hláskové a RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D.

Dále děkuji všem spoluautorům publikací, na které se tato práce odkazuje, moc si vážím jejich spolupráce. Nemohu opomenout všechny, kdo se podíleli na získávání vzorků.

Na závěr patří díky mojí rodině, za toleranci a odbornou pomoc při studiu, zejména manželovi MVDr. Pavlu Predigerovi.

Rozvržení, formátování a styl práce

V souladu s bodem 9.2 Opatření děkana Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích k zajištění studia v doktorském studijním programu č. 7 z 2. listopadu 2017 je tato disertační práce zpracována formou souboru publikací studenta již uveřejněných nebo k uveřejnění přijatých a opatřených komentářem.

Předložená disertační práce zahrnuje výsledky týkající se kryptosporidií a kryptosporidiózy zemních a stromových veverek, které byly získány na základě mezioborového přístupu k řešené problematice spojujícího metody molekulární biologie, parazitologie, zoologie, histologie a práce se zvířaty a byly publikovány ve třech vědeckých publikacích v impaktovaných časopisech.

Anotace

Kryptosporidie jsou jednobuněční, jedno-hostitelští paraziti (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infikující primárně gastrointestinální, respirační a urogenitální trakt řady obratlovců včetně člověka. Infekce, kryptosporidióza, způsobená zástupci rodu *Cryptosporidium*, je často spojována s průjmovým onemocněním různého stupně závažnosti. Některé druhy, *C. parvum* a *C. hominis*, celosvětově způsobují kryptosporidiózu milionů osob a představují významné ohrožení života pro děti do pěti let věku, u kterých jsou zejména v rozvojových zemích jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Ekonomické ztráty způsobené *C. parvum* jsou často popisovány u mláďat hospodářsky významných přežvýkavců, zatímco úmrtnost u volně žijících zvířat je málo studována. Výsledky vědeckých prací v posledních deseti letech ukázaly, mnohem větší diverzitu kryptosporidií, než bylo předpokládáno. V současné době známe 49 platných druhů a velké množství genotypů kryptosporidií, jejichž počet již přesáhl hodnotu 100. Většina těchto druhů a genotypů, které s největší pravděpodobností představují samostatné druhy, pochází z volně žijících zvířat. O biologii těchto druhů toho víme dosud jen velmi málo.

Veverky často sdílí životní prostor s lidmi, a představují významný rezervoár zoonotických patogenů, včetně kryptosporidií. Tato disertační práce přináší nové poznatky o výskytu, diverzitě a biologii kryptosporidií parazitujících u stromových a zemních veverek.

Annotation

Cryptosporidia are unicellular, single-host parasites (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) that primarily infect the gastrointestinal, respiratory, and urogenital tracts of various vertebrates, including humans. Infection caused by members of the genus *Cryptosporidium*, cryptosporidiosis, is often associated with diarrheal disease of varying severity. Several species, *C. parvum* and *C. hominis*, cause cryptosporidiosis in millions of people worldwide and pose a significant threat to the lives of children under five years of age, in whom it is a leading cause of death, especially in developing countries. Economic losses due to *C. parvum* are frequently described in young animals of economically important ruminants, while mortality in wild animals has hardly been studied. The results of scientific work in the last decade have shown that the diversity of *Cryptosporidium* is much greater than previously thought. Currently, 49 valid species and many genotypes of *Cryptosporidium* spp. are known, exceeding 100. Most of these species and genotypes, which are most likely distinct species, are derived from wild animals. Very little is known about the biology of these species.

Squirrels often share their habitat with humans and are an important reservoir of zoonotic pathogens, including *Cryptosporidium* spp. This Ph.D. thesis provides new insights into the occurrence, diversity, and biology of *Cryptosporidium* spp. parasitizing tree and ground squirrels.

Souhrn

Předkládaná disertační práce se zabývá kryptosporidiiemi a kryptosporidiónou u stromových a zemních veverek. Vzorky trusu byly odebírány v USA, Itálii, v České republice a na Slovensku. Celkem bylo vyšetřeno 925 vzorků z osmi druhů veverek. Vzorky byly vyšetřeny jak mikroskopickými, tak molekulárními metodami. Specifická DNA kryptosporidií byla detekována pomocí multilokusové genotypizace na genech kódujících malou podjednotku rRNA (SSU), aktin, heat shock protein (*HSP70*), thrombospondin-related adhesive protein (*TRAP-C1*), *Cryptosporidium* oocyst wall protein (*COWP*) a 60 kDa glykoprotein (*gp60*). Přítomnost kryptosporidií byla potvrzena u 182 jedinců. Následné fylogenetické analýzy prokázaly přítomnost tří druhů a šesti genotypů kryptosporidií.

Výsledky studie severoamerických stromových a zemních veverek s překrývajícími se habitaty prokázaly, že tyto veverky jsou hostiteli různých druhů a genotypů kryptosporidií. Zatímco zemní veverky (sysel páskovaný (*Ictidomys tridecemlineatus*), sysel prériový (*Cynomys ludovicanus*) a sysel zlatavý (*Callospermophilus lateralis*)) jsou parazitováni hostitelsky specifickým druhem *C. rubeyi* a *Cryptosporidium* sp. ground squirrel genotyp I, II a III, u stromových veverek (veverka popelavá (*Sciurus carolinensis*), veverka liščí (*Sciurus niger*) a čikarí červený (*Tamiasciurus hudsonicus*)) byla detekována infekce způsobená *Cryptosporidium* sp. deer mouse genotyp III, *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp a *C. ubiquitum*. Dvě posledně jmenované kryptosporidie byly společně s jejich hostiteli – veverkami popelavými s velkou pravděpodobností introdukovány do Evropy, což naznačuje naše studie prováděná v Itálii. Zatímco na území Itálie byly původní veverky obecné (*Sciurus vulgaris*) parazitovány výhradně *Cryptosporidium* sp. ferret genotypem, který se u tohoto druhu běžně vyskytuje, u introdukovaných veverek popelavých byla prokázána infekce *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp a *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I. Výsledky navazujících studií v České republice a na Slovensku ukázaly, že původní veverka obecná je výhradně parazitována *Cryptosporidium* sp. ferret genotypem a kryptosporidie specifické pro veverky popelavé se do střední Evropy nerozšířily.

Cryptosporidium sp. ferret genotyp byl s ohledem na jeho časté rozšíření v populaci původních veverek obecných podrobněji studován. Molekulární

multilokusová genotypizace prokázala, že *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp se geneticky liší od ostatních druhů rodu *Cryptosporidium*. Podrobné studium biologických charakteristik ukázalo, že oocysty *Cryptosporidium* sp. ferret genotypu nejsou infekční pro laboratorní myši (*Mus musculus*), pískomily mongolské (*Meriones unguiculatus*), mastomyši (*Mastomys coucha*), kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*) nebo andulky vlnkované (*Melopsittacus undulatus*). Oocysty *Cryptosporidium* sp. ferret genotypu v průměru měří $5,54 \times 5,22 \mu\text{m}$, jsou bezbarvé, sférické. Standardní barvicí metody a specifické protilátky barví a značí oocysty *Cryptosporidium* sp. ferret genotypu jako ostatní druhy a genotypy kryptosporidií. Intenzita infekce u volně žijících veverek se liší podle věku, přičemž největší intenzita infekce byla zjištěna u juvenilních jedinců. Na základě našich výsledků byl *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp popsán jako nový samostatný druh *Cryptosporidium sciurinum*.

Summary

This PhD thesis deals with *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in tree and ground squirrels. Faecal samples were collected in the United States, Italy, the Czech Republic, and Slovakia. A total of 925 samples from eight squirrel species were examined. Samples were analyzed by both microscopic and molecular methods. *Cryptosporidium*-specific DNA was detected by multilocus genotyping at genes encoding small subunit rRNA (SSU), actin, heat shock protein (HSP70), thrombospondin-related adhesive protein (TRAP-C1), *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP), and 60 kDa glycoprotein (gp60). The presence of *Cryptosporidium* was confirmed in 182 individuals. Subsequent phylogenetic analyses revealed the presence of three species and six genotypes of *Cryptosporidium*. Results from a study of North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping habitats showed that these squirrels harboured different species and genotypes of *Cryptosporidium*. While ground squirrels (Thirteen-lined ground squirrel (*Ictidomys tridecemlineatus*), prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*), and Golden-mantled ground squirrel (*Callospermophilus lateralis*)) are parasitized by host-specific species of *C. rubeyi* and *Cryptosporidium* sp. ground squirrel genotype I, II and III, infections by *Cryptosporidium* sp. deer mouse genotype III, *Cryptosporidium* sp. skunk genotype and *C. ubiquitum* have been detected in tree squirrels (Eastern gray squirrel (*Sciurus carolinensis*), fox squirrel (*Sciurus niger*) and American red squirrel (*Tamiasciurus hudsonicus*)). The latter two *Cryptosporidium* spp. were confirmed by our study in Italy and were most likely introduced into Europe with Eastern gray squirrels. While in Italy native Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) were parasitized exclusively by the *Cryptosporidium* sp. ferret genotype, which is common in this species, the introduced Eastern gray squirrels were found to be infected with *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* sp. skunk genotype, and *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotype I. Results of follow-up studies in the Czech Republic and Slovakia have shown that the native Eurasian red squirrels are exclusively parasitized by *Cryptosporidium* sp. ferret genotype and *Cryptosporidium* spp, specific for Eastern gray squirrels have not spread to Central Europe.

The *Cryptosporidium* sp. ferret genotype was studied in more detail given its frequent distribution in the native squirrel population. Multilocus molecular genotyping revealed that the *Cryptosporidium* sp. ferret genotype is genetically distinct from other species of the genus *Cryptosporidium*. A detailed examination of the biological characteristics showed that oocysts of the *Cryptosporidium* sp. ferret genotype are not infectious to laboratory mice (*Mus musculus*), Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*), mastomys (*Mastomys coucha*), domestic chickens (*Gallus gallus* f. *domestica*), or budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Cryptosporidium* sp. ferret genotype oocysts measure $5.54 \times 5.22 \mu\text{m}$ in diameter, are colourless, and spherical. Standard staining methods and specific antibodies staining label oocysts of the *Cryptosporidium* sp. ferret genotype like other species and genotypes of the genus *Cryptosporidium*. The intensity of infection in wild squirrels varies with age, with the greatest intensity of infection found in young animals. Based on our results, the *Cryptosporidium* sp. ferret genotype was described as a new separate species, *Cryptosporidium sciurinum*.

OBSAH

1	ÚVOD	19
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	20
2.1	ČELEĎ VEVERKOVITÍ (SCIURIDAE)	20
2.2	ODLIŠNOSTI STROMOVÝCH A ZEMNÍCH VEVEREK.....	20
2.3	SOCIÁLNÍ CHOVÁNÍ VEVEREK.....	21
2.4	INTRODUKCE NEPŮVODNÍCH DRUHŮ VEVEREK DO EVROPY	21
2.4.1	<i>Veverka popelavá (Sciurus carolinensis)</i>	22
2.4.2	<i>Veverka Pallasova (Callosciurus erythraeus)</i>	24
2.4.3	<i>Veverka Finlaysonova (Callosciurus finlaysonii)</i>	25
2.4.4	<i>Burunduk páskovaný (Tamias sibiricus)</i>	26
2.4.5	<i>Veverka liščí (Sciurus niger)</i>	27
2.5	VEVERKY JAKO REZERVOÁR ZOONÓZ.....	28
2.5.1	<i>Dýmějový mor</i>	28
2.5.2	<i>Lymeská borelióza</i>	29
2.5.3	<i>Západonilská horečka</i>	30
2.5.4	<i>Klíšťová encefalitida</i>	31
2.5.5	<i>Ostatní zoonózy</i>	31
2.6	KRYPTOSPORIDIE A KRYPTOSPORIDIÓZA STROMOVÝCH A ZEMNÍCH VEVEREK	32
2.6.1	<i>Historie a současnost kryptosporidiózy</i>	32
2.6.2	<i>Vývojový cyklus kryptosporidií</i>	34
2.6.3	<i>Cesty přenosu kryptosporidií</i>	36
2.6.4	<i>Hostitelská specifita kryptosporidií</i>	36
2.6.5	<i>Symptomy a terapie kryptosporidiózy</i>	37
2.6.6	<i>Druhy a genotypy kryptosporidií stromových a zemních veverek</i>	39
3	CÍLE PRÁCE	44
4	HYPOTÉZY	45
5	KOMENTÁŘ K VÝSLEDKŮM.....	46
6	ZÁVĚRY	56
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
8	PŘÍLOHY	82

1 ÚVOD

Kryptosporidióza je závažné parazitární onemocnění postihující široké spektrum hostitelů od nejnižších obratlovců až po člověka. Tuto chorobu způsobují jednobuněční zástupci kmene Apicomplexa patřící do rodu *Cryptosporidium*.

Oocysty kryptosporidií jsou velmi rezistentní, v chladném a vlhkém prostředí zůstávají velice dlouho infekční. Přenášeny jsou fekálně–orální cestou (Smith et al. 1998, Fayer et al. 2000). Kryptosporidie jsou odolné vůči chloraci i ostatním dezinfekčním prostředkům používaným v úpravě pitné vody, v důsledku čehož jsou častou příčinou epidemií přenášených vodou (Xiao et al. 2000, Hassan et al. 2021). K nejrozsáhlejší nákaze došlo v roce 1993 v Milwaukee v USA, kde bylo vodou kontaminovanou *C. hominis* infikováno více než 400 tisíc lidí (Mackenzie et al. 1994), nicméně případy zoonotických a interhumánních infekcí nejsou výjimečné. Přestože primárním zdrojem oocyst pro člověka zůstávají mláďata domácích přežvýkavců a lidé, jako hostitelé zoonotických kryptosporidií byla popsána i řada domestikovaných a volně žijících zvířat včetně hlodavců (O'donoghue 1995, Xiao et Feng 2008, Caccio et Putignani 2014, Luka et al. 2022)

V současné době není známa žádná efektivní léčba ani vakcína proti kryptosporidióze (Kotloff et al. 2012, Striepen 2013, Huang et al. 2022), tudíž nejdůležitější ochranou proti této nemoci zůstává prevence přenosu a pokud možno přesné určení rezervoárů této infekční choroby (Xiao et al. 2002, Appelbee et al. 2005b).

Zatímco lidské kryptosporidióze a kryptosporidiovým infekcím hospodářských zvířat je věnována značná vědecká pozornost, ostatní druhy obratlovců jsou často opomíjeny. O diverzitě a biologii druhů a genotypů kryptosporidií řady volně žijících obratlovčích hostitelů víme jen málo nebo nic.

Jednou z dosud opomíjených skupin jsou zemní a stromové veverky, které často sdílí životní prostor s lidmi, a proto mohou představovat významný rezervoár zoonóz.

Cílem této disertační práce bylo rozšířit naše znalosti o kryptosporidiích specifických pro stromové a zemní veverky, se zaměřením na jejich výskyt a diverzitu a biologickou charakteristiku.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Čeled' veverkovití (Sciuridae)

Zástupci veverkovitých jsou rozšířeni po celém světě s výjimkou Austrálie, Madagaskaru, jižní části Jižní Ameriky a některých suchých oblastí (Egypt a Arabský poloostrov). Čeled' veverkovití se dělí na 58 rodů přibližně s 270 druhy. Taxonomické rozdělení veverkovitých není jednotné. Někteří autoři uvádějí dvě podčeledi (Scurinae a Petauristinae) (Nowak 2018), jiní na pět podčeledí (Ratufinae, Sciurillinae, Sciurinae, Callosciurinae a Xerinae) (Zhang et al. 2016). Majoritními zástupci veverkovitých jsou veverky, sysli, psouni, svišti, čikarí a čipmankové (Thorington et al. 2012). V této práci se dále budeme zabývat stromovými a zemními veverkami řazených do podčeledi Scurinae.

2.2 Odlišnosti stromových a zemních veverek

Zemní a stromové veverky mají mnoho společného, ale i mnoho odlišností. Jednou z hlavních odlišností je hnízdění. Stromové veverky nacházejí útočiště v dutinách stromů, častěji si však splétají hnízda z rostlinného materiálu, větviček, natrhané kůry apod. Na rozdíl od hnízd ptačích jsou veverčí hnízda tvaru duté koule, zcela kompaktní a neprůhledná. Jedna veverka vždy disponuje několika hnízdy, která mění dle potřeby. Oproti tomu zemní veverky si budují spleť nory, které slouží jako úkryt, kde spí a vychovávají mláďata a hibernují (Owings et al. 1977, Atwill et al. 2001, Thorington et al. 2012).

Další odlišnost mezi stromovými a zemními veverkami je hibernace. Stromové veverky nehibernují, i když v zimě denně prospí v hníždě až 20 hodin (Hamalainen et al. 2018). S tím také souvisí hromadění potravy před zimou. Zemní veverky přijímají co nejvíce potravy kvůli podkožnímu tuku, zatímco stromové si to vzhledem ke svému způsobu života v korunách stromů nemohou dovolit. Instinktivně tuší, že v zimě bude málo potravy a skladují si zásoby na zimu v tzv. spižárnách pod kořeny stromů. Kombinací mezi těmito dvěma typy veverek je např. čipmank východní (*Tamias striatus*), který sice jako zemní veverka hibernuje v noře, ale vytváří si v ní také speciální patro se spižárnou. Nehibernuje tak hluboce, jako ostatní druhy zemních veverek, několikrát se v zimě vzbudí a přijímá nashromážděné zásoby (Owings et al. 1977, Thorington et al. 2012, Lazerte et Kramer 2016).

Veverky zemní většinou po stromech také lezou, ale na rozdíl od stromových veverek mezi nimi nepřeskakují a nejsou tak obratné (Thorington et al. 2012).

2.3 Sociální chování veverek

Stromové veverky jsou v přírodě silně teritoriální a nesnesou na svém území, které může být velké až několik desítek hektarů, jiného jedince. Výjimkou je páření, které se odehrává pouze pár dnů v roce a období, kdy matka vychovává své potomky – do 3 měsíců stáří. Potom je vypudí ze svého teritoria. Obvykle má dva vrhy za rok a v přírodě se dožívá zhruba 3–5 let. Samci a samice mají ke svému teritoriu odlišný přístup. Zatímco samice zůstává na jednom území třeba celý život, samec od zimy do léta migruje za samicemi i desítky kilometrů. Výjimkou jsou pouze tzv. městské veverky, které díky snadné dostupnosti potravy svou teritorialitu ztratily a žijí v parcích ve větších skupinách (Thorington et al. 2012, Siracusa et al. 2019).

Oproti tomu zemní veverky často tvoří kolonie a budují komplexy složitých chodeb spojující i více rodin. Často využívají výhody společného způsobu života, je to například varování před dravými ptáky. Obvykle žijí v norách zbudovaných předky celé generace. Od komplexu nor se nevzdalují příliš daleko, aby se v nich mohly ukrýt v případě nebezpečí (Thorington et al. 2012). K cizím jedincům se však také chovají teritoriálně (Waterman et Archibald 2019, Roth et al. 2022).

2.4 Introdukce nepůvodních druhů veverek do Evropy

Z uvedeného v předchozí kapitole vyplývá, že ani jeden typ veverek nevykazuje výrazné změny lokalit. Z pohledu epidemiologie představuje umělá introdukce nepůvodních druhů veverek na nová území riziko přenosu i jejich patogenů ze země původu, které mohou ohrozit místní populaci veverek (Yokoyama et al. 2003, Pisanu et al. 2008, Pisanu et al. 2009). Pokud se nepůvodní druhy dostanou do volné přírody, mohou být patogeny přeneseny na autochtonní druhy (Bordes et al. 2007).

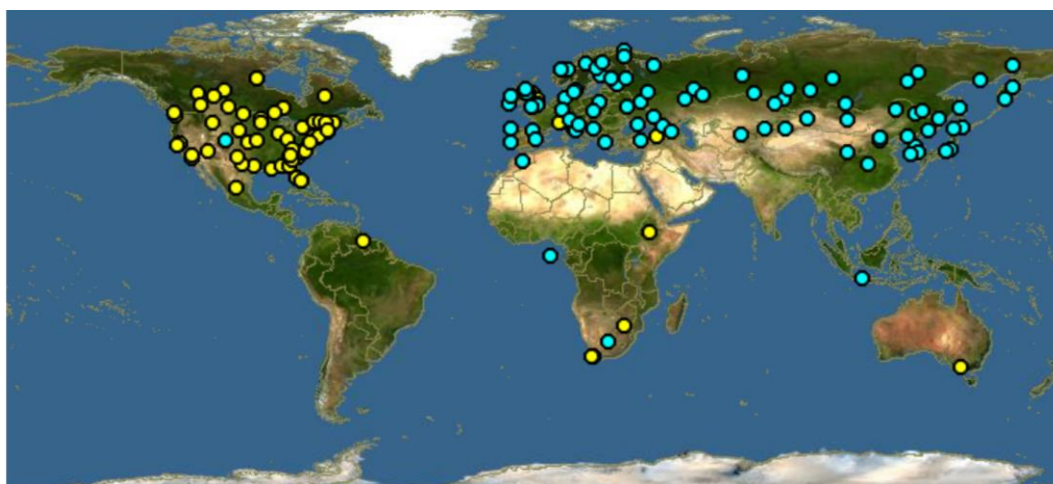
V Evropě v místech introdukce nepůvodních druhů veverek vznikají plány na jejich eradikaci, respektive omezení počtu, případně rozličná podpůrná opatření pro konkurenčně slabší, ale původní veverku obecnou. Od roku 2016 platí Nařízení Komise (EU) 2016/1141 pro prevenci zavlékání či vysazování nebo dalšího šíření na území Unie, podporu včasného zjištění a rychlou eradikaci invazivních druhů organismů. Do současné doby byla na území Evropy introdukována veverka

popelavá (*Sciurus carolinensis*), veverka liščí (*Sciurus niger*), veverka Pallasova (*Callosciurus erythraeus*), veverka Finlaysonova (*Callosciurus finlaysonii*) a burunduk páskovaný (*Tamias sibiricus*).

2.4.1 Veverka popelavá (*Sciurus carolinensis*)

Původním areálem výskytu veverky popelavé je Severní Amerika (Obrázek 1). Umělé vysazování této veverky do Evropy se datuje od roku 1876. Do Velké Británie byl tento druh dovezen ze Severní Ameriky v 31 případech mezi lety 1876–1929. Dnes je veverka popelavá přítomna na většině území Velké Británie (Bertolino 2008). V Irsku došlo roku 1913 k vysazení pouze šesti párů. Začátkem 21. století je zde veverka popelavá rozšířena na celém území (Teangana et al. 2000). V Itálii byly mezi lety 1948–1994 úspěšné tři z celkových čtyř introdukcí, při kterých bylo vypuštěno pouze kolem 4–6 jedinců. Nyní odborníci odhadují celkovou velikost italské populace už na několik tisíc jedinců (Bertolino et Genovesi 2003).

Obrázek 1. Rozšíření veverky popelavé (*Sciurus carolinensis*; žluté body) a veverky obecné (*Sciurus vulgaris*; modré body; zdroj: <https://www.discoverlife.org/>).



Veverka obecná (*Sciurus vulgaris*) a veverka popelavá (*Sciurus carolinensis*) mají obdobný habitat a stravu. Ačkoli se mezi těmito druhy neobjevuje žádná agresivita, je veverka popelavá v konkurenční výhodě. Důvodem je efektivnější trávení získané potravy i její větší příjem. Veverka popelavá tráví 80 % času na zemi, v listnatých lesích je tedy výrazně efektivnější ve shánění potravy a na podzim je schopna zvýšit svou hmotnost o 20 %. Oproti tomu veverka obecná tráví na zemi pouze 33 % času a

během podzimu zvýší svou hmotnost jen o asi 10 %. U veverky obecné se pak následkem snížené dostupnosti potravy, zvláště od prosince do dubna, objevuje vyšší mortalita mláďat i dospělých veverek, špatné prospívání potomků a omezení tělesného růstu. Při měření glukokortikoidů v krvi veverek obecných vystavených kompetici byla zjištěna až 3× vyšší hladina těchto stresových hormonů než u jedinců bez přítomnosti veverek popelavých (Santicchia et al. 2018). Rovněž při fragmentaci souvislých lesních porostů nemůže veverka obecná v důsledku narušení souvislosti korun stromů hledat nové teritorium, zatímco pro převážně po zemi se pohybující veverku popelavou to není problém. Veverka obecná tedy není schopna veverce popelavé konkurovat. V současnosti se tedy vyskytuje pouze v oblastech s jehličnatými porosty, ve kterých jí není schopna veverka popelavá tak výrazně ovlivnit. Na základě výše uvedených skutečností, dochází až k lokálním vyhynutím veverek obecných (Wauters et al. 2005).

Na Britských ostrovech je navíc veverka popelavá přenašečem parapoxviru. Sérologický průzkum ukázal, že 61 % z 223 zdravých veverek popelavých má protilátky proti parapoxvirům a pouze 3,2 % ze 140 veverek obecných bylo séropozitivních (Sainsbury et al. 2000). Všechny na parapoxvirus séropozitivní veverky obecné byly nalezeny mrtvé nebo umírající se symptomy způsobené parapoxvirem. Mezi ty patří otoky a léze, místy s hnisem, a posléze strupy na kůži, a to nejčastěji na tlamě, končetinách a genitáliích. Veverky obecné jsou letargické, nemají zájem o potravu a nápadný je úbytek na váze. Je znám pouze jeden případ klinických projevů nemoci u veverky popelavé (Duff et al. 1996). Vysoká seroprevalence protilátek a nízká incidence nemoci u veverek popelavých napovídá, že mohou být rezervoárem parapoxviru, kterým se následně nakazí veverky obecné (Thomas et al. 2003). V Itálii tento virus nebyl dosud detekován (Bertolino 2008).

Dalším možným negativně působícím faktorem na výskyt veverky obecné je výskyt helmintů (Romeo et al. 2014a, Romeo et al. 2014b) zavlečených do Evropy společně s veverkou popelavou. Navzdory nízké patogenitě, kvůli které lze infekci lehce přehlédnout, jsou helminti považováni za důležitý faktor regulace populační dynamiky. Seběmenší alterace může mít za následek obrovský vliv na hostitelskou populaci a na stabilitu ekosystému. Neuvážené podcenění makroparazitární populace v introdukovaném hostiteli může vést k nechtěným následkům na autochtonních druzích živočichů (Tompkins et Begon 1999). Například výskyt *Strongyloides*

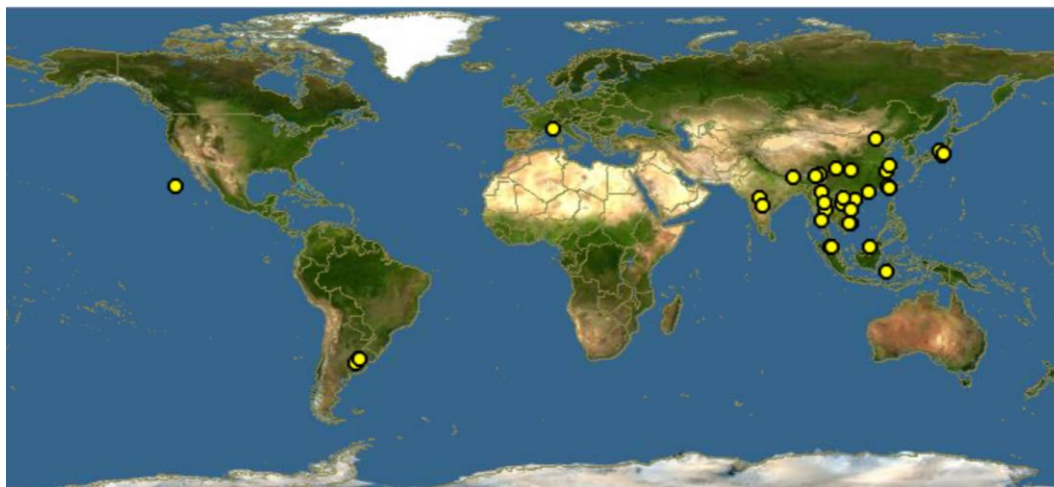
robustus, které se běžně vyskytuje u čeledi Sciurinae v Severní Americe (Davidson 1976, Krichbaum et al. 2010), byl poprvé zaznamenán u dvou přjetých veverek obecných, žijících v kontaktu s veverkami popelavými (Romeo et al. 2013). Žádné předchozí studie veverek obecných či ostatních savců nikdy tohoto parazita v palearktickém regionu neprokázaly. Z toho lze usuzovat, že byla tato hlístice do Evropy introdukována společně se severoamerickou veverkou popelavou, která představuje zdroj infekce pro veverky obecné (Romeo et al. 2015).

2.4.2 Veverka Pallasova (*Callosciurus erythraeus*)

Dalším zavlečeným druhem je veverka Pallasova, původně se vyskytující v jihovýchodní Asii (Obrázek 2). Do Evropy do Cap d'Antibes (Alpes Maritimes, Francie) byla introdukována na konci 60. a na začátku 70. let. Na přelomu tisíciletí byla introdukována do Belgie. Další známá populace je v Nizozemí a Itálii (Thorington et al. 2012). Původ těchto zvířat není znám, zrovna tak jejich počet v počáteční generaci. Je pravděpodobné, že jak v Belgickém, tak i Francouzském případě se jedná o jednotlivé případy úniku zvířat ze soukromých chovů (Dozieres et al. 2010).

Tato veverka má velmi široké spektrum potravních preferencí a dokáže se přizpůsobit téměř jakýmkoli podmínkám. Je běžně pozorována v listnatých i jehličnatých lesích až 3000 m n. m. Toto ji značně zvýhodňuje v porovnání s veverkou obecnou. Dosavadní výzkumy nenaznačují, že společně s veverkou Pallasovou byl introdukován některý z potenciálně nebezpečných patogenů (Sato et al. 2007, Masuda et al. 2021).

Obrázek 2. Rozšíření veverky Pallasovy (*Callosciurus erythraeus*; zdroj: <https://www.discoverlife.org/>).



2.4.3 Veverka Finlaysonova (*Callosciurus finlaysonii*)

V roce 1981 byla tato veverka introdukována z jihovýchodní Asie do Itálie, kde byla prostudována její ekologie (Obrázek 3). Veverka Finlaysonova je aktivní po většinu dne, velmi málo času tráví na zemi, většinou si hledá vegetariánskou potravu na stromech, nepohrdne však ani hmyzem, většinou mravenci (Bertolino 2009, Thorington et al. 2012). V Itálii je výskyt *C. finlaysonii* spojován s ekologickými a ekonomickými škodami způsobenými chováním veverek, které odkůrovávají stromy, aby se dostaly k míze stromů. Takto postižené stromy odumírají a snižuje se kvalita jeho dřeva (Bertolino et al. 2000). Přestože je introdukce nepůvodních druhů často spojována se zavlečením řady patogenů, do této chvíle nebyl detekován žádný patogen, kterým by ohrožovala evropskou populaci veverek (Khodakevich et al. 1986, Langkop et al. 2003, Romeo et al. 2014b).

Obrázek 3. Rozšíření veverky Finlaysonovy (*Callosciurus finlaysonii*; zdroj: <https://www.discoverlife.org/>).

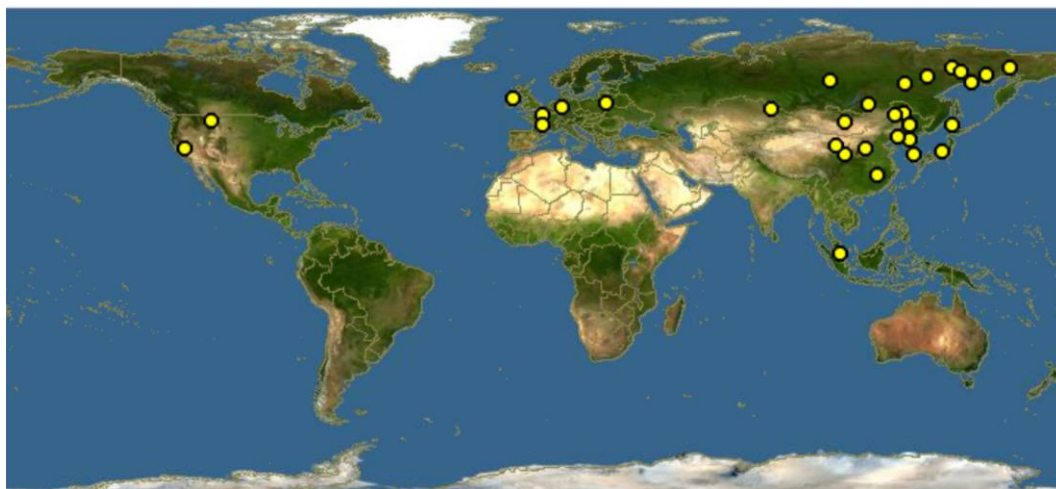


2.4.4 Burunduk páskovaný (*Tamias sibiricus*)

Burunduk páskovaný se běžně vyskytuje na území Ruska od severu Evropy po Kurilské ostrovy a na jihu toto teritorium zasahuje do Kazachstánu, Mongolska a Číny (Obrázek 4). Díky své atraktivitě se stal už v 60. letech 20. století nejprodávanější „pet“ veverkou, a proto také, díky únikům a vypuštěním na svobodu, vznikaly populace v Anglii, Francii, Belgii, Holandsku, Dánsku, Švýcarsku, Rakousku a Itálii (Lee et al. 2008, Thorington et al. 2012, Mori et al. 2018).

Tato primárně granivorní zemní veverka se živí převážně semeny jehličnatých stromů, ale častou složkou její potravy jsou mlži, vejce a vylíhlá ptáčata. Například mohou za 80–90% mortality budníčka temného (*Phylloscopus fuscatus*) a to má vliv na výběr míst k hnízdění těchto malých zpěvných ptáků. V některých částech Evropy (Itálie), kam byla introdukována, působí negativně na výskyt autochtonní veverky obecné (Bertolino et Genovesi 2003, Thorington et al. 2012). S přihlédnutím k omezené schopnosti šíření, kdy populace víceméně zůstávají na místech, kde byly vysazeny, nebo dokonce vymírají, a ke snížené schopnosti sbírat potravu v hustém podrostu, se zdá, že ostatní nepůvodní druhy veverek jsou pro veverku obecnou větším nebezpečím. Ale jako další invazní druh, byl burunduk páskovaný též zařazen do seznamu pro rychlou eradikaci (Zozzoli et al. 2018).

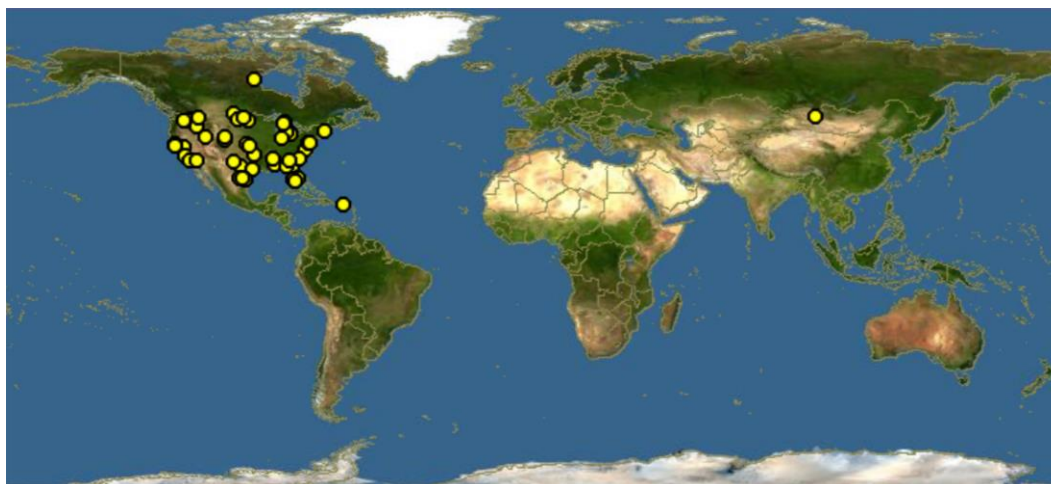
Obrázek 4. Rozšíření burunduka páskovaného (*Tamias sibiricus*; zdroj: <https://www.discoverlife.org/>).



2.4.5 Veverka liščí (*Sciurus niger*)

Veverka liščí je poměrně velká veverka pocházející ze Severní Ameriky (Obrázek 5). Až donedávna byla dovážena do Evropy za účelem obchodu s domácími zvířaty. Zatím není známá žádná volně žijící populace v Evropě (Baiwy et Schockert 2013), ale je možný její únik či vypuštění ze zajetí, dokonce byla v několika případech pozorována ve volném prostředí, přičemž předpokládaná rychlost jejího šíření by mohla být od 0,44 do 3,44 km za rok (King et al. 2010). Existuje tak velká pravděpodobnost, že se tento druh v budoucnu stane invazním, protože podmínky v mnoha evropských zemích jsou podobné jako v její původní domovině. Stejně jako jiné invazní veverky, by mohla vytlačit původní veverku obecnou a přenášet patogeny, na které jsou původní veverky odolné. Dovoz tohoto druhu byl již zakázán. Vzhledem k případné kompetici s autochtonními veverkami je též zařazena na seznamu invazivních druhů.

Obrázek 5. Rozšíření veverky liščí (*Sciurus niger*; zdroj: <https://www.discoverlife.org/>).



2.5 Veverky jako rezervoár zoonóz

Veverky jsou významným hostitelem řady zoonotických onemocnění. Jedná se o virové, bakteriální a parazitární nákazy, včetně kryptosporidií. O některých z nejzávažnějších nemocí postihujících člověka, kde se může veverka vyskytovat jako rezervoár těchto chorob, je pojednáno níže.

2.5.1 Dýmějový mor

Dýmějový (bubonický) mor je způsoben pleomorfní nepohyblivou bakterií *Yersinia pestis*, která je přenášena blechami - např. blechou obecnou (*Pulex irritans*) a blechou morovou (*Xenopsylla cheopis*), nebo vešmi (*Linognathoides cynomyis*), které se infikovaly na nakaženém hlodavci. Byl také zaznamenán případ přenosu kousnutím přímo z psouna gunnisenova (*Cynomys gunnisoni*) na člověka. Psouni jsou mnohem citlivější k moru než ostatní hlodavci, kde většinou infekce probíhá bezpříznakově. Periodicky se opakující epidemie zapříčiní celkový úbytek psounů o 90 až 100 % (Melman et al. 2018). Mor je také přenosný přímo z člověka na člověka, zejména kapénkovou infekcí při kašli při zápalu plic a má až 100% úmrtnost (De La Puerta et al. 2009).

Po proniknutí yersinií do rány je většina z nich destruována neutrofily a fagocytována. Některé ale nejsou zahubeny, pomnoží se a dostanou se do mizních uzlin, kde způsobí jejich zhnisání. V řádu hodin se bakterie rozšíří do jater, sleziny a plic, což vede k pneumonii. V oběhu krve bakterie způsobuje diseminovanou

intravaskulární koagulopatii, která má za následek trombózu a purpurické léze, odtud lidový název „černá smrt“.

Příznaky se projevují po 2–6 dnech, nastupuje horečka, bolesti hlavy, nezřídka zimnice a purulentní zduření lymfatických uzlin, které nakonec prohnisají skrz kůži. Tyto vředy se neuzavírají, symptomy se nadále zhoršují a gradují do celkové sepse organismu.

Při léčbě se používají antibiotika, např. doxycyklin, streptomycin nebo chloramfenikol. V místech výskytu je možné se preventivně očkovat. V Evropě už se mor téměř nevyskytuje, v Severní a Jižní Americe jsou zachyceny desítky případů ročně, stejně tak v Asii, v posledních letech jsou nejvýznamnější epidemie v centrální Africe a na Madagaskaru. Téměř vždy se jedná o bubonický mor v rurálních oblastech (Mwalimu et al. 2022, Rahelinirina et al. 2022, Tang et al. 2022).

2.5.2 Lymeská borelióza

Veverky (např. Burunduk páskovaný) jsou významným rezervoárem gramnegativní pohyblivé bakterie rodu *Borrelia* (Mori et al. 2018). Člověk se nakazí po napadení všech vývojových stádií klíštěte (v Evropě nejčastěji *Ixodes ricinus* a v Americe *Ixodes scapularis*).

Borelie se nacházejí ve střevě klíštěte, odkud se po přisátí přesunují do slinných žláz, ze kterých se při sání dostanou do nového hostitele. Další cesta nákazy je kůží, ať už poraněnou či nikoli, kdy neopatrnou manipulací s klíštětem dojde k vylití jeho tělesných tekutin. Zaznamenán je i transplacentární přenos (Krbková et al. 2007). Ve většině případů se bakterie pomnoží v kůži, odkud se dostane do řady dalších orgánů vč. centrální nervové soustavy. Buněčná stěna borelií navodí uvolnění interleukinu z bílých krvinek, což má za následek poškození tkání, a tudíž klinické příznaky. Ty se liší podle toho, které tkáně jsou napadeny. Nejběžněji se vyskytuje kožní forma, tzv. erythema migrans. Potom se také objevuje kardiální forma, kdy je postiženo srdce. Častá je též nervová forma, u které se nezřídka vyskytují meningitidy, a kloubní forma, kdy se onemocnění projevuje artritidou (Krbková et al. 2007).

Různé druhy borelií mají odlišnou lokalizaci. Zatímco *B. burgdorferii sensu stricto* způsobuje postižení především kloubního a nervového aparátu, *B. afzelii* se projevuje kožní formou a *B. garinii* způsobuje neurologické obtíže (Roy et al. 2017).

V Evropě se z patogenních borelií hojně vyskytují *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii*. Lymeská borelióza je zde poměrně častá, zvláště ve střední Evropě. V ČR je v posledních 10 letech hlášeno mezi 3000 a 4800 případů ročně (SZÚ 2021a). V Severní Americe se vyskytuje *Borrelia burgdorferi sensu stricto* – způsobující zejména postižení srdce a *B. mayonii*; nemoc je zde poměrně četná, zvláště na severovýchodě USA, kde zaznamenávají okolo 25000 případů ročně (CDC 2019). V poslední době se hovoří o změnách klimatu a s tím spojeným rozšířením klíšťat a jimi přenášených nemocí - mimo jiné i lymeské boreliózy (Voyiatzaki et al. 2022).

2.5.3 Západonilská horečka

Západonilská horečka je způsobována flavivirem označovaným jako západonilský virus. Přenašečem této nákazy je komár, nejčastěji rodu *Culex*, ale může být přenášena také při transplantaci, transfuzi, kojení a těhotenství. Rezervoárem jsou ptáci, savci jsou pouze náhodní hostitelé. Infekce je u lidí většinou asymptomatická, ve 20 % případů se objeví příznaky jako u chřipky a pouze u 1 % lidí nad 65 let a imunodeficitních osob se vyvine neuroinvazivní forma nemoci, které může být smrtelná (Padgett et al. 2007).

Původce západonilské horečky se podařilo izolovat v roce 1914. Do Spojených států byl dovezen virus až v roce 1999. Do dnešní doby bylo v USA zachyceno přes 25000 případů nákazy a přes 2300 úmrtí. Zatímco na územích původního výskytu nemoci (Egypt) má až 70 % obyvatelstva protilátky, například populace ve Spojených státech byla donedávna imunologicky naivní (Danforth et al. 2022). V Evropě je rostoucí incidence tohoto onemocnění a probíhá neustálý monitoring nákazy (Braks et al. 2022, Defilippo et al. 2022).

Role veverek v procesu přenosu je diskutabilní. Tato zvířata se sice můžou virem západonilské horečky nakazit, např. 10 % populace veverek popelavých v severní Itálii má protilátky na flaviviry (Romeo et al. 2018), ale experimentálně nakažené veverky popelavé měly asymptomatický průběh nemoci a pouze 2 % komárů se sáním na nich infikovalo (Gomez et al. 2008). Veverky jsou užitečné v monitoringu viru západonilské horečky a poskytují lokalizovaný důkaz o přenosu na další savce (Padgett et al. 2007).

2.5.4 Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida je onemocnění přenášené viry z čeledi Flaviridae, hlavní jsou subtypy viru klíšťové encefalitidy západního typu (Středoevropská klíšťová encefalitida, TBE) a viru klíšťové encefalitidy východního typu (ruská jaro–letní encefalitida, RSSE).

Hlavní hostitelé tohoto viru jsou hlodavci, včetně veverek. Člověk, jako náhodný hostitel se nakazí infestací infikovanými nymfami či dospělci klíštěte (transstadiální a transvariální přenos), vzácněji pitím mléka infikovaných koz a ovcí. Promořenost klíšťat v endemických oblastech je až 1 % (Kaiser 2008).

Větší část infekcí TBE probíhá bezpříznakově, ale lidé nad 60 let nebo děti jsou ohroženou skupinou. Charakteristické jsou dvě fáze onemocnění, první je podobná syndromům chřipky a trvá 1–8 dnů. Poté dojde ke zdánlivému uzdravení a po čtyřech až sedmi dnech přichází druhá fáze onemocnění, už spojená s nervovými příznaky (meningitidou, meningoencefalitidou) (Randolph 2008). V České republice se v roce 2020 vyskytovalo 854 případů, tj. 22 % z celé Evropy, již šestým rokem tak pokračuje vzrůstající tendence (SZÚ 2021b, Jenkins et al. 2022). Mortalita v Evropě dosahuje až 2 %. V případě RSSE má nemoc monofazický charakter, bez asymptomatického intervalu před nástupem neurologických příznaků. V těchto případech je výše mortality téměř 35 % (Randolph 2008).

2.5.5 Ostatní zoonózy

Z bakteriálních nákaz se jedná o skvrnitý tyfus, který způsobuje *Rickettsia prowazekii* a byla nalezena u létajících veverek (*Glaucomys volans*), listeriózu, způsobovanou *Listeria monocytogenes*. Dalšími bakteriemi nalezenými u veverek jsou například *Leptospira hebdomadis*, způsobující leptospirózu, *Francisella tularensis* původce tularémie a *Coxiella burnetti*, která zapříčiňuje Q horečku. Veverky také přenáší *Erysipelothrix rhusiopathiae*, která způsobuje červenku prasat. Z virů to jsou například hantaviry, alphaviry a Lyssavirus (Sambyal et Sharma 1972, Foley et al. 2007, Hamdan et al. 2017, Azar et al. 2020, Pisano et al. 2021). Ze zástupců protist je to např. *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* a *Cryptosporidium* spp. kterému jsou věnovány další kapitoly.

2.6 Kryptosporidie a kryptosporidióza stromových a zemních veverek

2.6.1 Historie a současnost kryptosporidiózy

Kryptosporidie jsou řazeny do kmene Apicomplexa a na základě morfologie oocyst a vývoji v hostiteli byly dříve nesprávně zařazeny mezi kokcidie (Fayer et al. 1997), nicméně podrobné studie založené na morfologii vývojových stádií a molekulárních analýzách (Carreno et al. 1999, Valigurová et al. 2007) prokázaly, že se kryptosporidie od kokcidií liší a byly přeřazeny z podtřídy Coccidia do podtřídy Cryptogregariny v rámci třídy Gregarinomorpha (Cavalier-Smith 2014).

V dnešní době je popsáno 49 platných druhů kryptosporidií, které byly rozlišeny na základě morfologických rozdílů, hostitelské specifity, či lokalizace vývojového cyklu a molekulárních rozdílů (Fayer 2007, Kváč et al. 2013a, Kváč et al. 2013b, Kváč et al. 2014b) a několik desítek genotypů.

První informace o výskytu kryptosporidií u veverek rodu *Sciurus* jsou z roku 1982, kdy byly nalezeny oocysty *C. parvum* ve vzorcích trusu veverky popelavé (Sundberg et al. 1982). O kryptosporidiích u zemních veverek se poprvé zmiňuje Atwill, který popisuje vylučování oocyst *C. parvum* u sysla veveřího (*Spermophilus beecheyi*) (Atwill et al. 2001). S ohledem na fakt, že první nálezy kryptosporidií u veverek byly popsány v době, kdy nebyly používány metody molekulární genotypizace, nelze nález *C. parvum* brát jako platný.

Chronologie popisu druhů a genotypů kryptosporidií stromových a zemních veverek

1982 *Cryptosporidium parvum*

Detekce oocyst kryptosporidií u veverky popelavé (Sundberg et al. 1982). Dle velikosti oocyst se s největší pravděpodobností jednalo o střevní druh kryptosporidie, který dle tehdejších zvyklostí byl popsán jako *C. parvum*. Dnes víme, že se mohlo jednat o jakoukoliv jinou střevní kryptosporidii specifickou pro veverky. Navíc druh *C. parvum* se u veverek často nevyskytuje.

2001 (2007) *Cryptosporidium parvum*

Atwill et al. (2001) zaznamenali *C. parvum* v trusu syslů veveřích v Kalifornii, USA, nicméně vzorky nebyly sekvenovány a mohlo se jednat o některou

kryptosporidii uvedenou v tomto chronologickém popisu nebo jakoukoliv jinou kryptosporidii. První molekulárně doložená infekce tímto druhem u veverek je popis z roku 2007, kde bylo *C. parvum* nalezeno ve vzorku trusu veverky popelavé (Feng et al. 2007).

2003 *Cryptosporidium muris*

Tato kryptosporidie byla poprvé zjištěna ve vzorcích trusu burunduka páskovaného (*Eutamias sibiricus*) chovaného v zajetí, dovezeného do ČR z jihovýchodní Asie (Hůrková et al. 2003).

2007 *Cryptosporidium ubiquitum*

Tento druh byl nalezen u dvou jedinců čipmanka východního (*Tamias striatus*), tří jedinců veverek popelavých a u jednoho jedince veverky obecné v New Yorku, USA (Feng et al. 2007).

2007 *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I

Tento genotyp byl poprvé nalezen v povrchové pitné vodě v New Yorku jako izolát W17 (Feng et al. 2007). Až později mu byl přiřazen název *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I podle zvířete, u kterého parazituje nejčastěji.

2007 *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp II

Tento genotyp poprvé detekován u jednoho čipmanka východního v New Yorku, USA (Feng et al. 2007).

2007 *Cryptosporidium* sp. deer mouse genotyp III

Poprvé byl tento genotyp popsán jako genotyp W1, enviromentální vzorek z vody a příčina infekce pěti veverek popelavých (Feng et al. 2007).

2007 *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp

Ziegler et al. (2007) detekovali *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp u veverek popelavých (v New Yorku). Nicméně tento genotyp byl původně popsán ze skunka pruhovaného (*Mephitis mephitis*) (Perz et Le Blancq 2001).

2009 *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp III

První popis tohoto genotypu u burunduka páskovaného v Číně (Lv et al. 2009).

2015 *Cryptosporidium rubeyi*

Druh dříve známý jako *Cryptosporidium* sp. genotyp "c" (např. Sbey03c, Sbey05c, Sbl05c, Sl05c) získaný ze tří druhů syslů rodu *Spermophilus* (sysel veveří, sysel Beldingův a sysel zlatavý) v Kalifornii, USA (Li et al. 2015).

2015 *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp IV

Tento genotyp byl detekován u jednoho jedince čipmanka východního v USA (Stenger et al. 2015b).

2015 *Cryptosporidium* sp. ground squirrel genotyp I, II a III,

Tyto genotypy byly poprvé detekovány u zemních veverek v USA (Stenger et al. 2015b).

2019 *Cryptosporidium wrairi*

Tento druh byl nalezen u jednoho jedince veverky Pallasovy (Chai et al. 2019).

2019 *Cryptosporidium* sp. rat genotyp II

Chai et al. (2019) popsali infekci touto kryptosporidií u dvou veverek Pallasových v Číně.

2021 *Cryptosporidium sciurinum*

Druh dříve známý jako *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp, který původně detekovali Xiao et al. (1999a) u tchoře černonohého (*Mustela nigripes*) a popsaný na základě biologických a molekulárních odlišností v rámci této práce (Prediger et al. 2021).

2.6.2 Vývojový cyklus kryptosporidií

V rámci rodu *Cryptosporidium* rozlišujeme dvě monofyletické linie kryptosporidií (Xiao et al. 2004). První linií jsou kryptosporidie, které se osidlují střevem a mají menší kulaté oocysty (u veverek jsou to *C. sciurinum* (dříve *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp I), *C. ubiquitum*, *C. parvum*, *C. rubeyi* a všechny genotypy uvedené v kapitole 2.6.1). Druhou, méně početnou, linií jsou druhy a genotypy, které parazitují v žaludku svých hostitelů a které mají oocysty větší a oválné (u veverek - *C. muris*).

Kompletní vývojový cyklus byl dosud popsán pouze jen u několika málo druhů kryptosporidií, konkrétně u *C. muris* (Tyzzer 1907, 1910), *C. parvum* (Tyzzer 1912), *C. baileyi* (Current et al. 1986), *C. proliferans* (Melicherová et al. 2014) a *C.*

ornithophilus (Holubová et al. 2020b). U ostatních kryptosporidií se předpokládá, že mají podobný vývoj s případnými menšími odchylkami.

Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní (Fayer et al. 1997, Thompson et al. 2005). K nakažení dochází fekálně–orální cestou, pozřením oocysty (Fayer et al. 1997, Fayer 2007), jejichž velikost se liší podle druhu, případně genotypu. Celý cyklus savčích kryptosporidií probíhá primárně v gastrointestinálním traktu hostitele (GIT) (Current et Blagburn 1990, Current 1990), zatímco u ptáků může probíhat i v dalších orgánech, nejčastěji v plicích a trachei (Nakamura et Meireles 2015, Holubová et al. 2020a). Oocysty v GIT hostitele excystují, proteolytické enzymy (serinové a cysteinové endopeptidázy, aminopeptidázy) degradují charakteristickou suturu na jednom pólu, kterou sporozoiti opouštějí oocystu. Uvolní se infekční stádia – sporozoiti, kteří adherují k hostitelským buňkám. Sporozoiti kryptosporidií mají jen jednu rhoptrii (Tetley et al. 1998, Petry et Harris 1999, Blackman et Bannister 2001, Huang et al. 2004, Petry 2004, O'hara et al. 2005). Sporozoiti se mění na trofozoity. Jádru trofozoita se dělí a dochází k asexuálnímu množení – merogonii. Vznikají dva typy merontů. Meront typu I vytváří 6–8 merozoitů, z nichž se po uvolnění mohou opět stát meronti typu I (asexuální množení) nebo vznikají meronti typu II, kteří vytváří 4 merozoity, které napadají buňky epitelu a vstupují do sexuální fáze – gametogonie (Hijjawi et al. 2010, Melicherová et al. 2014). Vznikají pohlavní stádia – jednojaderné makrogamonty a vícejaderné mikrogamonty. Z mikrogamontu se uvolňují pohyblivé mikrogamety, které oplodní makrogamety vzniklé z makrogamontů, splynutím vznikne zygota (Sunnotel et al. 2006, Hijjawi et al. 2010). Během endogenní sporulace vznikají ze zygoty dva typy oocyst. Silnostěnné oocysty obsahují 4 volně uložené sporozoity a poměrně velké reziduální tělísko. Opouštějí tělo hostitele s trusem/stolicí a na rozdíl od oocyst kokcií, jsou oocysty kryptosporidií již plně infekční. Slouží k přenosu choroby na další vnímavé hostitele. Množství vylučovaných oocyst závisí na druhu a genotypu kryptosporidie a druhu a věku hostitele a stavu jeho imunitního systému. Například u mláďat skotu infikovaných druhem *C. parvum* se intenzita infekce může pohybovat až ve výši 10^9 oocyst na gram trusu (OPG). Naopak u většiny volně žijících hostitelů se intenzita infekce často pohybuje okolo 10^2 až 10^4 OPG (Jokipii et Jokipii 1986, Chappell et al. 1996, Atwill et al. 2001, Čondlová et al. 2019, Ježková et al. 2021a). Tenkostěnné oocysty, kterých je například u druhu *C. parvum* asi 20 %, excystují ještě v těle

hostitele. Infekční stádia (sporozoiti) se aktivně uvolňují z oocyst a velmi rychle pronikají k zatím neinfikovaným mikroklkům střeva. Tento jev se nazývá autoinfekce (Current et Reese 1986).

2.6.3 Cesty přenosu kryptosporidií

Kryptosporidióza je klasifikována jako vodou přenášené onemocnění prostřednictvím kontaminované, zdravotně nezabezpečené vody (Jiang et al. 2005, Ryan et al. 2005, Pane et Putignani 2022). V případě pitné vody pro potřeby člověka a jím chovaná zvířata je nejčastěji používaná úprava vody filtrací a chemickou dezinfekcí, zejména chlorací, která je proti oocystám kryptosporidií málo účinná (Xiao et al. 2000, Hassan et al. 2021). *Cryptosporidium* spp. je nejvýznamnějším etiologickým agens nákaz z vody způsobených parazity (Hlavsa et al. 2018, Hlavsa et al. 2021). V poslední době se hovoří o výskytu kryptosporidií v mořské vodě a jejich adherenci k mikroplastům, což usnadňuje jejich vnikání do potravního řetězce (Reghaissia et al. 2022, Zhang et al. 2022).

Dalším způsobem přenosu je přenos kontaminovanou potravou, popřípadě přímým kontaktem infikovaného jedince s vnímavým hostitelem (Atwill et al. 2002, Da Silva et al. 2003, Fayer 2004, Blackburn et al. 2006). Nezřídka se vyskytují případy zoonotických infekcí a ani přenos mezi lidmi není výjimečný (O'donoghue 1995, Putignani et Menichella 2010). Zvláště ohrožení jsou lidé imunodeficitní nebo imunosuprimovaní (Ditrich et al. 1991, Dupont et al. 1995, Wolska-Kusnierz et al. 2007), mimo nich také děti a osoby přicházející pravidelně do styku se zvířaty (Sponseller et al. 2014)

Podle druhu kryptosporidie je možné rozlišit infekci na spíše rurální (např. *C. parvum*, *C. meleagridis*) nebo městskou (*C. hominis*) (Mohamed et al. 2022). U imunokompetentních jedinců je infekční dávka větší (ID_{50} *C. parvum* je 132 oocyst) (Dupont et al. 1995) než u imunitně oslabených jedinců, kdy i požití pouhých deseti oocyst může způsobit infekci a vyvolat onemocnění (Okhuysen et al. 1999).

2.6.4 Hostitelská specifita kryptosporidií

Hostitelská specifita je rozmezí druhů, které je parazit, v našem případě kryptosporidie, schopen využívat jako své hostitele. V laboratorních podmínkách je často studováno hostitelské spektrum prostřednictvím experimentálních infekcí. Pokud kryptosporidie dokončí svůj vývojový cyklus v hostiteli a začnou být

vyučovány infekční oocysty daného druhu nebo genotypu, který jim byl podán v infekční dávce, je hostitel považován za vnímavého k nákaze.

Podle hostitelské specifity rozdělujeme kryptosporidie na druhy a genotypy s vysokou hostitelskou specificitou (monoxenní), se schopností parazitovat několik fylogeneticky příbuzných druhů (stenoxenní) a se schopností cizopasit na více vzájemně nepříbuzných druzích (euryxenní). Skupina monoxenních kryptosporidií je málo početná, lze mezi ně řadit například *C. wrairi* parazitující u morčat nebo *C. parvum* subtyp IIc, který výhradně infikuje člověka (Vetterling et al. 1971a, Kváč et al. 2014a). Většina známých kryptosporidií je stenoxenních. Příkladem může být druh *C. rubeyi*, který byl nalezen u sysla veverčího, sysla Beldingova (*Spermophilus Beldingi*) nebo sysla zlatavého (Li et al. 2015). Do skupiny euryxenních kryptosporidií, zástupců s velmi nízkou hostitelskou specificitou, lze řadit druhy *C. parvum*, *C. baileyi* a *C. ubiquitum*. Druh *C. ubiquitum* často parazituje široký okruh volně žijících savců včetně veverek a syslů (kapitola 2.6.1). Nejčastěji je tato kryptosporidie detekována u přežvýkavců (muflon, jelen, jelenec, sika, antilopa, kozorožec, bizon nebo yak) a hlodavců (veverka, myš, bobr nebo dikobraz). Dále byla popsána u masožravců (mýval), poloopic (lemur) a lidí (Perz et Le Blancq 2001, Ong et al. 2002, Da Silva et al. 2003, Ryan et al. 2005, Feltus et al. 2006, Leoni et al. 2006, Soba et al. 2006, Trotz-Williams et al. 2006, Foo et al. 2007, Ziegler et al. 2007, Feltus et al. 2008, Kváč et al. 2008, Ng-Hublin et al. 2013, Stenger et al. 2015a, Stenger et al. 2015b).

2.6.5 Symptomy a terapie kryptosporidiózy

Imunitní systém potenciálního hostitele kryptosporidií má důležitou roli při vzniku a průběhu infekce. Mezi hlavní symptomy humánní kryptosporidiózy patří vodnatý průjem, často s hlenem, krev ve stolici je vzácně. Další klinické příznaky jsou nevolnost, křeče v epigastriu a mesogastriu a horečka (Jokipii et Jokipii 1986).

O kryptosporidióze u volně žijících zvířat toho víme velmi málo (Appelbee et al. 2005a). Většina dosud publikovaných prací založených na terénním sledování se klinickými projevy infekce nezabývá. Z několika málo studií provedených na veverkách vyplývá, že kryptosporidiové infekce veverek většinou probíhají inaparentně (Kváč et al. 2008, Stenger et al. 2015b, Prediger et al. 2017, Prediger et al. 2021).

Nitazoxanid je jediný v USA schválený lék na léčbu kryptosporidiózy u dospělých a dětí starších jednoho roku, ale není účinný pro léčbu HIV/AIDS pacientů, a to ani při zvýšených dávkách a prodloužené délce léčby (Rossignol 1998, Amadi et al. 2009). Tento lék poskytuje zlepšení u klinických i mikrobiologických ukazatelů nemoci a snižuje délku trvání i závažnost infekce u imunokompetentních pacientů. Děti, kterým byl poskytován nitazoxanid, měly průjmy kratší dobu než ty, kterým bylo poskytováno placebo (Ortiz et al. 2001). Paromomycin, další z používaných léků, je aminoglycosid, který také vykazuje antikryptosporidiovou aktivitu u imunokompetentních lidí, ale u HIV pacientů selhává (Cabada et White 2010). Studie, do které bylo zařazeno 11 pacientů s pokročilým AIDS a GIT kryptosporidiózou, prokázala signifikantní redukci vylučování oocyst a počtu stolic za použití paromomycinu v kombinaci azithromycinem (Smith et al. 1998). Vývoj nových léků, i hledání nových účinků u léků již vyvinutých, poskytuje naději na novou účinnou terapii kryptosporidiózy (Bessoiff et al. 2013, Guo et al. 2018, Chao et al. 2018). Například itavastatin (Bessoiff et al. 2013), atorvastatin (Taha et al. 2017), clofazimine (Zhang et al. 2017), KDU731 (Ward 2017, Chavez et White 2018), MMV665917 (Jumani et al. 2018, Stebbins et al. 2018, Love et Choy 2021), vorinostat (Guo et al. 2018) a (1-Benzyl-4-triazolyl)-indole-2-carboxamid (Khan et al. 2022) byly potvrzeny jako látky účinné proti kryptosporidiím *in vitro* a/nebo při experimentálních infekcích zvířat.

U hospodářských zvířat jsou používány veterinárně léčivé preparáty s účinnou látkou halofuginon (Trotz-Williams et al. 2011, Brainard et al. 2021). Užívají se nejen jako preventivní a kauzální léčba kryptosporidózy telat, ale i jako kokcidostatika u drůbeže a králíků (Fitzgerald et al. 2011, Dorne et al. 2013). Používání tohoto přípravku je spojeno se zkrácením patentní doby a intenzity infekce až o 50 %, přičemž rozhodující je doba podávání léčiva (Giadinis et al. 2007).

Vyjma aplikace léčiva je nezbytná i symptomatická terapie zahrnující rehydrataci, antidiaroeika, inhibitory střevní motility, například somatostatin (Ganong 2005).

2.6.6 Druhy a genotypy kryptosporidií stromových a zemních veverek

- **Druhy a genotypy hostitelsky specifické pro veverky**

Cryptosporidium rubeyi

Druh *C. rubeyi* byl popsán u zemních veverek v Kalifornii (USA) (Li et al. 2015). Vyjma výše uvedených hostitelů byl tento druh detekován u psounů prériových (*Cynomys ludovicianus*) a v syslu zlatavém v Montaně (USA) (Stenger et al. 2015b). Dosavadní výsledky publikovaných studií naznačují, že tento druh je hostitelsky úzce specifický. Průběh infekce, délka prepatentní a patentní periody nebo lokalizace v hostiteli je neznámá (Li et al. 2015). Velikost oocyst je 4,4–5,0 mm × 4,0–5,0 μm, jsou sférické či ovoidní a morfologicky podobné *C. parvum*. Při rutinním mikroskopickém vyšetření nelze oocysty tohoto druhu odlišit od oocyt další střevních druhů kryptosporidií. Všechny dostupné údaje naznačují, že infikovaní jedinci netrpí kryptosporidiózou a průběh infekce je inaparentní (Li et al. 2015).

Cryptosporidium sciurinum

Tento druh byl dříve znám jako *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp a na základě biologických a molekulárních odlišností od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií byl popsán v rámci této práce (Prediger et al. 2021). Přestože byl tento druh v roce 1999 v USA původně popsán z tchoře černonohého (*Mustela nigripes*) (Xiao et al. 1999a), nejčastěji je detekován u veverky obecné v Evropě a Asii (Kváč et al. 2008, Lv et al. 2009, Prediger et al. 2017, Prediger et al. 2021). Velikost oocyst je 5,5–5,2 μm (Prediger et al. 2021). Výsledky terénních sledování a laboratorních experimentů naznačují, že se jedná o druh s úzkou hostitelskou specifitou (viz. kapitola 5). U žádné z přirozeně infikovaných veverek se nevyskytly viditelné klinické symptomy kryptosporidiózy. Dosud nebyl prokázán zoonotický potenciál. Lokalizace v hostiteli je neznámá, i když na základě fylogenetických analýz předpokládáme, že se jedná o střevní druh.

Cryptosporidium sp. chipmunk genotyp I

Tento genotyp byl poprvé nalezen v povrchové pitné vodě USA jako izolát W17 (Feng et al. 2007). Výskyt *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I je vázaný na

typického hostitele, kterým jsou veverky popelavé a další severoamerické druhy veverek (Feng et al. 2007, Stenger et al. 2015b). V Evropě byla tato kryptosporidie poprvé nalezena u veverek popelavých a veverek Palasových v Itálii (Prediger et al. 2017). Kváč et al. (2008) popsal přirozenou infekci touto kryptosporidií u dvou veverek obecných odchycených v Itálii. Velikost oocyst byla v rozmezí 5,8 (5,3–6,6) × 5,4 (4,7–5,9) µm. S největší pravděpodobností byl *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I introdukován do Evropy spolu s veverkami popelavými. Infekce způsobená touto kryptosporidií byla zjištěna i u lidí, a to u HIV pozitivního pacienta ve Francii (Anofel 2010) a u imunokompetentních pacientů ze Švédska, kde poprvé zaznamenali vypuknutí hromadné nákazy tímto genotypem a také se poprvé prokázal zoonotický přenos mezi veverkou obecnou a člověkem. V tomto případě se ale u veverek obecných vyskytovaly příznaky kryptosporidiózy, jeden vzorek byl dokonce odebrán post mortem, a bylo konstatováno, že veverka uhynula v důsledku průjemového onemocnění a rozvráceného metabolismu (Lebbad et al. 2013, Bujila et al. 2021).

***Cryptosporidium* sp. skunk genotyp**

Cryptosporidium sp. skunk genotyp byl poprvé zaznamenán u skunka pruhovaného (Perz et Le Blancq 2001). Tento genotyp byl následně nalezen u řady jiných živočichů - mývala severního (*Procyon lotor*), vydry severoamerické (*Lontra canadensis*), vačice viržinské (*Didelphis virginiana*), rypouše sloního (*Virounga leonina*) a několika druhů veverek (Zhou et al. 2004, Feng et al. 2007, Rengifo-Herrera et al. 2011). Poprvé detekován byl u veverek popelavých v USA (Ziegler et al. 2007). Dále byly popsány infekce u veverky liščí a čikarí červeného v USA (Stenger et al. 2015b). Tento genotyp byl také nalezen v Itálii u veverky popelavé (Prediger et al. 2017). Společně s *C. ubiquitum* se jedná o kryptosporidii, která je nejčastěji detekována v severoamerických veverkách. Infekce tímto genotypem probíhá bezpříznakově. Bližší údaje o lokalizaci vývojového cyklu, o patogenitě a o dalších biologických charakteristikách nejsou známy. Tento genotyp byl popsán jako příčina kryptosporidiózy lidí (Robinson et al. 2008, Davies et al. 2009, Elwin et al. 2012, Yan et al. 2017, Loeck et al. 2020).

***Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp II**

Výskyt tohoto genotypu byl zaznamenán pouze v USA, a to u čipmanků východních (Feng et al. 2007, Stenger et al. 2015b). Další biologické charakteristiky jako velikost oocyst, průběh infekce, lokalizace v hostiteli a patogenita nejsou známy.

***Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp III**

Lv et al. (2009) poprvé detekovali tento genotyp u jednoho jedince burunduka páskovaného v Číně. Stejný genotyp byl rovněž v Číně v letech 2019 a 2020 popsán u veverky obecné (GenBank MH940289; nepublikováno) a křečika džungarského (*Phodopus sungoris*; GenBank MW308505; nepublikováno). Žádné bližší informace o velikosti oocyst nebo průběhu infekce touto kryptosporidií nejsou známy.

***Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp IV**

Tento genotyp byl detekován u jednoho jedince čipmanka východního (Stenger et al. 2015b) a u krysy (*Rattus* spp.) v Číně (GenBank MT561532; nepublikováno). Bližší informace o tomto genotypu kryptosporidie nejsou známy.

***Cryptosporidium* sp. deer mouse genotyp III**

Poprvé byl tento genotyp popsán jako W1 z nádrže na pitnou vodu v USA (Feng et al. 2007). U zástupců čeledi Sciuridae byl výskyt tohoto parazita zaznamenán u pěti jedinců veverky popelavé v New Yorku (Feng et al. 2007) a na jedné lokalitě v severní Minnesotě u veverky popelavé a čikarí červeného (Stenger et al. 2015b).

***Cryptosporidium* sp. ground squirrel genotyp I, II a III**

Tyto genotypy byly detekovány pouze u zemních veverek v USA. Genotyp I a III byly nalezeny u sysla páskovaného (*Ictidomys tridecemlineatus*) a genotyp II byl detekován u psouna prérijního (Stenger et al. 2015b). Předpokládá se, že tyto genotypy jsou úzce hostitelsky specifické, nepatogenní a nemají zoonotický potenciál. Další informace o biologických vlastnostech zatím chybí.

- **Druhy a genotypy hostitelsky nespecifické, nalezené u veverek**

Cryptosporidium muris

Cryptosporidium muris bylo poprvé detekováno u laboratorních myší (Tyzzer 1907). První nález tohoto druhu kryptosporidií u zástupců čeledi Sciuridae je z roku 2003, kdy bylo *C. muris* molekulárními metodami prokázáno ve vzorcích trusu burunduka páskovaného pocházejícího z jihovýchodní Asie, dovezeného do ČR v listopadu 1999 (Hůrková et al. 2003). Poté bylo *C. muris* nalezeno ještě u jedné veverky popelavé v New Yorku, USA (Feng et al. 2007). Velikost oocyst je $8,4 (7,5-9,8) \times 6,3 (5,5-7,0) \mu\text{m}$ (Iseki 1986). *Cryptosporidium muris* je striktně žaludeční kryptosporidií, nákaza zvířat je většinou bezpříznaková (Jalovecká et al. 2010, Kváč et al. 2016), narozdíl od infekcí člověka, kde se typicky objevuje vodnatý průjem (Palmer et al. 2003, Chappell et al. 2015).

Cryptosporidium parvum

Cryptosporidium parvum bylo poprvé popsáno v laboratorních myších (Tyzzer 1912), nicméně je pravděpodobné, že Tyzzer pracoval s jiným druhem, než je dnes známé *C. parvum* parazitující primárně u skotu a dalších hospodářských zvířat (Robertson et al. 2014). Jedná se o druh s velmi širokou hostitelskou specifitou a předpokládá se, že je infekční pro většinu savců a některé ptáky (Morgan et al. 1999, Bajer et al. 2003). Velikosti oocyst *C. parvum* se pohybuje v rozmezí $4,2 (4,2-5,8) \times 4,8 (3,5-5,0) \mu\text{m}$ (Hijawi et al. 2004). Parazit je lokalizována u svých hostitelů primárně v tenkém střevě. V rámci podčeledi Scurinae bylo *C. parvum* detekováno u veverky popelavé (Feng et al. 2007) a veverky Pallasovy (Chai et al. 2019). Infekce vyvolaná druhem *C. parvum* je často spojována s klinickým onemocněním, nicméně s ohledem na nízký počet infikovaných veverek nemáme žádné údaje o patogenitě u této kryptosporidie u veverek.

Cryptosporidium ubiquitum

Cryptosporidium ubiquitum je druh parazitující u širokého spektra hostitelů převážně však u domácích a volně žijících přežvýkavců (Fayer et al. 2010). V rámci podčeledi Scurinae byla tato kryptosporidie detekována u čikarí červeného, čipmanka východního (*Tamias striatus*), veverky liščí, veverky popelavé, veverky obecné

(Feng et al. 2007, Prediger et al. 2017, Chen et al. 2021, Masuda et al. 2021). Rozšíření tohoto druhu je celosvětové a veverky parazitované *C. ubiquitum* byly popsány v Asii (Čína a Japonsko), v Evropě (Itálie) a v Severní Americe (USA) (Feng et al. 2007, Prediger et al. 2017, Masuda et al. 2021). Velikost oocyst *C. ubiquitum* se pohybuje v rozmezí $4,1\text{--}5,3 \times 4,3\text{--}5,0 \text{ }\mu\text{m}$ (Fayer et al. 2010). Žádné bližší informace o patogenitě *C. ubiquitum* u veverek nejsou známy.

Cryptosporidium wrairi

Tento druh kryptosporidie byl nalezen v provincii Sečuán v Číně u jednoho jedince veverky Pallasovy (*Callosciurus erythraeus*). Molekulární analýzy prokázaly 99,6% podobnost s izoláty z morčat (Chai et al. 2019), které jsou typickým hostitelem tohoto druhu (Vetterling et al. 1971b). Žádné bližší informace o výskytu, prevalenci nebo patogenitě *C. wrairi* u veverek nejsou známy.

***Cryptosporidium* sp. rat genotyp II**

Tento genotyp byl poprvé popsán u krysy *Rattus tanezumi* (Lv et al. 2009). Doposud byly popsány dva případy infekce veverky Pallasovy v Číně (Chai et al. 2019). Nejsou známy další informace o tomto genotypu u veverek.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo získat bližší poznatky o prevalenci, diverzitě a biologii kryptosporidií u hlodavců podčeledi Sciurinae, čehož bylo dosaženo dílčími úkoly.

Dílčí úkoly práce, které přispěly k hlubšímu poznání studované problematiky:

- vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidiových infekcí u volně žijících stromových veverek v Itálii, České republice a na Slovensku;
- ve spolupráci se zahraničními kolegy studovat rozšíření kryptosporidií u stromových a zemních veverek v USA;
- pomocí multilokusové genotypizace a fylogenetických analýz popsat diverzitu kryptosporidií studovaných veverek;
- popsat biologii získaných genotypů kryptosporidií, zejména průběh infekce, patogenitu a lokalizaci vývojového cyklu včetně popisu vývojových stádií;
- ověřit hostitelskou specifitu jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií.

4 HYPOTÉZY

Na základě studia literatury, znalostí získaných v rámci pilotních studií a výsledků získaných v rámci předložené práce jsme stanovili následující hypotézy, které byly ověřovány v rámci řešení dílčích úkolů práce:

- Zemní a stromové veverky jsou parazitovány odlišnými, hostitelsky specifickými druhy kryptosporidií.
- *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I byl do Evropy zavlečen spolu s introdukovanými veverkami ze Severní Ameriky a nešíří se populací veverek obecných.
- Genotypy kryptosporidií veverek představují samostatné druhy v rámci rodu *Cryptosporidium*.
- Stromové veverky nezdědka sdílí společný habitat s lidmi, a mohou být rezervoárem zoonotických kryptosporidií.

5 KOMENTÁŘ K VÝSLEDKŮM

Všechny dosažené výsledky (obrázky, grafy, tabulky), použitý materiál a metody

je možno nalézt v příložených publikacích (Přílohy 1–3).

Vzorky pro molekulární a mikroskopické analýzy byly sbírány na dvou kontinentech, v Severní Americe a Evropě, jmenovitě v USA (Montana, Severní Dakota, Minnesota), na severu Itálie, v České republice a na Slovensku. Celkem bylo získáno 925 individuálních vzorků. V souladu s předešlými studiemi byla pozitivita vyšetřovaných vzorků pomocí standardních mikroskopických metod v porovnání s molekulárními metodami výrazně nižší (Čondlová et al. 2019, Horčíčková et al. 2019, Holubová et al. 2020b). Celkem 57,4 % PCR pozitivních vzorků bylo mikroskopicky negativních (Tabulka 1). Tyto výsledky potvrzují předešlé údaje a dokazují, že intenzita infekce kryptosporidiových infekcí u volně žijících zvířat je často pod detekční hladinou mikroskopických metod (Werner et al. 2004, Ježková et al. 2016, Čondlová et al. 2018).

Tabulka 1. Počet vyšetřených stromových a zemních veverek a výsledky detekce kryptosporidií na základě mikroskopického a molekulárního vyšetření trusu.

Původ vzorků	Typ veverky	Vyšetřeno	Pozitivní		Prevalence
			mikroskopicky	PCR	
USA	Stromové	185	ND	74	40 %
	Zemní	125	ND	61	48,8 %
Itálie	Stromové	357	11	21	5,9 %
Česká republika	Stromové	200	7	20	10 %
Slovensko	Stromové	58	2	6	10,3 %
Celkem		925		182	

ND - nevyšetřeno

Promořenost stromových veverek kryptosporidiemi v Evropě se pohybovalo od 6 do 10 %, což je v souladu s nízkou prevalencí zjištěnou v dřívějších studiích z Itálie (21,5 %) a z Číny (26,3 %) (Kváč et al. 2008, Lv et al. 2009, Prediger et al. 2017). Naopak studie provedená v USA ukázala výrazně vyšší (40 %) promořenost stromových veverek kryptosporidiemi (Stenger et al. 2015b).

HYPOTÉZA 1: Zemní a stromové veverky jsou parazitovány odlišnými, hostitelsky specifickými druhy kryptosporidií.

První z předkládaných studií (Příloha 1) vznikla za spolupráce kolegů z USA a jejím cílem bylo prostudovat výskyt kryptosporidií u zemních a stromových veverek v Severní Americe v rámci areálů, kde se spolu setkávají různé druhy studovaných zvířat a popsat diverzitu kryptosporidií a jejich mezidruhové sdílení. Byly odchyceny tři druhy stromových (veverka popelavá, veverka liščí a čikarí červený) a tři druhy zemních veverek (sysel páskovaný, sysel zlatavý a psoun prériový). Výsledky molekulárních analýz zaměřených na detekci části genu kódujícího malou podjednotku rRNA kryptosporidií ukázaly, že přibližně 40 % jedinců čikarí červených (17/42) a veverek popelavých (55/136) bylo pozitivních na kryptosporidie (Tabulka 2). Promořenost veverek popelavých v USA v porovnání s populací těchto veverek introdukovaných do Itálie (kapitola Hypotéza 2) byla výrazně vyšší (40,4 % vs 3,7 %) (Stenger et al. 2015b, Prediger et al. 2017). Největší rozdíl mezi těmito populacemi byl v počtu zvířat infikovaných druhem *C. ubiquitum*. Ve studiích provedených v Itálii a USA jsme u veverek popelavých detekovali stejný subtyp XIIb druhu *C. ubiquitum*, v USA navíc i subtyp XIIc (Stenger et al. 2015b, Prediger et al. 2017). Li et al. (2014) ve své studii vyslovili domněnku, že různé subtypy druhu *C. ubiquitum* mají rozdílné geografické rozšíření a hostitelskou specifitu. Subtyp XIIa je spojován s infekcí přežvýkavců a je celosvětově rozšířen, subtypy XIIb a XIIc jsou spojovány s infekcemi hlodavců v severní Americe. Relativně nízkou prevalenci (28,6 %) u veverek liščích v USA lze vysvětlit malým počtem vyšetřených jedinců (n=7). Procento nakažených zvířat na různých lokalitách se od sebe může významně lišit (Čondlová et al. 2018, Čondlová et al. 2019, Horčíčková et al. 2019, Holubová et al. 2020b). Vzhledem k nízkému počtu studovaných jedinců a neexistující obdobné studii na stejném druhu veverek, nelze ze zjištěných výsledků dělat závěry.

U sysla páskovaného, psouna prériového a sysla zlatavého jsme zjistili 70 %, 35 % a 100 % prevalenci kryptosporidií, což je výrazně vyšší promořenost jak ve srovnání se stromovými veverkami žijícími ve stejné oblasti (Stenger et al. 2015b), tak i s výsledky Atwill et al. (2004), kteří popsali 12% prevalenci u sysla veverčího v Kalifornii, USA. Obdobně nízké prevalence zjistili i Pereira et al. (2010), kteří

detekovali oocysty kryptosporidií u 20 % syslů veverčích, 22 % syslů zlatavých a 14 % syslů Beldingových.

Zajímavé je srovnání našich výsledků (Příloha 1) s výsledky Pereira et al. (2010). V naší práci byl podíl *C. rubeyi* na všech kryptosporidiových infekcích 18 %, což odpovídá 14–22 % prevalenci *C. rubeyi* u zemních veverek ve výše zmíněné studii. Celkem 82 % námi genotypovaných vzorků připadlo na další druhy a genotypy kryptosporidií, přičemž dominantními byly *Cryptosporidium* sp. ground squirrel genotyp I a III (Tabulka 2).

Tabulka 2. Výskyt *Cryptosporidium* spp. u stromových a zemních veverek detekovaných v rámci této práce v USA, Itálii, České republice a na Slovensku.

Druh (vědecké jméno)	Země původu	Vyšetřených /pozitivních	Genotypizace	Publikace
veverka obecná (<i>Sciurus vulgaris</i>)	ITA	123/13	<i>C. sciurinum</i> (n = 13)	Příloha 2
	CZK	200/20	<i>C. sciurinum</i> (n = 20)	Příloha 3
	SVK	58/6	<i>C. sciurinum</i> (n = 6)	Příloha 3
	Celkem	381/39		
veverka popelavá (<i>Sciurus carolinensis</i>)	USA	136/55	<i>C. ubiquitum</i> (n = 19) <i>Cryptosporidium</i> sp. skunk genotyp (n = 4) <i>Cryptosporidium</i> sp. deer mouse genotyp (n = 5) <i>Cryptosporidium</i> sp. (n = 27)	Příloha 1
	ITA	162/6	<i>C. ubiquitum</i> (n = 2) <i>Cryptosporidium</i> sp. skunk genotyp (n = 3) <i>Cryptosporidium</i> sp. chipmunk genotyp I (n = 1)	Příloha 2
	Celkem	298/61		
veverka Pallasova (<i>Callosciurus erythraeus</i>)	ITA	72/2	<i>Cryptosporidium</i> sp. chipmunk genotyp I (n = 2)	Příloha 2
čikarí červený (<i>Tamiasciurus hudsonicus</i>)	USA	42/17	<i>C. ubiquitum</i> (n = 6) <i>Cryptosporidium</i> sp. skunk genotyp (n = 1) <i>Cryptosporidium</i> sp. deer mouse genotyp (n = 1) <i>Cryptosporidium</i> sp. (n = 9)	Příloha 1
veverka liščí (<i>Sciurus niger</i>)	USA	7/2	<i>C. ubiquitum</i> (n = 1) <i>Cryptosporidium</i> sp. skunk genotyp (n = 1)	Příloha 1
sysel páskovaný (<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>)	USA	47/33	<i>Cryptosporidium</i> sp. ground squirrel genotyp I (n = 8) <i>Cryptosporidium</i> sp. ground squirrel genotyp III (n = 11) <i>Cryptosporidium</i> sp. (n = 14)	Příloha 1
sysel prériový (<i>Cynomys ludovicianus</i>)	USA	77/27	<i>C. rubeyi</i> (n = 10) <i>Cryptosporidium</i> sp. ground squirrel genotyp II (n = 1) <i>Cryptosporidium</i> sp. (n = 16)	Příloha 1
sysel zlatavý (<i>Callospermophilus lateralis</i>)	USA	1/1	<i>C. rubeyi</i> (n = 1)	Příloha 1

CZK – Česká republika, ITA – Itálie, SVK – Slovensko, USA – Spojené státy americké.

V rámci naší studie (Příloha 1) nebyla řada vzorků pozitivních molekulárně na přítomnost specifických genů kryptosporidií úspěšně sekvenována. Toto lze vysvětlit přítomností dvou a více různých druhů/genotypů kryptosporidií v jednom vzorku (smíšená infekce). Při přímém sekvenování PCR produktů obsahujícím více než

jednu unikátní sekvenci dochází k překryvu bází a výsledná data ze sekvenátoru tak mohou být nečitelná. K tomuto dochází zejména, pokud se sekvence různých druhů od sebe značně liší nebo je u jedné ze sekvencí delece nebo inzert části sekvence (Tanriverdi et al. 2003, Tanriverdi et al. 2007).

Výsledky naší a dalších studií ukazují, že rozdíly v prevalenci mohou ovlivňovat nejen druh a genotyp kryptosporidie, ale také hustota populace vnímavých hostitelů a prostředí usnadňující šíření infekce (De Waele et al. 2013, Tangtrongsup et al. 2020). Prokázali jsme, že stromové a zemní veverky jsou hostiteli různých druhů a genotypů kryptosporidií navzdory překrývajícímu se areálu výskytu.

HYPOTÉZA 2: *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I a skunk genotyp byly do Evropy zavlečeny spolu s introdukovanými veverkami ze Severní Ameriky a nešíří se populací veverek obecných.

Cílem druhé studie (Příloha 2) bylo popsat diverzitu kryptosporidií u stromových veverek v severní Itálii, kam byly introdukovány veverky popelavé a veverky Pallasovy ze Severní Ameriky, respektive z Asie. Celkem bylo odchyceno 357 veverek, z toho 123 veverek obecných původních v Evropě, 162 veverek popelavých a 72 veverek Pallasových. U všech vzorků trusu byla provedena mikroskopická detekce oocyst kryptosporidií a PCR vyšetření na přítomnost specifické DNA genů kódujících SSU, aktin a *gp60* kryptosporidií. Prevalence u veverek obecných byla 10,7 % (13/123). Veverky popelavé byly infikovány s celkovou prevalencí 3,7 % (6/162). Pozitivní vzorky měly též veverky Pallasovy – 2,8 % (2/72).

Veverky obecné byly v Itálii parazitovány pouze druhem *C. sciurinum* (*Cryptosporidium* sp. ferret genotyp; Příloha 3) patřícím do dvou *gp60* subtypů VIIIb a VIIIc. V této studii je mylně uvedeno, že byl detekován subtypem VIIIId. Tento subtyp byl mylně označen a jedná se o *C. parvum* subtyp IIa. Na rozdíl od veverek obecných, veverky popelavé byl parazitovány velkým počtem kryptosporidií - *C. ubiquitum* (subtyp XIIb), *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp (subtyp XVIa) a *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I (subtyp XIVa). Shodný subtyp *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I byl také nalezen u dvou jedinců veverek Pallasových. Z této a předchozí studie (Kváč et al. 2008) lze odvozovat, že *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp subtyp XVIa, *Cryptosporidium* sp. chipmunk

genotyp I a *C. ubiquitum* subtyp XIIb byly do Evropy s největší pravděpodobností introdukovány společně s veverkami popelavými, které jsou pravděpodobně jejich přirozenými hostiteli (Feltus et al. 2006, Guo et al. 2015, Loeck et al. 2020). U veverek Pallasových doposud nebyl v areálu jejich přirozeného výskytu tento genotyp detekován a je možné, že nejen veverky obecné (Kváč et al. 2008), ale i do Itálie introdukované veverky Pallasovy jsou infikovány tímto parazitem pocházejícím od veverky popelavé.

Infekce vyvolaná *C. sciurinum* a *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I je u veverek snadno mikroskopicky detekovatelná, a to s vysokou intenzitou infekce, nicméně nebyly pozorovány žádné klinické příznaky kryptosporidiózy u vyšetřovaných jedinců ani v našich, ani v jiných studiích (Kváč et al. 2008, Prediger et al. 2017, Deng et al. 2020). Jedinými výjimkami jsou dva případy infekce veverky obecné *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I ve Švédsku, kde byly u těchto hostitelů popsány klinické příznaky kryptosporidiózy. Jeden vzorek byl dokonce odebrán post mortem, a bylo konstatováno, že veverka uhynula v důsledku diarrhoeou rozvráceného metabolismu (Lebbad et al. 2013, Bujila et al. 2021, Lebbad et al. 2021).

Otázkou zůstává, jak se *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I dostal do severní části Evropy, když v této oblasti není popsán výskyt introdukovaných veverek popelavých. V naší další studii z České republiky a Slovenska (Příloha 3) jsme se zaměřili na kryptosporidie infikující autochtonní veverku obecnou a zajímalo nás, zda se importované genotypy kryptosporidií nerozšířily už i do střední Evropy. V rámci naší studie jsme nezaznamenali výskyt importovaných druhů veverek, byly odchyceny jen veverky obecné. Prevalence kryptosporidií u veverek obecných v České republice a na Slovensku dosahovala hodnoty 10,1 % (26/258), což se shoduje s výsledky zjištěnými v naší Italské studii (10,7 %) a publikací z Číny (26,3%) (Lv et al. 2009, Prediger et al. 2017, Prediger et al. 2021). Obdobná výše promoření kryptosporidii byla zjištěna i u dalších populací hlodavců, např. 4 % v *Apodemus* spp. v Evropě, 27 % v *Apodemus* sp. v Japonsku, 16 % v potkanech (*Rattus norvegicus*) v Česku, 12 % v ondatrách (*Ondatra zibethicus*) v USA, 30 % v hlodounech čínských (*Rhizomys sinensis*) nebo 7–14% v hrabošovitých (Arvicolinae) v Evropě (Murakoshi et al. 2013, Stenger et al. 2017, Čondlová et al. 2019, Li et al. 2020, Ježková et al. 2021b).

Všechny sekvenční genů pro *SSU*, aktin, *HSP70*, *COWP* se mezi sebou neodlišovaly a shodovaly se sekvencemi z předchozích studií na 99,8–100% a ukazovaly, že všech 26 veverek obecných, které byly *Cryptosporidium* pozitivní, bylo výhradně parazitováno *C. sciurinum* (*Cryptosporidium* sp. ferret genotyp).

Nepodařilo se nám prokázat šíření *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotypu I a skunk genotypu v populacích veverek obecných ve střední Evropě. Na základě našich výsledků a studií provedených ve Švédsku si dovoluujeme vyslovit hypotézu, že *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I je pro veverky obecné vysoce patogenní a způsobuje u nich rychlý úhyn. V případě, že nástup klinických příznaků je velmi razantní je obtížné takto postižené zvíře odchytit do živochytné pasti a získat z něho vzorky pro molekulární analýzy.

HYPOTÉZA 3: Genotypy kryptosporidií veverek představují samostatné druhy v rámci rodu *Cryptosporidium*.

Výsledky našich i předchozích studií ukázaly, že jak stromové, tak zemní veverky jsou parazitovány velkým množstvím kryptosporidií, které jsou dosud označovány jako genotypy. Na základě dnešních znalostí se lze domnívat, že jednotlivé genotypy představují samostatné taxony v rámci rodu *Cryptosporidium*, ale v současné době nedisponujeme dostatečnými znalostmi o jejich biologii, aby mohly být popsány jako samostatné druhy. Jednou ze zásadních překážek ve studiu biologických charakteristik kryptosporidií je jejich hostitelská specifita, nedostatek infekčních oocyst zapříčiněný i faktem, že dosud neumíme kultivovat kryptosporidie *in vitro*.

V rámci naší studie se nám podařilo získat dostatečné množství izolátu *Cryptosporidium* sp. ferret genotypu, u kterého jsme provedli podrobnou multilokusovou genotypizaci a studium biologických vlastností.

Cryptosporidium sp. ferret genotyp (původně *C. parvum* ferret genotyp (AF112572)) byl poprvé detekován v roce 1999 u přirozeně infikovaných fretek (*Mustela nigripes*) (Xiao et al. 1999b). Od té doby byla tato kryptosporidie nalezena v několika čipmacích východních a burunducích páskovaných, ve velkém množství veverek obecných chovaných v zajetí nebo odchycených ve volné přírodě a překvapivě i v jedné andulce vlnkované (*Melopsittacus undulatus*) (Kváč et al. 2008, Lv et al. 2009, Li et al. 2016, Prediger et al. 2017, Deng et al. 2020). Nejčastěji byl

tento genotyp detekován u veverek obecných. Z toho vyvozujeme, že veverka obecná je pravděpodobně typický hostitel této kryptosporidie.

V rámci studie jsme získali dostatek oocyst *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp z veverky obecné ze záchranné stanice v Třeboni, ale z logistických důvodů nebylo možné zjistit infekční dávku veverek za experimentálních podmínek. Proto byla určena intenzita infekce u jedinců různého věku v záchranných stanicích. Devět z jedenácti juvenilních jedinců vylučovalo mikroskopicky detekovatelné oocysty (18 000–74 000 OPG). Naproti tomu veverky starší 10 týdnů vylučovaly oocysty pod mikroskopicky detekovatelným limitem (2 000 OPG; Příloha 3). Nejvyšší intenzitu infekce (49 666 OPG) vykazovala skupina zvířat starých 6–7 týdnů. Skupina ve věku 4–5 týdnů a 8–9 týdnů vylučovala oocysty v množství okolo 20 000 OPG. To je shodné s předešlými studiemi, kdy dospělí jedinci vykazovali slabou pozitivitu zachytitelnou pouze PCR vyšetřením, kdežto mláďata vylučovala mikroskopicky detekovatelné množství oocyst (Kváč et al. 2008, Prediger et al. 2017). Tato věková specifita kryptosporidií byla dříve popsána v řadě studií (Sreter et al. 1995, Rhee et al. 1999, Pavlásek 2001, Kváč et al. 2009, Holubová et al. 2018, Horčíčková et al. 2019). Juvenilní jedinci jsou pravděpodobně náchylnější k infekci kvůli naivnímu a nevyzrálému imunitnímu systému, což má za následek horší průběh infekce projevující se vyšším množstvím vylučovaných oocyst.

Prepatentní perioda *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp není známa, ale je zřejmé, že mláďata jsou infikována ve velmi raném věku (již 4 týdny) a že infekce trvá okolo jednoho měsíce. Je možné, že infekce je předávána z asymptomaticky nakažených rodičů na potomstvo, to by však muselo být podrobeno bližšímu experimentálnímu zkoumání. Patogenita *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp je neznámá, ale konzistence trusu a nepřítomnost zaschlého průjmu v tělním pokryvu okolo rektu vyšetřovaných zvířat naznačuje, že zkoumaní jedinci nevykazovali klinické příznaky kryptosporidiózy, což bylo v souladu s předešlými studiemi (Kváč et al. 2008, Prediger et al. 2017).

Výsledky experimentálních infekcí ukázaly, že oocysty *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp nejsou infekční pro laboratorní myši (BALB/c a SCID), pískomily mongolské, mastomyši, kuřata nebo andulky vlnkované. Jediná popsána infekce andulky vlnkované mohla být zapříčiněna kontaminací a pasáží oocyst nebo DNA zaživacím traktem nespecifického hostitele, jak bylo popsáno v mnoha předchozích

studiích (Crawshaw et Mehren 1987, Graczyk et Cranfield 1998, Graczyk et al. 1998, Kváč et al. 2012). Velikost oocyst *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp, které jsme měřili po purifikaci v roztoku, měly velikost $5,54 \times 5,22 \mu\text{m}$, s poměrem délky k šířce 1,07. Jsou větší než *C. parvum* ($5,2 \times 4,9 \mu\text{m}$) nebo *C. ratti* ($4,9 \times 4,6 \mu\text{m}$) a menší než *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I ($5,8 \times 5,4 \mu\text{m}$) (Kváč et al. 2008, Ježková et al. 2021b). Mikroskopické rozdíly však bohužel nejsou použitelné pro rutinní diagnostiku. Oocysty jsou bezbarvé, sférické a tlustostěnné. Vykazují stejné barvicí charakteristiky jako ostatní druhy a genotypy kryptosporidií, ať už se jedná o barvení dle Ziehl-Neelsena nebo Miláčka-Vítovce, a zkříženě reagují s imunofluorescenčními reagensy vyvinutými pro *C. parvum*.

Tak jako je popis morfologie oocyst potřebný k popisu druhu, tak molekulárně genetická charakterizace je potřeba k jeho identifikaci. Předchozí studie poukázaly na přítomnost divergentních kopií SSU genu kryptosporidií, např. u *C. andersoni*, *C. apodemi*, *C. ditrichi*, *C. parvum*, *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp I a II, nebo *Cryptosporidium* sp. rat genotyp II a III (Ng-Hublin et al. 2013, Li et al. 2014, Čondlová et al. 2018, Čondlová et al. 2019, Deng et al. 2020). Stenger et al. (2015a) detekovali divergentní kopie SSU u *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp II. Společný výskyt různých kopií SSU genu v hostiteli a homogenita v genech pro aktin a *HSP70* naznačuje, že divergentní kopie jsou paralogy v jedné kryptosporidiové linii a činit závěry pouze na základě sekvencí SSU genu by mohlo vést k mylné interpretaci výsledků. Proto jsme do našich analýz zahrnuli i další geny. Přestože některé studie popsaly u různých kryptosporidií polymorfismus u aktinu, *HSP70* a *TRAP-C1* (Ng-Hublin et al. 2013, Čondlová et al. 2018, Čondlová et al. 2019), výsledky našich studií neprokázaly přítomnost různých variant těchto genů u *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp. V genu pro gp60 jsme u veškerých v Evropě detekovali pouze subtypy VIIIb a VIIIc. Naproti tomu subtyp VIIIA byl nalezen pouze v Číně (Lv et al. 2009). Některé studie naznačují, že gp60 subtypy se liší podle geografické lokalizace. Například *C. tyzzeri* subtyp IXa byl nalezen u myši domácí (*Mus musculus musculus*) vyskytující se ve východní Evropě, Číně, a Kuvajtu, zatímco subtyp IXb byl detekován (*Mus musculus domesticus*) v západní Evropě, USA a Novém Zélandu (Kváč et al. 2013b). Podobný rozdíl v distribuci jednotlivých gp60 subtypů byl popsán u *C. parvum* a *C. ubiquitum* (Xiao 2010, Li et al. 2014).

Fylogenetické analýzy prokázaly, že *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp vytváří mezi ostatními střevními kryptosporidii samostatnou skupinu. Na základě fylogenetické analýzy genů kódujících SSU, aktin, HSP70, TRAP-C1, COWP, a gp60 a biologických vlastností jsme navrhli ustanovit tento genotyp jako samostatný druh, který jsme pojmenovali *Cryptosporidium sciurinum*.

HYPOTÉZA 4: Stromové veverky nezhřídka sdílí společný habitat s lidmi a mohou být rezervoárem zoonotických kryptosporidií.

Lidské infekce jsou z 95 % způsobeny druhem *C. parvum* a *C. hominis*, nicméně zoonotický potenciál má dalších 20 druhů a genotypů kryptosporidií, mezi nimiž jsou i *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp a *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I, které byly detekovány u stromových veverek (Stenger et al. 2015b).

V naší americké a italské studii byly u stromových veverek detekovány zoonotické druhy *C. ubiquitum* a *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp a *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I.

V rámci druhu *C. ubiquitum* detekovaném v USA byly nalezeny subtypy XIIb a XIIc, které byly dříve popsány u hlodavců vč. veverek, v povrchových vodách a u lidí v severní Americe (Li et al. 2014, Guy et al. 2021). V naší studii v Itálii byl u veverek detekován subtyp XIIb druhu *C. ubiquitum*. Nicméně do současné doby nejsou známy studie, které by potvrzovaly přenos infekce z veverek na člověka v Itálii. Ve Švédsku byl *C. ubiquitum* u lidí zachycen, ale jednalo se o subtyp XIIa, který je spojován s infekcemi u přežvýkavců (Bjorkman et al. 2015, Lebbad et al. 2021).

Námi detekovaný subtyp *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I se shodoval se subtypem, které byl popsán jako příčina lidských infekcí v Severní Americe (Feltus et al. 2006, Guo et al. 2015) a ve Švédsku (Lebbad et al. 2021). Ve Švédsku navíc prokázali přímý vztah mezi touto kryptosporidií infikovanou veverkou obecnou a lidskými infekcemi. Jednalo se o dvě veverky obecné, které se díky svému zhoršenému zdravotnímu stavu dostaly do záchranné stanice, kde posléze nakazily ošetřovatele (Bujila et al. 2021). Výskyt této kryptosporidie ve Švédsku bude muset být podroben bližšímu zkoumání.

Další kryptosporidií schopnou infikovat člověka, a která byla detekována v rámci našich studií, je *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp. Vzhledem k širokému spektru hostitelů bývá oocystami této kryptosporidie často kontaminována povrchová voda (Jellison et al. 2009, Ruecker et al. 2012, Wilkes et al. 2013, Yan et al. 2017). Tento genotyp byl detekován ve velkém množství volně žijících živočichů včetně veverek (Zhou et al. 2004, Feng et al. 2007, Ziegler et al. 2007, Rengifo-Herrera et al. 2011, Stenger et al. 2015b, Yan et al. 2017). Případy lidských infekcí byly popsány jak v Severní Americe (Yan et al. 2017, Loeck et al. 2020), tak Evropě, konkrétně ve Velké Británii (Robinson et al. 2008, Davies et al. 2009, Elwin et al. 2012). Subtyp XVIa *Cryptosporidium* sp. skunk genotypu detekovaný ve veverkách popelavých v Itálii je shodný se subtypem nalezeným ve stejném hostiteli v USA (Yan et al. 2017). Je možné, že zdrojem lidských infekcí způsobených *Cryptosporidium* sp. skunk genotypem ve Velké Británii byly veverky popelavé, ale vzhledem k tomu, že metoda subtypizace *Cryptosporidium* sp. skunk genotypu byla publikována až v roce 2015 (Guo et al. 2015), nebyly lidské případy infekcí ve Velké Británii subtypizovány. Také dosud nebyla provedena žádná relevantní studie zabývající se diverzitou kryptosporidií u veverek ve Velké Británii.

Stromové veverky osídlující i urbánní a suburbánní oblasti, mohou být v přímém nebo nepřímém kontaktu s lidmi, a jako přirození hostitelé zoonotických kryptosporidií představují potenciální riziko a rezervoár kryptosporidií infekčních pro člověka.

6 ZÁVĚRY

- Bylo prokázáno, že stromové a zemní veverky jsou parazitovány odlišnými druhy a genotypy kryptosporidií, které jsou hostitelsky specifické a nedochází k přenosu infekce mezi skupinami ani v případě, že jednotliví zástupci obývají stejný areál výskytu.
- Stromové veverky jsou hostiteli zoonotických kryptosporidií, zatímco u zemních veverek nebyl výskyt kryptosporidií infekčních pro člověka prokázán.
- Studium biologických vlastností a molekulární analýzy genů kódujících SSU, aktin, *HSP70*, *TRAP-C1*, *COWP* a *gp60* potvrdily odlišnost *Cryptosporidium* sp. ferret genotypu od ostatních druhů rodu *Cryptosporidium* a tato kryptosporidie byla popsána jako samostatný druh *Cryptosporidium sciurinum*.
- Je pravděpodobné, že *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp a *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I byly do Evropy zavlečeny spolu s veverkou popelavou. Zatímco severoamerické a asijské druhy stromových veverek mohou být infikovány velkým počtem druhů a genotypů kryptosporidií, zdá se, že veverka obecná obývající Evropu a Asii je hostitelem téměř výlučně *C. sciurinum*.
- Ve střední Evropě jsme neprokázali výskyt *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp a *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I u veverek obecných, což naznačuje, že tyto introdukované druhy kryptosporidií se zatím nerozšířily z areálu původního zavlečení.
- Stromové veverky mohou představovat potenciální riziko přenosu zoonotických druhů a genotypů kryptosporidií, zejména v lidmi osídlených oblastech a aglomeracích, kde je kontakt lidí a zvířat velmi blízký.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 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.
- Anofel** 2010: *Cryptosporidium* National Network, Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006-2009. Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 15: 19642.
- Appelbee A.J., Thompson R.C., Olson M.E.** 2005a: *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. Trends in Parasitology 21: 370–376.
- Appelbee A.J., Thompson R.C., Olson M.E.** 2005b: *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. Trends in Parasitology 21: 370–376.
- Atwill E.R., Camargo S.M., Phillips R., Alonso L.H., Tate K.W., Jensen W.A., Bennet J., Little S., Salmon T.P.** 2001: Quantitative shedding of two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). Applied and Environmental Microbiology 67: 2840–2843.
- Atwill E.R., Phillips R., Pereira M.D., Li X., McCowan B.** 2004: Seasonal shedding of multiple *Cryptosporidium* genotypes in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). Applied and Environmental Microbiology 70: 6748–6752.
- Atwill E.R., Phillips R., Rulofson F.** 2002: Environmental loading rates of the protozoa *Cryptosporidium parvum* waterborne pathogenic in certain domestic and wildlife species in California. Twentieth Vertebrate Pest Conference, Proceedings: 241–243.
- Azar S.R., Campos R.K., Bergren N.A., Camargos V.N., Rossi S.L.** 2020: Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks. Microorganisms 8: 1167.

- Baiwy E., Schockert V.** (Eds.) 2013: Risk analysis report of non-native organisms in Belgium. Risk analysis of the Fox squirrel, *Sciurus niger*. Unité de Recherches zoogéographiques, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgium, 32 pp.
- Bajer A., Caccio S., Bednarska M., Behnke J.M., Pieniazek N.J., Sinski E.** 2003: Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *Journal of Parasitology* 89: 1053–1055.
- Bertolino S.** 2009: Animal trade and non-indigenous species introduction: the world-wide spread of squirrels. *Diversity and Distributions* 15: 701–708.
- Bertolino S.** 2008: Introduction of the American grey squirrel (*Sciurus carolinensis*) in Europe: a case study in biological invasion. *Current Science* 95: 903–906.
- Bertolino S., Currado I., Mazzoglio P., Amori G.** 2000: Native and alien squirrels in Italy. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 11: 65–74.
- Bertolino S., Genovesi P.** 2003: Spread and attempted eradication of the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*) in Italy, and consequences for the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in Eurasia. *Biological Conservation* 109: 351–358.
- Bessoff K., Sateriale A., Lee K.K., Huston C.D.** 2013: Drug repurposing screen reveals FDA-approved inhibitors of human HMG-CoA reductase and isoprenoid synthesis that block *Cryptosporidium parvum* growth. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 1804–1814.
- Bjorkman C., Lindstrom L., Oweson C., Ahola H., Troell K., Axen C.** 2015: *Cryptosporidium* infections in suckler herd beef calves. *Parasitology* 142: 1108–1114.
- Blackburn B.G., Mazurek J.M., Hlavsa M., Park J., Tillapaw M., Parrish M., Salehi E., Franks W., Koch E., Smith F., Xiao L., Arrowood M., Hill V., da S.A., Johnston S., Jones J.L.** 2006: Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerging Infectious Diseases* 12: 684–686.
- Blackman M.J., Bannister L.H.** 2001: Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 117: 11–25.
- Bordes F., Langand J., Feliu C., Morand S.** 2007: Helminth communities of an introduced hare (*Lepus granatensis*) and a native hare (*Lepus europaeus*) in southern France. *Journal of Wildlife Diseases* 43: 747–751.

- Brainard J., Hammer C.C., Hunter P.R., Katzer F., Hurle G., Tyler K.** 2021: Efficacy of halofuginone products to prevent or treat cryptosporidiosis in bovine calves: a systematic review and meta-analyses. *Parasitology* 148: 408–419.
- Braks M.A.H., Duijster J.W., Stroo C.A.J.** 2022: [West Nile virus unexpectedly in the Netherlands]. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 166: D6278.
- Bujila I., Troell K., Fischerstrom K., Nordahl M., Killander G., Hansen A., Soderlund R., Lebbad M., Beser J.** 2021: *Cryptosporidium* chipmunk genotype I - An emerging cause of human cryptosporidiosis in Sweden. *Infection Genetics and Evolution* 92: 104895.
- Cabada M.M., White A.C.** 2010: Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? *Current Opinion in Infectious Diseases* 23: 494–499.
- Caccio S.M., Putignani L.** 2014: Epidemiology of Human Cryptosporidiosis. In: S.M. Cacciò and G. Widmer (Eds.), *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer, pp. 43–80.
- Carreno R.A., Martin D.S., Barta J.R.** 1999: *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research* 85: 899–904.
- Cavalier-Smith T.** 2014: Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology* 50: 472–495.
- CDC (Ed.)** 2019: <https://www.cdc.gov/lyme/datasurveillance/maps-recent.html>
- Crawshaw G.J., Mehren K.G.** 1987. Cryptosporidiosis in zoo and wild animals. In *Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsbericht des 29. Internationalen Symposiums Über die Erkrankungen der Zootiere* (Cardiff, Akademie-Verlag, Berlin), pp. 353–362.
- Current W., Blagburn B.** 1990: *Cryptosporidium*: infections in man and domesticated animals. In: P. Long (Ed.), *Coccidiosis of man and domestic animals.*: CRC Pres, Boca Raton, FL, pp. 155–185.
- Current W.L.** 1990: *Cryptosporidium* spp. In: P.D. Walzer and R.M. Genta (Eds.), *Parasitic infections in the compromised host*. Dekker, New York, pp. 281–341.

- Current W.L., Reese N.C.** 1986: A comparison of endogenous development of 3 isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *Journal of Protozoology* 33: 98–108.
- Current W.L., Upton S.J., Haynes T.B.** 1986: The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology* 33: 289–296.
- 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 S., 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.
- da Silva A.J., Cacciò S., Williams C., Won K.Y., Nace E.K., Whittier C., Pieniazek N.J., Eberhard M.L.** 2003: Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. *Veterinary Parasitology* 111: 297–307.
- Danforth M.E., Snyder R.E., Lonstrup E.T.N., Barker C.M., Kramer V.L.** 2022: Evaluation of the effectiveness of the California mosquito-borne virus surveillance & response plan, 2009-2018. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 16: e0010375.
- Davidson W.R.** 1976: Endoparasites of selected populations of gray squirrels (*Sciurus carolinensis*) in Southeastern United-States. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 43: 211–217.
- Davies A.P., Campbell B., Evans M.R., Bone A., Roche A., Chalmers R.M.** 2009: Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United kingdom. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 28: 838–840.
- de la Puerta M.L., Trinidad A.G., del Carmen Rodriguez M., Bogetz J., Sanchez Crespo M., Mustelin T., Alonso A., Bayon Y.** 2009: Characterization of new substrates targeted by *Yersinia tyrosine* phosphatase YopH. *PLoS One* 4: e4431.
- De Waele V., Van den Broeck F., Huyse T., McGrath G., Higgins I., Speybroeck N., Berzano M., Raleigh P., Mulcahy G.M., Murphy T.M.** 2013: Panmictic structure of the *Cryptosporidium parvum* population in Irish calves: influence of

- prevalence and host movement. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 2534–2541.
- Defilippo F., Dottori M., Lelli D., Chiari M., Cereda D., Farioli M., Chianese R., Cerioli M.P., Faccin F., Canziani S., Trogu T., Sozzi E., Moreno A., Lavazza A., Restelli U.** 2022: Assessment of the Costs Related to West Nile Virus Monitoring in Lombardy Region (Italy) between 2014 and 2018. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19: 5541.
- Deng L., Chai Y., Luo R., Yang L., Yao J., Zhong Z., Wang W., Xiang L., Fu H., Liu H., Zhou Z., Yue C., Chen W., Peng G.** 2020: Occurrence and genetic characteristics of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in pet red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in China. *Scientific Reports* 10: 1026.
- Ditrich O., Palkovič L., Štěrba J., Prokopič J., Loudová J., Giboda M.** 1991: The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. *Parasitology Research* 77: 44–47.
- Dorne J.L., Fernandez-Cruz M.L., Bertelsen U., Renshaw D.W., Peltonen K., Anadon A., Feil A., Sanders P., Wester P., Fink-Gremmels J.** 2013: Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: animal and human health aspects. *Toxicology and Applied Pharmacology* 270: 196–208.
- Dozieres A., Pisanu B., Gerriet O., Lapeyre C., Stuyck J., Chapuis J.L.** 2010: Macroparasites of Pallas's squirrels (*Callosciurus erythraeus*) introduced into Europe. *Veterinary Parasitology* 172: 172–176.
- Duff J.P., Scott A., Keymer I.F.** 1996: Parapox virus infection of the grey squirrel. *Veterinary Record* 138: 527–527.
- Dupont H.L., Chappell C.L., Sterling C.R., Okhuysen P.C., Rose J.B., Jakubowski W.** 1995: The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy-volunteers. *New England Journal of Medicine* 332: 855–859.
- Elwin K., Hadfield S.J., Robinson G., Chalmers R.M.** 2012: The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000-2008. *Epidemiology and Infection* 140: 673–683.
- Fayer R.** 2004: *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* 126: 37–56.
- Fayer R.** 2007: General Biology. In: R. Fayer and L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–42.

- Fayer R., Morgan U., Upton S.J.** 2000: Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology* 30: 1305–1322.
- Fayer R., Santín M., Macarisin D.** 2010: *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology* 172: 23–32.
- Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P.** 1997: The general biology of *Cryptosporidium*. In: R. Fayer (Ed.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–42.
- Feltus D.C., Giddings C.W., Khaitisa M.L., McEvoy J.M.** 2008: High prevalence of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in calves compared to mature cows in beef cow-calf operations. *Veterinary Parasitology* 151: 191–195.
- Feltus D.C., Giddings C.W., Schneck B.L., Monson T., Warshauer D., McEvoy J.M.** 2006: Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 4303–4308.
- 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.
- Fitzgerald J., Leonard P., Darcy E., Danaher M., O’Kennedy R.** 2011: Light-chain shuffling from an antigen-biased phage pool allows 185-fold improvement of an anti-halofuginone single-chain variable fragment. *Analytical Biochemistry* 410: 27–33.
- Foley J.E., Nieto N.C., Clueit S.B., Foley P., Nicholson W.N., Brown R.N.** 2007: Survey for zoonotic rickettsial pathogens in northern flying squirrels, *Glaucomys sabrinus*, in California. *Journal of Wildlife Diseases* 43: 684–689.
- Foo C., Farrell J., Boxell A., Robertson I., Ryan U.M.** 2007: Novel *Cryptosporidium* genotype in wild Australian mice (*Mus domesticus*). *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7693–7696.
- Ganong W.F.** (Ed.) 2005: Přehled lékařské fyziologie, Vol 20. Galén, Praha, 890 pp.
- Giadinis N.D., Papadopoulos E., Panousis N., Papazahariadou M., Lafi S.Q., Karatzias H.** 2007: Effect of halofuginone lactate on treatment and prevention of lamb cryptosporidiosis: an extensive field trial. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 30: 578–582.

- Gomez A., Kramer L.D., Dupuis A.P., 2nd, Kilpatrick A.M., Davis L.J., Jones M.J., Daszak P., Aguirre A.A.** 2008: Experimental infection of eastern gray squirrels (*Sciurus carolinensis*) with West Nile virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79: 447–451.
- Graczyk T.K., Cranfield M.R.** 1998: Experimental transmission of *Cryptosporidium* oocyst isolates from mammals, birds and reptiles to captive snakes. *Veterinary Research* 29: 187–195.
- Graczyk T.K., Cranfield M.R., Fayer R.** 1998: Oocysts of *Cryptosporidium* from snakes are not infectious to ducklings but retain viability after intestinal passage through a refractory host. *Veterinary Parasitology* 77: 33–40.
- Guo F.G., Zhang H.L., McNair N.N., Mead J.R., Zhu G.** 2018: The existing drug vorinostat as a new lead against cryptosporidiosis by targeting the parasite histone deacetylases. *Journal of Infectious Diseases* 217: 1110–1117.
- Guo Y., Cebelinski E., Matusevich C., Alderisio K.A., Lebbad M., McEvoy J., Roellig D.M., Yang C., Feng Y., Xiao L.** 2015: Subtyping novel zoonotic pathogen *Cryptosporidium* chipmunk genotype I. *Journal of Clinical Microbiology* 53: 1648–1654.
- Guy R.A., Yanta C.A., Muchaal P.K., Rankin M.A., Thivierge K., Lau R., Boggild A.K.** 2021: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Ontario, Canada. *Parasites & Vectors* 14: 69.
- Hamalainen S., Fey K., Selonen V.** 2018: Habitat and nest use during natal dispersal of the urban red squirrel (*Sciurus vulgaris*). *Landscape and Urban Planning* 169: 269–275.
- Hamdan N.E., Ng Y.L., Lee W.B., Tan C.S., Khan F.A., Chong Y.L.** 2017: Rodent Species Distribution and Hantavirus Seroprevalence in Residential and Forested areas of Sarawak, Malaysia. *Tropical Life Sciences Research* 28: 151–159.
- Hassan E.M., Ormeci B., DeRosa M.C., Dixon B.R., Sattar S.A., Iqbal A.** 2021: A review of *Cryptosporidium* spp. and their detection in water. *Water Science and Technology* 83: 1–25.
- Hijjawi N., Estcourt A., Yang R., Monis P., Ryan U.** 2010: Complete development and multiplication of *Cryptosporidium hominis* in cell-free culture. *Veterinary Parasitology* 169: 29–36.

- Hijjawi N.S., Meloni B.P., Ng'anzo M., Ryan U.M., Olson M.E., Cox P.T., Monis P.T., Thompson R.C.** 2004: Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology* 34: 769–777.
- Hlavsa M.C., Aluko S.K., Miller A.D., Person J., Gerdes M.E., Lee S., Laco J.P., Hannapel E.J., Hill V.R.** 2021: Outbreaks associated with treated recreational water - United States, 2015-2019. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 70: 733–738.
- Hlavsa M.C., Cikesh B.L., Roberts V.A., Kahler A.M., Vigar M., Hilborn E.D., Wade T.J., Roellig D.M., Murphy J.L., Xiao L., Yates K.M., Kunz J.M., Arduino M.J., Reddy S.C., Fullerton K.E., Cooley L.A., Beach M.J., Hill V.R., Yoder J.S.** 2018: Outbreaks associated with treated recreational water - United States, 2000-2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 67: 547–551.
- Holubová N., Sak B., Hlášková L., Květoňová D., Hanzal V., Rajský D., Rost M., McEvoy J., Kváč M.** 2018: Host specificity and age-dependent resistance to *Cryptosporidium avium* infection in chickens, ducks and pheasants. *Experimental Parasitology* 191: 62–65.
- Holubová N., Sak B., Schulzová T., Konečný R., Rost M., Tůmová L., McEvoy J., Kváč M.** 2020a: A chicken embryo model for the maintenance and amplification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium baileyi* oocysts. *European Journal of Protistology* 75: 125718.
- Holubová N., Tůmová L., Sak B., Hejzlerová A., Konečný R., McEvoy J., Kváč M.** 2020b: Description of *Cryptosporidium ornithophilus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) as a new species and diversity in farmed ostriches. *Parasites & Vectors* 13: 340.
- Horčíčková M., Čondlová S., Holubová N., Sak B., Květoňová D., Hlášková 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: 220–233.
- Huang B.Q., Chen X.M., LaRusso N.F.** 2004: *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro: A morphologic study. *Journal of Parasitology* 90: 212–221.

- Huang Y., Chen Y., Liu Y., Mi R., Han X., Gong H., Cheng L., Chen Z.** 2022: Isolation and identification of sporozoite membrane protein of *Cryptosporidium parvum* and evaluation of calmodulin-like protein immune protection. *Parasite Immunology*: e12937.
- Hůrková L., Hajdušek O., Modrý D.** 2003: Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. *Journal of Wildlife Diseases* 39: 441–444.
- Chai Y., Deng L., Liu H., Yao J., Zhong Z., Xiang L., Fu H., Shen L., Zhou Z., Deng J., Hu Y., Peng G.** 2019: First detection of *Cryptosporidium* spp. in red-bellied tree squirrels (*Callosciurus erythraeus*) in China. *Parasite* 26: 28.
- Chao A.T., Lee B.H., Wan K.F., Selva J., Zou B., Gedeck P., Beer D.J., Diagana T.T., Bonamy G.M.C., Manjunatha U.H.** 2018: Development of a cytopathic effect-based phenotypic screening assay against *Cryptosporidium*. *Acs Infectious Diseases* 4: 635–645.
- Chappell C.L., Okhuysen P.C., Langer-Curry R.C., Lupo P.J., Widmer G., Tzipori S.** 2015: *Cryptosporidium muris*: infectivity and illness in healthy adult volunteers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 92: 50–55.
- Chappell C.L., Okhuysen P.C., Sterling C.R., DuPont H.L.** 1996: *Cryptosporidium parvum*: Intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *Journal of Infectious Diseases* 173: 232–236.
- Chavez M.A., White A.C., Jr.** 2018: Novel treatment strategies and drugs in development for cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 16: 655–661.
- Chen J., Wang W., Lin Y., Sun L., Li N., Guo Y., Kvac M., Ryan U., Feng Y., Xiao L.** 2021: Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. from pet rodents indicate high zoonotic potential of pathogens from chinchillas. *One Health* 13: 100269.
- Iseki M.** 1986: Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Japanese Journal of Parasitology*: 251–256.
- Jalovecká M., Sak B., Kváč M., Květoňová D., Kučerová Z., Salát J.** 2010: Activation of protective cell-mediated immune response in gastric mucosa during *Cryptosporidium muris* infection and re-infection in immunocompetent mice. *Parasitology Research* 106: 1159–1166.

- Jellison K.L., Lynch A.E., Ziemann J.M.** 2009: Source tracking identifies deer and geese as vectors of human-infectious *Cryptosporidium* genotypes in an urban/suburban watershed. *Environmental Science & Technology* 43: 4267–4272.
- Jenkins V.A., Silbernagl G., Baer L.R., Hoet B.** 2022: The epidemiology of infectious diseases in Europe in 2020 versus 2017-2019 and the rise of tick-borne encephalitis (1995-2020). *Ticks and Tick-Borne Diseases* 13: 101972.
- Ježková J., Horčíčková M., Hlásková L., Sak B., Květoňová D., Novák J., Hofmannová L., McEvoy J., Kváč M.** 2016: *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium* tortoise genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitologica* 63.
- Ježková J., Limpouchová Z., Prediger J., Holubová N., Sak B., Konečný R., Květoňová D., Hlásková L., Rost M., McEvoy J., Rajský D., Feng Y.Y., Kváč M.** 2021a: *Cryptosporidium myocastoris* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae), the Species Adapted to the Nutria (*Myocastor coypus*). *Microorganisms* 9.
- Ježková J., Prediger J., Holubová N., Sak B., Konečný R., Feng Y., Xiao L., Rost M., McEvoy J., Kváč M.** 2021b: *Cryptosporidium ratti* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in the Czech Republic. *Parasitology* 148: 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.
- Jokipii L., Jokipii A.M.M.** 1986: Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *New England Journal of Medicine* 315: 1643–1647.
- Jumani R.S., Bessoff K., Love M.S., Miller P., Stebbins E.E., Teixeira J.E., Campbell M.A., Meyers M.J., Zambriski J.A., Nunez V., Woods A.K., McNamara C.W., Huston C.D.** 2018: A Novel Piperazine-Based Drug Lead for Cryptosporidiosis from the Medicines for Malaria Venture Open-Access Malaria Box. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
- Kaiser R.** 2008: Tick-borne encephalitis. *Infectious Disease Clinics of North America* 22: 561–575.
- Khan S.M., Garcia Hernandez A., Allaie I.M., Grooms G.M., Li K., Witola W.H., Stec J.** 2022: Activity of (1-benzyl-4-triazolyl)-indole-2-carboxamides

- against *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 19: 6–20.
- Khodakevich L., Jezek Z., Kinzanzka K.** 1986: Isolation of monkeypox virus from wild squirrel infected in nature. Lancet 1: 98–99.
- King J.L., Sue M.C., Muchlinski A.E.** 2010: Distribution of the Eastern fox squirrel (*Sciurus Niger*) in Southern California. Southwestern Naturalist 55: 42–49.
- Kotloff K.L., Blackwelder W.C., Nasrin D., Nataro J.P., Farag T.H., van Eijk A., Adegbola R.A., Alonso P.L., Breiman R.F., Faruque A.S.G., Saha D., Sow S.O., Sur D., Zaidi A.K.M., Biswas K., Panchalingam S., Clemens J.D., Cohen D., Glass R.I., Mintz E.D., Sommerfelt H., Levine M.M.** 2012: The global enteric multicenter study (GEMS) of diarrheal disease in infants and young children in developing countries: epidemiologic and clinical methods of the case/control study. Clinical Infectious Diseases 55: S232–S245.
- Krbková L., Vodicková K., Pellarová H., Bednářová J., Cápová I.** 2007: Oční postizení borreliové etiologie [Eye involvement of borrelia aetiology]. Klin Mikrobiol Infekc Lek. 13: 122–125.
- Krichbaum K., Mahan C.G., Steele M.A., Turner G., Hudson P.J.** 2010: The potential role of *Strongyloides robustus* on parasite-mediated competition between two species of flying squirrels (*Glaucomys*). Journal of Wildlife Diseases 46: 229–235.
- Kváč M., Havrdová N., Hlasková L., Daňková T., Kanděra J., Ježková J., Vítovec J., Sak B., Ortega Y., Xiao L., Modry D., Chelladurai J.R., Prantlová V., McEvoy J.** 2016: *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. PLoS One 11: e0147090.
- Kváč M., Hofmannová L., Bertolino S., Wauters L., Tosi G., Modrý D.** 2008: Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. Folia Parasitologica 55: 95–99.
- Kváč M., Hofmannová L., Hlásková L., Květoňová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B.** 2014a: *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. Veterinary Parasitology 201: 9–17.

- Kváč M., Kestřánová M., Květoňová D., Kotková M., Ortega Y., McEvoy J., Sak B.** 2012: *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Experimental Parasitology* 131: 107–110.
- Kváč M., Kestřánová M., Pinková M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B.** 2013a: *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology* 191: 218–227.
- Kváč M., McEvoy J., Loudová M., Stenger B., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Rašková V., Moriarty E., Rost M., Macholán M., Piálek J.** 2013b: Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *International Journal for Parasitology* 43: 805–817.
- Kváč M., McEvoy J., Stenger B., Clark M.** 2014b: Cryptosporidiosis in other vertebrates. In: S.M. Cacciò and G. Widmer (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, Wien, pp. 237–326.
- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Secor W.E.** 2009: Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Veterinary Parasitology* 163: 33–38.
- Langkop C.W., Austin C., Dworkin M., Kelly K., Messersmith H., Teclaw R., Howell J., Michael J., Pontones P., Pezzino G., Hansen G.R., Wegner M.V., Kazmierczak J.J., Williams C., Croft D.R., Ahrabi-Fard S., Will L., Bostrom H.H., Davis J.P., Fleischauer A., Sotir M., Huhn G., Kanwal R., Kile J., Sejvar J.** 2003: Update: Multistate outbreak of monkeypox - Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003 (Reprinted from MMWR, vol 52, pg 561-564, 2003). *Jama-Journal of the American Medical Association* 290: 325–327.
- LaZerte S.E., Kramer D.L.** 2016: Activity of eastern chipmunks (*Tamias striatus*) during the summer and fall. *Canadian Journal of Zoology* 94: 685–695.
- Lebbad M., Beser J., Insulander M., Karlsson L., Mattsson J.G., Svenungsson B., Axen C.** 2013: Unusual cryptosporidiosis cases in Swedish patients: extended molecular characterization of *Cryptosporidium viatorum* and *Cryptosporidium* chipmunk genotype I. *Parasitology* 140: 1735–1740.

- Lebbad M., Winiecka-Krusnell J., Stensvold C.R., Beser J.** 2021: High Diversity of *Cryptosporidium* Species and Subtypes Identified in Cryptosporidiosis Acquired in Sweden and Abroad. *Pathogens* 10: 523.
- Lee M.Y., Lissovsky A.A., Park S.K., Obolenskaya E.V., Dokuchaev N.E., Zhang Y.P., Yu L., Kim Y.J., Voloshina I., Myslenkov A., Choi T.Y., Min M.S., Lee H.** 2008: Mitochondrial cytochrome b sequence variations and population structure of Siberian chipmunk (*Tamias sibiricus*) in Northeastern Asia and population substructure in South Korea. *Molecules and Cells* 26: 566–575.
- Leoni F., Amar C., Nichols G., Pedraza-Diaz S., McLauchlin J.** 2006: Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology* 55: 703–707.
- Li F., Zhang Z., Hu S., Zhao W., Zhao J., Kvac M., Guo Y., Li N., Feng Y., Xiao L.** 2020: Common occurrence of divergent *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* subtypes in farmed bamboo rats (*Rhizomys sinensis*). *Parasites & Vectors* 13: 149.
- Li N., Xiao L., Alderisio K., Elwin K., Cebelinski E., Chalmers R., Santin M., Fayer R., Kvac 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 Q., Li L., Tao W., Jiang Y., Wan Q., Lin Y., Li W.** 2016: Molecular investigation of *Cryptosporidium* in small caged pets in northeast China: host specificity and zoonotic implications. *Parasitology Research* 115: 2905–2911.
- Li X., Pereira M., Larsen R., Xiao C., Phillips R., Striby K., McCowan B., Atwill E.R.** 2015: *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife* 4: 343–350.
- Loeck B.K., Pedati C., Iwen P.C., McCutchen E., Roellig D.M., Hlavsa M.C., Fullerton K., Safranek T., Carlson A.V.** 2020: Genotyping and Subtyping *Cryptosporidium* To Identify Risk Factors and Transmission Patterns - Nebraska, 2015-2017. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 69: 335–338.
- Love M.S., Choy R.K.M.** 2021: Emerging treatment options for cryptosporidiosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 34: 455–462.

- Luka G., Samiei E., Tasnim N., Dalili A., Najjaran H., Hoorfar M.** 2022: Comprehensive review of conventional and state-of-the-art detection methods of *Cryptosporidium*. *Journal of Hazardous Materials* 421: 126714.
- Ly C., Zhang L., Wang R., Jian F., Zhang S., Ning C., Wang H., Feng C., Wang X., Ren X., Qi M., Xiao L.** 2009: *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in China: prevalence and molecular characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7692–7699.
- Mackenzie W.R., Hoxie N.J., Proctor M.E., Gradus M.S., Blair K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addiss D.G., Fox K.R., Rose J.B., Davis J.P.** 1994: A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted through the Public Water-Supply. *New England Journal of Medicine* 331: 161–167.
- Masuda A., Wada M., Saho H., Tokunaga K., Kikuchi Y., Yamasaki F., Matsumoto J.** 2021: Prevalence and molecular characterization of the zoonotic enteric protozoans *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi*, and *Blastocystis* from Pallas's squirrels (*Callosciurus erythraeus*) in Kanagawa prefecture, Japan. *Microbiology Spectrum* 9: e0099021.
- Melicherová J., Ilgova J., Kváč M., Sak B., Koudela B., Valigurová A.** 2014: Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology* 141: 287–303.
- Melman S.D., Ettestad P.E., VinHatton E.S., Ragsdale J.M., Takacs N., Onischuk L.M., Leonard P.M., Master S.S., Lucero V.S., Kingry L.C., Petersen J.M.** 2018: Human case of bubonic plague resulting from the bite of a wild Gunnison's prairie dog during translocation from a plague-endemic area. *Zoonoses and Public Health* 65: e254–e258.
- Mohamed M.A., Hammam H.M., El-Taweel H.A., Abd El-Latif N.F.** 2022: *Cryptosporidium* species in HIV patients in Alexandria, Egypt: distribution and associated clinical findings. *Tropical Biomedicine* 39: 108–116.
- Morgan U.M., Sturdee A.P., Singleton G., Gomez M.S., Gracenea M., Torres J., Hamilton S.G., Woodside D.P., Thompson R.C.** 1999: The *Cryptosporidium* "mouse" genotype is conserved across geographic areas. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1302–1305.

- Mori E., Pisanu B., Zozzoli R., Solano E., Olivieri E., Sassera D., Montagna M.** 2018: Arthropods and associated pathogens from native and introduced rodents in Northeastern Italy. *Parasitology Research* 117: 3237–3243.
- Murakoshi F., Fukuda Y., Matsubara R., Kato Y., Sato R., Sasaki T., Tada C., Nakai Y.** 2013: Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Veterinary Parasitology* 196: 184–188.
- Mwalimu C.D., Mgode G., Sabuni C., Msigwa F., Mghamba J., Nyanga A., Mohamed A., Kwesi E., Nagu N., Kishimba R., John L., Manzo S., Boay M., Mleli J., Lutambi J., Mwingira V.S., Subi L., Kweka E.J., Kilonzo B.** 2022: Preliminary investigation and intervention of the suspected plague outbreak in Madunga, Babati District-Tanzania. *Acta Tropica* 233: 106566.
- Nakamura A.A., Meireles M.V.** 2015: *Cryptosporidium* infections in birds--a review. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 24: 253–267.
- Ng-Hublin J.S., Singleton G.R., Ryan U.** 2013: Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rats and mice from rural communities in the Philippines. *Infection Genetics and Evolution* 16: 5–12.
- Nowak R.M.** (Ed.) 2018: Walker's Mammals of the World: Monotremes, Marsupials, Afrotherians, Xenarthrans, and Sundatherians. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1–757 pp.
- O'Donoghue P.J.** 1995: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology* 25: 139–195.
- O'Hara S.P., Huang B.Q., Chen X.M., Nelson J., Larusso N.F.** 2005: Distribution of *Cryptosporidium parvum* sporozoite apical organelles during attachment to and internalization by cultured biliary epithelial cells. *Journal of Parasitology* 91: 995–999.
- Okhuysen P.C., Chappell C.L., Crabb J.H., Sterling C.R., DuPont H.L.** 1999: Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1275–1281.
- Ong C.S., Eisler D.L., Alikhani A., Fung V.W., Tomblin J., Bowie W.R., Isaac-Renton J.L.** 2002: Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. *Emerging Infectious Diseases* 8: 263–268.

- Ortiz J.J., Ayoub A., Gargala G., Chegne N.L., Favennec L.** 2001: Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. *Aliment Pharmacol Ther* 15: 1409–1415.
- Owings D.H., Borchert M., Virginia R.** 1977: Behavior of California Ground Squirrels. *Animal Behaviour* 25: 221–230.
- Padgett K.A., Reisen W.K., Kahl-Purcell N., Fang Y., Cahoon-Young B., Carney R., Anderson N., Zucca L., Woods L., Husted S., Kramer V.L.** 2007: West Nile virus infection in tree squirrels (Rodentia: Sciuridae) in California, 2004-2005. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 810–813.
- Palmer C.J., Xiao L., Terashima A., Guerra H., Gotuzzo E., Saldias G., Bonilla J.A., Zhou L., Lindquist A., Upton S.J.** 2003: *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Peru. *Emerging Infectious Diseases* 9: 1174–1176.
- Pane S., Putignani L.** 2022: *Cryptosporidium*: Still Open Scenarios. *Pathogens* 11: 515.
- Pavlásek I.** 2001: Findings of cryptosporidia in the stomach of hens and of exotic and wild birds. *Veterinářství (Czech)* 51: 103–108.
- Pereira M., Li X., McCowan B., Phillips R.L., Atwill E.R.** 2010: Multiple unique *Cryptosporidium* isolates from three species of ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*, *S. beldingi*, and *S. lateralis*) in California. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 8269–8276.
- 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.
- Petry F.** 2004: Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microscopy and Microanalysis* 10: 586–601.
- Petry F., Harris J.R.** 1999: Ultrastructure, fractionation and biochemical analysis of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *International Journal for Parasitology* 29: 1249–1260.

- Pisano S.R.R., Kittl S., Eulenberger U., Jores J., Origgi F.C.** 2021: Natural infection of a European red squirrel (*Sciurus vulgaris*) with *Francisella tularensis* subsp. holarctica. *Journal of Wildlife Diseases* 57: 970–973.
- Pisanu B., Lebailleur L., Chapuis J.L.** 2009: Why do Siberian chipmunks *Tamias sibiricus* (Sciuridae) introduced in French forests acquired so few intestinal helminth species from native sympatric murids? *Parasitology Research* 104: 709–714.
- Pisanu B., Marmet J., Beaucournu J.C., Chapuis J.L.** 2008: [Fleas community in introduced Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus* Laxmann) in Forest of Senart, France]. *Parasite* 15: 35–43.
- 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.
- Prediger J., Ježková J., Holubová N., Sak B., Konečný R., Rost M., McEvoy J., Rajský D., Kváč M.** 2021: *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Eurasian Red Squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Microorganisms* 9: 2050.
- Putignani L., Menichella D.** 2010: Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2010: 753512.
- Rahelinirina S., Harimalala M., Rakotoniaina J., Randriamanantsoa M.G., Dentinger C., Zohdy S., Girod R., Rajerison M.** 2022: Tracking of Mammals and Their Fleas for Plague Surveillance in Madagascar, 2018-2019. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 106: 1601–1609.
- Randolph S.E.** 2008: Tick-borne encephalitis incidence in Central and Eastern Europe: consequences of political transition. *Microbes and Infection* 10: 209–216.
- Reghaissia N., Maxamhud S., Laatamna A., Samari H., Dahmane A., Berima R., Abdelli A., Hakem A., Baroudi D., Tsaousis A.D.** 2022: First epidemiological report on the prevalence and associated risk factors of *Cryptosporidium* spp. in farmed marine and wild freshwater fish in Central and Eastern of Algeria. *Acta Parasitologica*: in press.

- Rengifo-Herrera C., Ortega-Mora L.M., Gomez-Bautista M., Garcia-Moreno F.T., Garcia-Parraga D., Castro-Urda J., Pedraza-Diaz S.** 2011: Detection and characterization of a *Cryptosporidium* isolate from a southern elephant seal (*Mirounga leonina*) from the Antarctic peninsula. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 1524–1527.
- Rhee J.K., So W.S., Kim H.C.** 1999: Age-dependent resistance to *Cryptosporidium muris* (strain MCR) infection in golden hamsters and mice. *The Korean Journal of Parasitology* 37: 33–37.
- Robertson L.J., Björkman C., Axén C., Fayer R.** 2014: Cryptosporidiosis in Farmed Animals. In: S.M. Cacciò and G. Widmer (Eds.), *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer, pp. 149–236.
- Robinson G., Elwin K., Chalmers R.M.** 2008: Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1800–1802.
- Romeo C., Ferrari N., Lanfranchi P., Saino N., Santicchia F., Martinoli A., Wauters L.A.** 2015: Biodiversity threats from outside to inside: effects of alien grey squirrel (*Sciurus carolinensis*) on helminth community of native red squirrel (*Sciurus vulgaris*). *Parasitology Research* 114: 2621–2628.
- Romeo C., Ferrari N., Ross C., Everest D.J., Grierson S.S., Lanfranchi P., Martinoli A., Saino N., Wauters L.A., Hauffe H.C.** 2014a: Ljungan virus and an adenovirus in Italian squirrel populations. *Journal of Wildlife Diseases* 50: 409–411.
- Romeo C., Lecollinet S., Caballero J., Isla J., Luzzago C., Ferrari N., Garcia-Bocanegra I.** 2018: Are tree squirrels involved in the circulation of flaviviruses in Italy? *Transboundary and Emerging Diseases* 65: 1372–1376.
- Romeo C., Pisanu B., Ferrari N., Basset F., Tillon L., Wauters L.A., Martinoli A., Saino N., Chapuis J.L.** 2013: Macroparasite community of the Eurasian red squirrel (*Sciurus vulgaris*): poor species richness and diversity. *Parasitology Research* 112: 3527–3536.
- Romeo C., Wauters L.A., Ferrari N., Lanfranchi P., Martinoli A., Pisanu B., Preatoni D.G., Saino N.** 2014b: Macroparasite fauna of alien grey squirrels (*Sciurus carolinensis*): composition, variability and implications for native species. *PLoS One* 9: e88002.

- Rossignol J.F.** 1998: Parasitic gut infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* 11: 597–600.
- Roth J.D., Dobson F.S., Neuhaus P., Abebe A., Barra T., Boonstra R., Edwards P.D., Gonzalez M.A., Hammer T.L., Harscouet E., McCaw L.K., Mann M., Palme R., Tissier M., Uhlrich P., Saraux C., Viblanc V.A.** 2022: Territorial scent-marking effects on vigilance behavior, space use, and stress in female Columbian ground squirrels. *Hormones and Behavior* 139: 105111.
- Roy A.N., Straub M.H., Stephenson N., Sholty K.E., Foley J.** 2017: Distribution and diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato group bacteria in sciurids of California. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 17: 735–742.
- Ruecker N.J., Matsune J.C., Wilkes G., Lapen D.R., Topp E., Edge T.A., Sensen C.W., Xiao L., Neumann N.F.** 2012: Molecular and phylogenetic approaches for assessing sources of *Cryptosporidium* contamination in water. *Water Research* 46: 5135–5150.
- Ryan U., Read C., Hawkins P., Warnecke M., Swanson P., Griffith M., Deere D., Cunningham M., Cox P.** 2005: Genotypes of *Cryptosporidium* from Sydney water catchment areas. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1221–1229.
- Sainsbury A.W., Nettleton P., Gilray J., Gurnell J.** 2000: Grey squirrels have high seroprevalence to a parapoxvirus associated with deaths in red squirrels. *Animal Conservation* 3: 229–233.
- Sambyal D.S., Sharma V.K.** 1972: Screening of free-living animals and birds for *Listeria*, *Brucella* and *Salmonella* infections. *The British Veterinary Journal* 128: 50–55.
- Santicchia F., Dantzer B., van Kesteren F., Palme R., Martinoli A., Ferrari N., Wauters L.A.** 2018: Stress in biological invasions: Introduced invasive grey squirrels increase physiological stress in native Eurasian red squirrels. *Journal of Animal Ecology* 87: 1342–1352.
- Sato H., Torii H., Une Y., Ooi H.K.** 2007: A new rhabditoid nematode species in Asian sciurids, distinct from *Strongyloides robustus* in North American sciurids. *Journal of Parasitology* 93: 1476–1486.
- Siracusa E.R., Wilson D.R., Studd E.K., Boutin S., Humphries M.M., Dantzer B., Lane J.E., McAdam A.G.** 2019: North American red squirrels mitigate costs of territory defence through social plasticity. *Animal Behaviour* 151: 29–42.

- Smith N.H., Cron S., Valdez L.M., Chappell C.L., White A.C., Jr.** 1998: Combination drug therapy for cryptosporidiosis in AIDS. *The Journal of Infectious Diseases* 178: 900–903.
- Soba B., Petrovec M., Mioc V., Logar J.** 2006: Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *Clinical Microbiology and Infection* : 12: 918–921.
- Sponseller J.K., Griffiths J.K., Tzipori S.** 2014: The evolution of respiratory cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clinical Microbiology Reviews* 27: 575–586.
- Sreter T., Varga I., Bekesi L.** 1995: Age-dependent resistance to *Cryptosporidium baileyi* infection in chickens. *Journal of Parasitology* 81: 827–829.
- Stebbins E., Jumaní R.S., Klopfer C., Barlow J., Miller P., Campbell M.A., Meyers M.J., Griggs D.W., Huston C.D.** 2018: Clinical and microbiologic efficacy of the piperazine-based drug lead MMV665917 in the dairy calf cryptosporidiosis model. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12: e0006183.
- Stenger B.L., Clark M.E., Kváč M., Khan E., Giddings C.W., Dyer N.W., Schultz J.L., McEvoy J.M.** 2015a: Highly divergent 18S rRNA gene paralogs in a *Cryptosporidium* genotype from eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Infection Genetics and Evolution* 32: 113–123.
- Stenger B.L., Clark M.E., Kváč M., Khan E., Giddings C.W., Prediger J., McEvoy J.M.** 2015b: North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes. *Infection Genetics and Evolution* 36: 287–293.
- Stenger B.L.S., Horčíčková M., Clark M.E., Kváč M., Čondlová S., Khan E., Widmer G., Xiao L., Giddings C.W., Pennil C., Stanko M., Sak B., McEvoy J.M.** 2017: *Cryptosporidium* infecting wild cricetid rodents from the subfamilies Arvicolinae and Neotominae. *Parasitology*: 1–9.
- Striepen B.** 2013: Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature* 503: 189–191.
- Sundberg J.P., Hill D., Ryan M.J.** 1982: Cryptosporidiosis in a gray squirrel. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 181: 1420–1422.

- Sunnotel O., Lowery C.J., Moore J.E., Dooley J.S., Xiao L., Millar B.C., Rooney P.J., Snelling W.J.** 2006: *Cryptosporidium*. Letters in Applied Microbiology 43: 7–16.
- SZÚ** (Ed.) 2021a: Lymeská borrelióza - základní informace. <http://www.szu.cz/tema/prevence/lymeska-borrelioza-zakladni-informace>
- SZÚ** 2021b. Tick-borne encephalitis in the Czech Republic in 2020 (Zprávy CEM (SZÚ, Praha)), pp. 236–245.
- Taha S., Elmalik K., Bangoura B., Lendner M., Mossaad E., Dauschies A.** 2017: Molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* isolated from diarrheic calves in the Sudan. Parasitology Research 116: 2971–2979.
- Tang D., Duan R., Chen Y., Liang J., Zheng X., Qin S., Bukai A., Lu X., Xi J., Lv D., He Z., Wu W., Xiao M., Jing H., Wang X.** 2022: Plague Outbreak of a *Marmota himalayana* Family Emerging from Hibernation. Vector Borne and Zoonotic Diseases: in press.
- Tangtrongsup S., Scorza A.V., Reif J.S., Ballweber L.R., Lappin M.R., Salman M.D.** 2020: Seasonal distributions and other risk factors for *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. infections in dogs and cats in Chiang Mai, Thailand. Preventive Veterinary Medicine 174: 104820.
- Tanriverdi S., Arslan M.O., Akiyoshi D.E., Tzipori S., Widmer G.** 2003: Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. Molecular and Biochemical Parasitology 130: 13–22.
- Tanriverdi S., Blain J.C., Deng B., Ferdig M.T., Widmer G.** 2007: Genetic crosses in the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum* define recombination parameters. Molecular Microbiology 63: 1432–1439.
- Teangana D.O., Reilly S., Montgomery W.I., Rochford J.** 2000: Distribution and status of the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) and grey squirrel (*Sciurus carolinensis*) in Ireland. Mammal Review 30: 45–55.
- Tetley L., Brown S.M.A., McDonald V., Coombs G.H.** 1998: Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. Microbiology-SGM 144: 3249–3255.
- Thomas K., Tompkins D.M., Sainsbury A.W., Wood A.R., Dalziel R., Nettleton P.F., McInnes C.J.** 2003: A novel poxvirus lethal to red squirrels (*Sciurus vulgaris*). Journal of General Virology 84: 3337–3341.

- 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.
- Thorington R.W., Koprowski J.L., Steele M.A., Wharton J.F. (Eds.)** 2012: *Squirrels of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 472 pp.
- Tompkins D.M., Begon M.** 1999: Parasites can regulate wildlife populations. *Parasitology Today* 15: 311–313.
- Trotz-Williams L.A., Jarvie B.D., Peregrine A.S., Duffield T.F., Leslie K.E.** 2011: Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. *The Veterinary Record* 168: 509.
- Trotz-Williams L.A., Martin D.S., Gatei W., Cama V., Peregrine A.S., Martin S.W., Nydam D.V., Jamieson F., Xiao L.** 2006: Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitology Research* 99: 346–352.
- 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.
- 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.** 1907: A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 5: 12.
- Valigurová A., Hofmannová L., Koudela B., Vávra J.** 2007: An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 495–510.
- Vetterling J.M., Jervis H.R., Merrill T.G., Sprinz H.** 1971a: *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *The Journal of Protozoology* 18: 243–247.
- Vetterling J.M., Takeuchi A., Madden P.A.** 1971b: Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. *The Journal of Protozoology* 18: 248–260.
- Voyiatzaki C., Papailia S.I., Venetikou M.S., Pouris J., Tsoumani M.E., Papageorgiou E.G.** 2022: Climate Changes Exacerbate the Spread of *Ixodes ricinus* and the Occurrence of Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis in

- Europe-How Climate Models Are Used as a Risk Assessment Approach for Tick-Borne Diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19: 6516.
- Ward H.D.** 2017: New tools for *Cryptosporidium* lead to new hope for cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology* 33: 662–664.
- Waterman J.M., Archibald A.J.** 2019: Both familiarity and kinship influence odour discrimination by females in a highly social African ground squirrel. *Animal Behaviour* 148: 145–151.
- Wauters L., Tosi G., Gurnell J.** 2005: A review of the competitive effects of alien grey squirrels on behaviour, activity and habitat use of red squirrels in mixed, deciduous woodland in Italy. *Hystrix* 16: 27–40
- Werner A., Sulima P., Majewska A.C.** 2004: [Evaluation of usefulness of different methods for detection of *Cryptosporidium* in human and animal stool samples]. *Wiadomosci Parazytologiczne* 50: 209–220.
- Wilkes G., Ruecker N.J., Neumann N.F., Gannon V.P., Jokinen C., Sunohara M., Topp E., Pintar K.D., Edge T.A., Lapen D.R.** 2013: Spatiotemporal analysis of *Cryptosporidium* species/genotypes and relationships with other zoonotic pathogens in surface water from mixed-use watersheds. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 434–448.
- Wolska-Kusnierz B., Bajer A., Caccio S., Heropolitanska-Pliszka E., Bernatowska E., Socha P., van Dongen J., Bednarska M., Paziewska A., Sinski E.** 2007: *Cryptosporidium* infection in patients with primary immunodeficiencies. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 45: 458–464.
- Xiao L.** 2010: Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology* 124: 80–89.
- Xiao L., Escalante L., Yang C., Sulaiman I., Escalante A.A., Montali R.J., Fayer R., Lal A.A.** 1999a: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1578–1583.
- Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J.** 2004: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 72–97.

- Xiao L., Feng Y.** 2008: Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 52: 309–323.
- Xiao L., Morgan U.M., Fayer R., Thompson R.C., Lal A.A.** 2000: *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitology Today* 16: 287–292.
- Xiao L., Morgan U.M., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Thompson R.C., Fayer R., Lal A.A.** 1999b: Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3386–3391.
- Xiao L., Sulaiman I.M., Ryan U.M., Zhou L., Atwill E.R., Tischler M.L., Zhang X., Fayer R., Lal A.A.** 2002: Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology* 32: 1773–1785.
- Yan W., Alderisio K., Roellig D.M., Elwin K., Chalmers R.M., Yang F., Wang Y., Feng Y., Xiao L.** 2017: Subtype analysis of zoonotic pathogen *Cryptosporidium* skunk genotype. *Infection Genetics and Evolution* 55: 20–25.
- Yokoyama J., Fukuda T., Tsukaya H.** 2003: Morphological and molecular variation in *Mitchella undulata*, with special reference to the systematic treatment of the dwarf form from Yakushima. *Journal of Plant Research* 116: 309–315.
- Zhang L.P., Storey K.B., Yu D.N., Hu Y.Z., Zhang J.Y.** 2016: The complete mitochondrial genome of *Ictidomys tridecemlineatus* (Rodentia: Sciuridae). *Mitochondrial DNA Part A* 27: 2608–2609.
- Zhang Y., Feng J., McManus S.A., Lu H.D., Ristroph K.D., Cho E.J., Dobrijevic E.L., Chan H.K., Prud'homme R.K.** 2017: Design and solidification of fast-releasing clofazimine nanoparticles for treatment of cryptosporidiosis. *Molecular Pharmaceutics* 14: 3480–3488.
- Zhang Z., Su D., Meng X., Liang R., Wang W., Li N., Guo Y., Guo A., Li S., Zhao Z., Xiao L., Feng Y.** 2022: Cryptosporidiosis outbreak caused by *Cryptosporidium parvum* subtype IIdA20G1 in neonatal calves. *Transboundary and Emerging Diseases* 69: 278–285.
- 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.

Zozzoli R., Menchetti M., Mori E. 2018: Spatial behaviour of an overlooked alien squirrel: The case of Siberian chipmunks *Eutamias sibiricus*. *Behavioural Processes* 153: 107–111.

8 PŘÍLOHY

PŘÍLOHA 1

Stenger B.L.S., Clark M.E., Kváč M., Khan E., Giddings C.W., **Prediger J.**, McEvoy J.M. 2015: North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes. *Infection, Genetics and Evolution* 36: 287–293.



North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes

Brianna L.S. Stenger^{a,b,c}, Mark E. Clark^{b,c}, Martin Kváč^{d,e}, Eakalak Khan^{c,f}, Catherine W. Giddings^a, Jitka Prediger^{d,e}, John M. McEvoy^{a,c,*}

^a Department of Veterinary and Microbiological Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND, USA

^b Department of Biological Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND, USA

^c Environmental and Conservation Sciences Program, North Dakota State University, Fargo, ND, USA

^d Institute of Parasitology, Biology Centre of Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic

^e Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

^f Department of Civil and Environmental Engineering, North Dakota State University, Fargo, ND, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2015

Received in revised form 28 September 2015

Accepted 1 October 2015

Available online 5 October 2015

Keywords:

Cryptosporidium

Tree squirrels

Ground squirrels

Host specificity

Zoonotic

ABSTRACT

Wildlife-associated *Cryptosporidium* are an emerging cause of cryptosporidiosis in humans. The present study was undertaken to determine the extent to which North American tree squirrels and ground squirrels host zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes. Fragments of the *Cryptosporidium* 18S rRNA and actin genes were amplified and sequenced from fecal samples obtained from three tree squirrel and three ground squirrel species. In tree squirrels, *Cryptosporidium* was identified in 40.5% (17/42) of American red squirrels (*Tamiasciurus hudsonicus*), 40.4% (55/136) of eastern gray squirrels (*Sciurus carolinensis*), and 28.6% (2/7) of fox squirrels (*Sciurus niger*). Human-pathogenic *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium* skunk genotype were the most prevalent species/genotypes in tree squirrels. Because tree squirrels live in close proximity to humans and are frequently infected with potentially zoonotic *Cryptosporidium* species/genotypes, they may be a significant reservoir of infection in humans. In ground squirrels, *Cryptosporidium* was detected in 70.2% (33/47) of 13-lined ground squirrels (*Ictidomys tridecemlineatus*), 35.1% (27/77) of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*), and the only golden-mantled ground squirrel (*Callospermophilus lateralis*) that was sampled. *Cryptosporidium rubeyi* and ground squirrel genotypes I, II, and III were identified in isolates from these ground squirrel species. In contrast to the *Cryptosporidium* infecting tree squirrels, these species/genotypes appear to be specific for ground squirrels and are not associated with human disease.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cryptosporidium is a genus of apicomplexan parasites that infects the gastrointestinal tract of a broad range of vertebrate species (Fayer, 2010), causing the diarrheal disease cryptosporidiosis. There is no effective drug treatment or vaccine for human cryptosporidiosis, and the disease can become chronic and life threatening in those with an immature or compromised immune system (Kotloff et al., 2013). Preventing infection, by identifying reservoirs and interrupting transmission, is therefore the most effective intervention (Appelbee et al., 2005; Xiao et al., 2002).

Most cases of human cryptosporidiosis are caused by *Cryptosporidium hominis*, a species for which humans are the only major host, and *Cryptosporidium parvum*, a zoonotic species that infects neonatal ruminants and a broad range of mammals in addition to humans. However, wildlife is increasingly recognized as a source of *Cryptosporidium*

infection in humans, and shifting boundaries between wildlife and humans could result in the emergence of novel pathogens. Recent studies have shown that wildlife in the US is a source of *Cryptosporidium* species/genotypes that are emerging causes of human disease, including *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium* chipmunk genotype I (Guo et al., 2015; Li et al., 2014). *C. ubiquitum* infects a broad range of mammals in addition to humans, including other primates, rodents, bovids, cervids, carnivores, and opossums (Chalmers et al., 2011; Cieloszyk et al., 2012; Elwin et al., 2012; Fayer et al., 2010; Feltus et al., 2006; Jellison et al., 2009; Jiang et al., 2005; Li et al., 2014; Robinson et al., 2008). *Cryptosporidium* chipmunk genotype I has a narrower host range, infecting rodents such as chipmunks, squirrels, and deer mice (Feng et al., 2011; Kváč et al., 2008; Lv et al., 2009) in addition to humans (Feltus et al., 2006; Guo et al., 2015; Lebbad et al., 2013).

Squirrels (Sciuridae family) host *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* chipmunk genotype I (Feng et al., 2007; Kváč et al., 2008; Ziegler et al., 2007), and other *Cryptosporidium* genotypes associated with human disease, and because they frequently share habitats with humans they may be a significant reservoir of human infection. Studies on

* Corresponding author at: PO Box 6050, Dept. 7690, Fargo, ND 58108–6050, USA.
E-mail address: john.mcevoy@ndsu.edu (J.M. McEvoy).

Cryptosporidium in tree squirrels (Sciurini tribe) and ground squirrels (Marmotini tribe), whose ancestors diverged 30 million years ago (Mercer and Roth, 2003), have been conducted in the northeast (New York), upper midwest (Minnesota), and southwest (California) US. In New York, eastern gray squirrels (*Sciurus carolinensis*) and American red squirrels (*Tamiasciurus hudsonicus*), members of the tree squirrel tribe, hosted *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* chipmunk genotype I, and *Cryptosporidium* skunk genotype (Feng et al., 2007; Ziegler et al., 2007). The skunk genotype, like *C. ubiquitum* and chipmunk genotype I, has been associated with disease in humans (Elwin et al., 2012; Robinson et al., 2008). At the same location, eastern chipmunks (*Tamias striatus*) and a woodchuck (*Marmota monax*), members of the ground squirrel tribe, also hosted *C. ubiquitum* and chipmunk genotype I. In contrast to the studies in New York, none of the ground squirrel species sampled in Minnesota or California hosted zoonotic *Cryptosporidium* species or genotypes (Atwill et al., 2004; Pereira et al., 2010; Stenger et al., 2015). Eastern chipmunks in Minnesota were primarily infected with *Cryptosporidium* chipmunk genotype II, a genotype for which no other host has been identified (Stenger et al., 2015). Golden-mantled ground squirrels (*Callospermophilus lateralis*), Belding's ground squirrels (*Urocyon beldingi*), and California ground squirrels (*Otospermophilus beecheyi*) in California hosted *Cryptosporidium rubeyi* and a number of genotypes that have been reported only in ground squirrels (Atwill et al., 2004; Li et al., 2015; Pereira et al., 2010).

If eastern gray squirrels and American red squirrels host zoonotic *Cryptosporidium* species/genotypes, and ground squirrels become infected when their ranges overlap those of tree squirrels, we hypothesized that differences in host range could explain the failure to detect zoonotic species/genotypes in ground squirrels in California. Eastern

gray squirrels are found east of the 100th meridian (Fig. 1), apart from small, localized populations in California, and American red squirrels are rarely found west of the Rocky Mountains. We undertook the present study on *Cryptosporidium* infecting tree squirrels and ground squirrels in the upper midwest, an area encompassing the ranges of a number of tree and ground squirrel species. Despite their overlapping ranges, we found that tree squirrels and ground squirrels hosted different *Cryptosporidium* species and genotypes, and that only tree squirrels were a potential reservoir of infection in humans.

2. Materials and methods

2.1. Trapping and sample collection

Fecal samples were collected from eastern gray squirrels (Scca), fox squirrels (*Sciurus niger*; Scni), and American red squirrels (Tahu) in the tree squirrel tribe, and a golden-mantled ground squirrel (Cala), 13-lined ground squirrels (*Ictidomys tridecemlineatus*; Ictr), and black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*; Cylu) in the ground squirrel tribe. Samples were collected between July 2007 and May 2012.

All squirrels, with the exception of black-tailed prairie dogs and the golden-mantled ground squirrel, were live-captured in Sherman box traps or Tomahawk cage traps baited with sunflower seeds and peanut butter. Captured animals were affixed with an ear-tag with a unique identification number used to identify recaptured animals and released in compliance with North Dakota State University Institutional Animal Care and Use policies. Fecal samples from trapped squirrels were collected directly from the trap or from the animal during handling. Fecal samples from black-tailed prairie dogs were collected from the

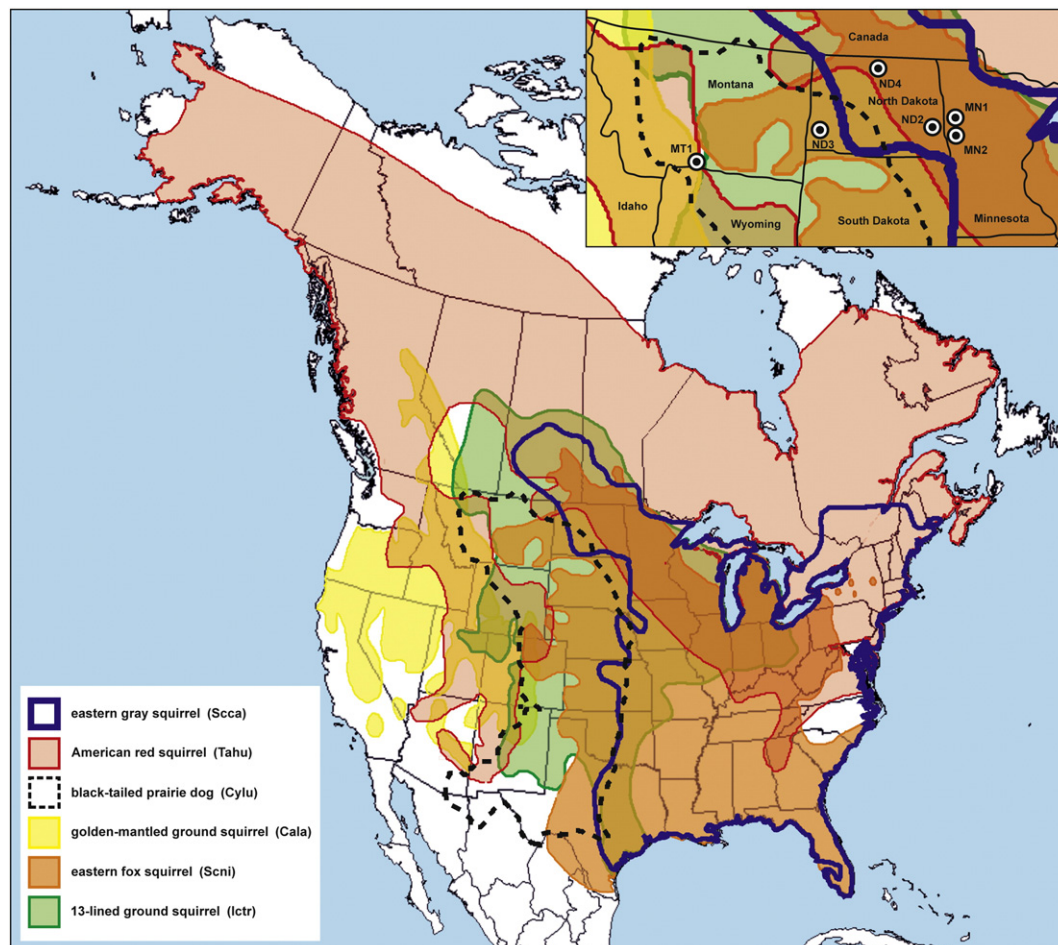


Fig. 1. Sample locations and the North American ranges of the tree squirrel and ground squirrel species sampled in this study.

entrance to burrows. One sample was collected per burrow opening. A fecal sample from a golden-mantled ground squirrel was collected from the ground. All fecal samples were stored at 4 °C prior to DNA extraction.

A map showing the sample locations and the range of each squirrel species sampled in the study is presented in Fig. 1. Gray squirrels and American red squirrels were sampled from two locations in western Minnesota (MN1 and MN2). Fox squirrels also were sampled from MN2. 13-lined ground squirrels were sampled from eastern (ND2) and north central (ND3) North Dakota. The golden-mantled ground squirrel was sampled from south central Montana (MT1), and prairie dogs were sampled from western North Dakota (ND4).

2.2. DNA extraction

DNA was extracted from fecal samples using an alkaline digestion and phenol-chloroform extraction method and purified using a QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) (Feltus et al., 2006; Peng et al., 2003). DNA was stored at –20 °C until used in PCR assays.

2.3. Molecular analyses

A fragment of the *Cryptosporidium* 18S rRNA gene was amplified as described by Xiao et al. (2001), with the exception that a 0.5× buffer concentration was used (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega, Madison, WI). A fragment of the actin gene was amplified as previously described by Sulaiman et al. (2002). A fragment of the gp60 gene was amplified from *C. ubiquitum* isolates using the primers and amplification conditions described by Li et al. (2014). Secondary PCR products were separated on an agarose gel and visualized under UV illumination using SYBR Green or ethidium bromide staining.

Products were purified (Wizard SV, Promega, Madison, WI) and sequenced in both directions with secondary primers using a BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit in an ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Sequences were assembled using SeqMan (DNASTar, Madison, WI), and aligned using the MAFFT version 7 online server with automatic selection of alignment strategy (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato and Standley, 2013). The alignment included published sequences from gastric *Cryptosporidium* species infecting mammals, birds, reptiles, and amphibians; sequences with a high similarity to study sequences using BLAST analysis; and sequences from *Cryptosporidium* genotypes previously reported in squirrels, other rodents, and hosts with a similar range to squirrels sampled in this study. Alignments were manually edited, including trimming at both ends, and phylogenetic analyses were performed using MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Trees were inferred by the Neighbor-joining (NJ) method and distance estimates were based on the Kimura 2-parameter distance model with pairwise deletions. Bootstrap values were determined from 1000 pseudoreplicates (Kimura, 1980; Saitou and Nei, 1987).

Sequences from this study have been deposited in GenBank under the accession numbers KT027431 to KT027549.

2.4. Statistical analyses

Prevalence was calculated by dividing the number of individuals that were PCR positive for the *Cryptosporidium* 18S rRNA gene by the total number of individuals caught. Recaptured squirrels were counted once in the prevalence calculations. Chi-square analysis was used to test for differences in *Cryptosporidium* prevalence between squirrel tribes and individual squirrel species. Statistical analyses were performed using the program R (<http://www.r-project.org/>) (R Development Core Team, 2011) and a p-value ≤0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Prevalence of *Cryptosporidium* in tree squirrels and ground squirrels

The overall prevalence of *Cryptosporidium* in tree squirrels (40.0%; 74/185) and ground squirrels (48.8%; 61/125) was similar ($X^2 = 2.35$, p-value >0.05). In the tree squirrel tribe, *Cryptosporidium* was detected in 40.5% (17/42), 40.4% (55/136), and 28.6% (2/7) of American red squirrels, eastern gray squirrels, and fox squirrels, respectively. In ground squirrels, *Cryptosporidium* was detected in 70.2% (33/47) and 35.1% (27/77) of 13-lined ground squirrels and prairie dogs, respectively. The prevalence in 13-lined ground squirrels was significantly higher than that in prairie dogs ($X^2 = 14.44$, p < 0.001) or any of the tree squirrel species ($X^2 = 13.77$, p < 0.001). *Cryptosporidium* also was detected in the only golden-mantled ground squirrel sampled.

3.2. *Cryptosporidium* diversity in tree and ground squirrels

Isolates from 67/135 (49.6%) *Cryptosporidium* positive animals were genotyped by sequence analysis of the 18S rRNA and/or actin genes. Isolates from the remaining positive animals yielded sequences of insufficient quality to include in analyses. Genotyping was successful for 26/55 *Cryptosporidium* positive gray squirrels, 8/17 positive American red squirrels, 2/2 positive fox squirrels, 12/27 positive prairie dogs, 18/33 positive 13-lined ground squirrels, and 1/1 positive golden-mantled ground squirrels. NJ trees constructed from aligned 18S rRNA (Figs. 2 and S1) and actin (Figs. 3 and S2) sequences were consistent in showing seven major *Cryptosporidium* groups in squirrels. All sequenced isolates are included in phylogenies presented in Figs. S1 and S2; representative isolates from each group are included in Figs. 2 and 3.

Tree squirrel isolates clustered in three groups that were exclusive to tree squirrels in this study and corresponded to known *Cryptosporidium* species and genotypes. *C. ubiquitum* was identified in 19 eastern gray squirrels, six American red squirrels, and two fox squirrels at MN1 and MN2. One gray squirrel was positive for *C. ubiquitum* on three separate occasions during one week (1986-Scca-MN2, 1989-Scca-MN2, and 1996-Scca-MN2; accession nos. KT027448, KT027449, and KT027431, respectively).

Cryptosporidium skunk genotype was identified in four eastern gray squirrels, an American red squirrel, and a fox squirrel at MN1 and MN2. The fox squirrel (1992-Scca-MN2) showed evidence of a mixed infection with *C. ubiquitum* (identified from a sequence of the 18S rRNA gene; accession no. KT027438) and *Cryptosporidium* skunk genotype (identified from a sequence of the actin gene; accession no. KT027546). A gray squirrel (1994-Scca-MN2) also showed evidence of a mixed infection with *C. ubiquitum* (identified from a sequence of the 18S rRNA gene; accession no. KT027453) and *Cryptosporidium* skunk genotype (identified from a sequence of the actin gene; accession no. KT027548).

Cryptosporidium deer mouse genotype III was identified in five eastern gray squirrels and an American red squirrel at MN1. One of the gray squirrels (1929-Scca-MN1) was co-infected with *Cryptosporidium* deer mouse genotype III (identified from a sequence of the 18S rRNA gene; accession no. KT027461) and *C. ubiquitum* (identified from a sequence of the actin gene; accession no. KT027499).

Two *C. ubiquitum* subtypes were identified by gp60 sequence analysis (Figs. 4 and S3), and they were identical to subtypes XIIb and XIIc described by Li et al. (2014). Subtype XIIb was found in three eastern gray squirrels and four American red squirrels at MN1 and MN2. Subtype XIIc was identified in five eastern gray squirrels and a fox squirrel at MN2.

Sequences of the 18S rRNA and actin genes from ground squirrel isolates clustered in four groups. One of the groups included isolates of *C. rubeyi*, a recently described species reported in ground squirrels from California (Li et al., 2015). *Cryptosporidium rubeyi* was identified in 10 black-tailed prairie dogs at ND4 and a golden-mantled ground

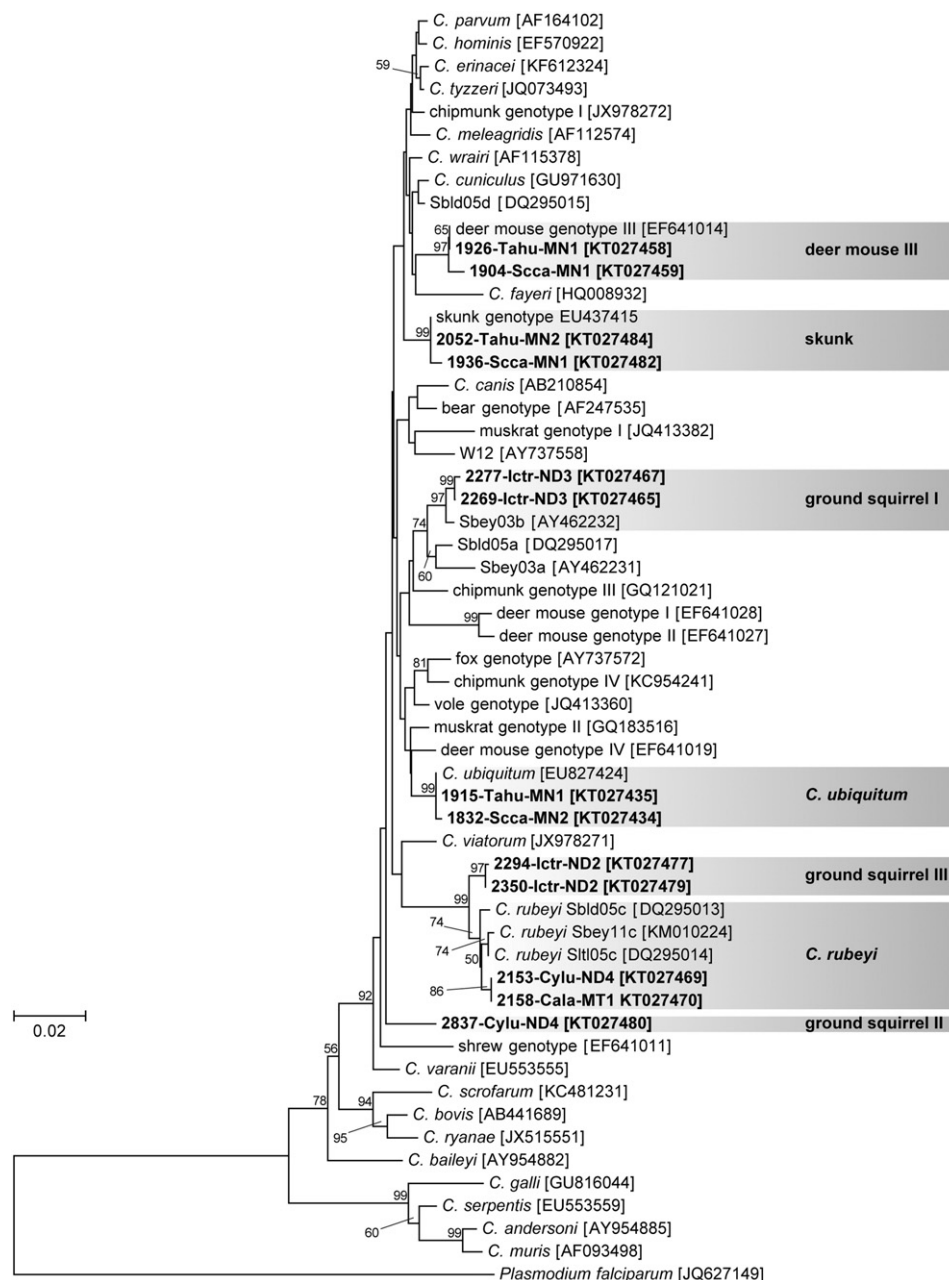


Fig. 2. Phylogenetic relationships of representative *Cryptosporidium* 18S rRNA gene sequences. Isolates are identified by isolate number, abbreviation of host species name (Scca – *Sciurus carolinensis*; Tahu – *Tamiasciurus hudsonicus*; Ictr – *Ictidomys tridecemlineatus*; Cylu – *Cynomys ludovicianus*; Cala – *Callospermophilus lateralis*), and sample location. Clades representing *Cryptosporidium* taxa are identified by shading and labeled. Trees were constructed using a neighbor-joining approach with bootstrapping based on 1000 pseudoreplicates.

squirrel at MT1. At the 18S rRNA locus, *C. rubeyi* isolates from the present study shared 99.6, 99.5, and 99.4% similarity, respectively, with *C. rubeyi* Sbey11c from a California ground squirrel (accession no. KM010224), *C. rubeyi* Sltl05c from a golden-mantled ground squirrel (accession no. DQ295014), and *C. rubeyi* Sbld05c from a Belding's ground squirrel (accession no. DQ295013) (Table 1). At the actin locus, *C. rubeyi* isolates from the present study shared 99.6% similarity with *C. rubeyi* Sbey11c (accession no. KM010227) (Table 1). Actin sequences have not been reported for *C. rubeyi* isolates Sbld05c or Sltl05c.

The other groups infecting ground squirrels in the present study were named *Cryptosporidium* ground squirrel genotypes I, II, and III. Ground squirrel genotype I was identified in eight 13-lined ground squirrels at ND2 and ND3. One animal was positive for ground squirrel genotype I on two consecutive days (2278-Ictr-ND3 and 2269-Ictr-ND3; accession nos. KT027521 and KT027519, respectively), and another was positive for this genotype on three consecutive days

(2484-Ictr-ND2, 2482-Ictr-ND2, and 2488-Ictr-ND2; accession nos. KT027518, KT027522, and KT027523, respectively). Ground squirrel genotype I clustered with isolate Sbey03b (accession no. AY462232) from a California ground squirrel, with a mean sequence similarity of 99.5% at the 18S rRNA locus (Table 1).

Cryptosporidium ground squirrel genotype II, which was identified in a single black-tailed prairie dog at ND4, did not cluster with other ground squirrel genotypes, and was most similar to *Cryptosporidium* muskrat genotype II (accession no. EF641021), sharing 97.6% sequence similarity at the 18S rRNA locus (Table 1).

Ground squirrel genotype III formed a sister group with *C. rubeyi*, sharing 98.7% and 98.2% similarity, respectively, at the 18S rRNA and actin loci (Table 1). Ground squirrel genotype III also shared 99.2% similarity with *C. rubeyi* Sbld05c (accession no. DQ295013) at the 18S rRNA locus (Table 1). This genotype was exclusively found in 13-lined ground squirrels at ND2.

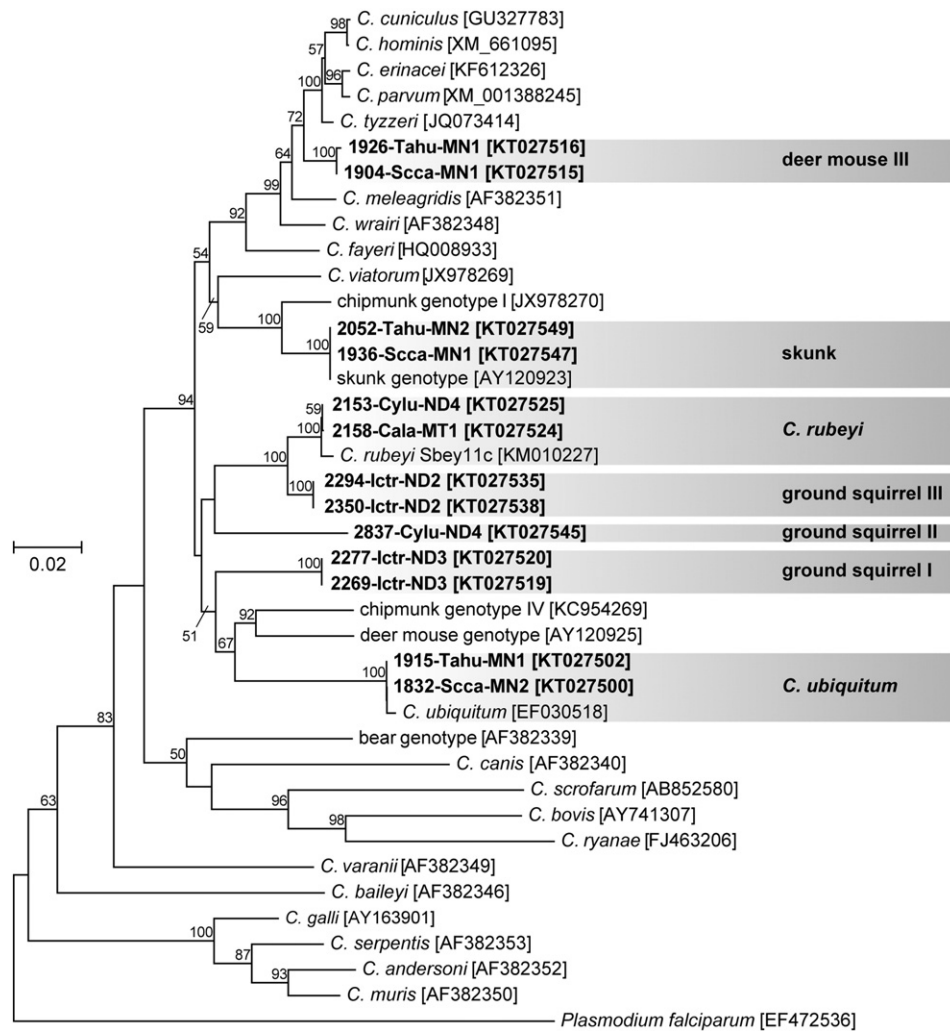


Fig. 3. Phylogenetic relationships of representative *Cryptosporidium* actin gene sequences. Isolates are identified by isolate number, abbreviation of host species name (Scca – *Sciurus carolinensis*; Tahu – *Tamiasciurus hudsonicus*; Ictr – *Ictidomys tridecemlineatus*; Cylu – *Cynomys ludovicianus*; Cala – *Callospermophilus lateralis*), and sample location. Clades representing *Cryptosporidium* taxa are identified by shading and labeled. Trees were constructed using a neighbor-joining approach with bootstrapping based on 1000 pseudoreplicates.

4. Discussion

This study on *Cryptosporidium* spp. infecting North American tree squirrels and ground squirrels has shown that most tree squirrels host zoonotic species and genotypes, and ground squirrels host species and genotypes that are tribe-specific and unlikely to cause human disease.

Tree squirrels were most frequently infected with two *C. ubiquitum* subtypes, XIIb and XIIc, which are known to cause human disease in the US (Li et al., 2014). Subtype XIIb was detected previously in a Verreaux's Sifaka and an eastern chipmunk, while subtype XIIc was isolated from a porcupine and was infectious for a goat under experimental conditions (Li et al., 2014). Although this is the first report of subtypes

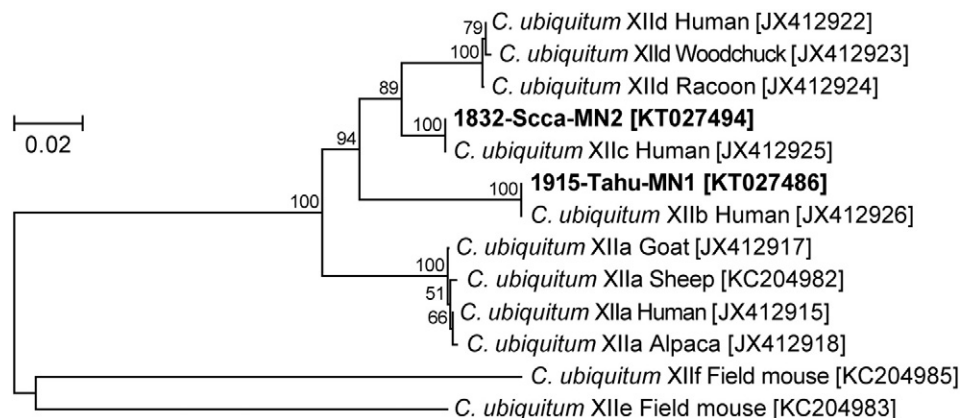


Fig. 4. Phylogenetic relationships of representative *Cryptosporidium ubiquitum* gp60 sequences. Isolates are identified by isolate number, abbreviation of host species name (Scca – *Sciurus carolinensis*; Tahu – *Tamiasciurus hudsonicus*), and sample location. Trees were constructed using a neighbor-joining approach with bootstrapping based on 1000 pseudoreplicates.

Table 1

Mean percent sequence similarity within and between phylogenetic groups and between phylogenetic groups and published GenBank sequences.

Group		No. isolates in group	Mean percent sequence similarity		
			Within group	Between group and other groups in this study	Between group and published sequences in GenBank
18S rRNA	<i>C. ubiquitum</i>	27	99.9	97.4 [Skunk] 97.3 [Ground squirrel I]	99.9 [<i>C. ubiquitum</i> ; EU827424]
	Skunk	4	99.5	97.4 [<i>C. ubiquitum</i>] 97.3 [Deer mouse III]	99.7 [skunk; EU437415]
	Deer mouse III	7	99.3	97.3 [Skunk] 96.7 [Ground squirrel I]	99.7 [deer mouse III; EF641014]
	<i>C. rubeyi</i>	7	100.0	98.7 [Ground squirrel III] 95.9 [Deer mouse III]	99.6 [<i>C. rubeyi</i> ; KM010224] 99.5 [<i>C. rubeyi</i> ; DQ295014] 99.4 [<i>C. rubeyi</i> ; DQ295013]
	Ground squirrel I	4	99.9	97.3 [<i>C. ubiquitum</i>] 97.1 [Skunk]	99.5 [Sbey03b; AY462232]
	Ground squirrel II	1	ND	97.1 [Skunk] 97.0 [<i>C. ubiquitum</i>]	97.6 [muskrat II; GQ183516]
	Ground squirrel III	4	99.9	98.7 [<i>C. rubeyi</i>] 96.3 [<i>C. ubiquitum</i>]	99.2 [<i>C. rubeyi</i> ; DQ295013] 98.7 [<i>C. rubeyi</i> ; KM010224]
	<i>C. ubiquitum</i>	16	100.0	91.8 [Ground squirrel I] 91.6 [Deer mouse III]	100.0 [<i>C. ubiquitum</i> ; GQ337961] 99.8 [<i>C. ubiquitum</i> ; EF030518]
	Skunk	4	99.9	92.7 [<i>C. rubeyi</i>] 92.5 [Ground squirrel III]	100.0 [skunk; AY120923]
	Deer mouse III	3	99.9	93.6 [Ground squirrel III] 92.9 [<i>C. rubeyi</i>]	98.1 [<i>C. tyzzeri</i> ; JQ073414]
Actin	<i>C. rubeyi</i>	11	100.0	98.2 [Ground squirrel III] 93.1 [Ground squirrel I]	99.6 [<i>C. rubeyi</i> ; KM010227]
	Ground squirrel I	6	100.0	93.1 [Ground squirrel III] 93.1 [<i>C. rubeyi</i>]	93.1 [<i>C. rubeyi</i> ; KM010227] 93.1 [deer mouse; AY120925]
	Ground squirrel II	1	ND	93.2 [Ground squirrel III] 92.9 [<i>C. rubeyi</i>]	92.7 [<i>C. rubeyi</i> ; KM010227]
	Ground squirrel III	10	100.0	98.2 [<i>C. rubeyi</i>] 93.6 [Deer mouse III]	97.9 [<i>C. rubeyi</i> ; KM010227]

ND: Not determined because the group contained only one isolate.

XIIb and XIIc in tree squirrels, another wildlife-associated subtype, XIId, was identified in eastern gray squirrels and American red squirrels in New York (Li et al., 2014). Similar to XIIb and XIIc, subtype XIId has been associated with human disease in the US (Li et al., 2014). Therefore, tree squirrels should be considered a potential source of *C. ubiquitum* infections in humans.

We found the skunk genotype in eastern gray, American red, and fox squirrels. This genotype was reported previously in eastern gray squirrels and river otters (*Lontra canadensis*) in New York (Feng et al., 2007), raccoons (*Procyon lotor*) in New York and Colorado, and striped skunks (*Mephitis mephitis*) in New York. Similar to *C. ubiquitum*, the skunk genotype is known to cause disease in humans (Davies et al., 2009; Elwin et al., 2012; Robinson et al., 2008).

Deer mouse genotype III, a genotype that has not been associated with human disease, was found in eastern gray squirrels and American red squirrels at a single location in this study. This genotype appears to be restricted to squirrels and deer mice (Feng et al., 2007; Stenger et al., Unpublished) and may be transmitted between sympatric populations of these hosts.

Out of the four ground squirrel associated species/genotypes, *C. rubeyi* and ground squirrel genotype III were most similar, and their predominant hosts in this study, the black-tailed prairie dog and 13-lined ground squirrel, respectively, also share a close phylogenetic relationship (Harrison et al., 2003; Herron et al., 2004). We also detected *C. rubeyi* in a golden-mantled ground squirrel, which has a range that overlaps that of the prairie dog in western Montana. Isolates clustering with *C. rubeyi* were previously reported in a golden-mantled ground squirrel (Sltl05c), California ground squirrel (Sbey11c), and Belding's ground squirrel (Sbld05c) in California (Atwill et al., 2004; Pereira et al., 2010). Similarly to *C. rubeyi*, ground squirrel genotype I from 13-lined ground squirrels in the present study clustered with isolates from California ground squirrels (Sbey03a and Sbey03b) and a Belding's ground squirrel (Sbld05a) in California (Pereira et al., 2010). Collectively, these data suggest that multiple *Cryptosporidium* lineages have coevolved with ground squirrels and that specificity is not

restricted to a single ground squirrel species. However, as these species and genotypes have been reported only in ground squirrels, they appear to be restricted to this squirrel tribe, and are therefore unlikely to cause human disease.

Despite the overlapping ranges of tree and ground squirrel species in the study area, we did not detect the same species/genotypes of *Cryptosporidium* in squirrels from different taxonomic tribes. Although the present study did not include eastern chipmunks, a ground squirrel species identified as a host of *C. ubiquitum* in New York (Feng et al., 2007; Ziegler et al., 2007), a previous comprehensive study on eastern chipmunks in Minnesota also failed to detect *C. ubiquitum* (Stenger et al., 2015), suggesting that this zoonotic species is not frequently transmitted between tree squirrels and ground squirrels in the upper midwest region of the US. Given its broad host specificity and infectivity for eastern chipmunks in New York, *C. ubiquitum* is likely to be infectious for the ground squirrels examined in this study, so why were they not infected? One possible explanation is the different ecologies and behaviors of tree squirrels and ground squirrels. Tree squirrel species usually remain active throughout the year, living in the trees of forests, riparian areas, and urban areas. In contrast, ground squirrel species seldom climb trees, living instead in underground burrow systems, most frequently in prairies or grasslands, where many species hibernate during the winter months. A second possible explanation is that oocysts of *Cryptosporidium* species/genotypes infecting tree squirrels require water for efficient transmission to ground squirrel hosts. Supporting this, the same *C. ubiquitum* subtypes were found in storm water, tree squirrels, and ground squirrels in New York (Li et al., 2014). Abundant precipitation in the eastern US transitions to drier conditions on either side of the 100th meridian, which bisects the study area in the upper midwest, and conditions become increasingly more arid from west of the 100th meridian to California. Black tailed prairie dogs and other ground squirrel species that thrive in the arid conditions west of the 100th meridian rarely drink water and obtain moisture from plant material (Lehmer et al., 2001). This would limit their contact with *Cryptosporidium* species and genotypes that require water for efficient

transmission between tree and ground squirrel hosts. A corollary, which could be tested experimentally, is that *Cryptosporidium* genotypes associated with western and midwestern ground squirrel species are adapted to transmission under arid conditions.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.002>.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge funding support from the United States Department of Agriculture National Research Initiative (Project # 2008-35102-19260), the Czech Science Foundation (15-01090S), the North Dakota State University Graduate School, and the North Dakota Water Resources Research Institute.

References

- Appelbee, A.J., Thompson, R.C., Olson, M.E., 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife—current status and future needs. *Trends Parasitol.* 21, 370–376.
- Atwill, E.R., Phillips, R., Pereira, M.D., Li, X., McCowan, B., 2004. Seasonal shedding of multiple *Cryptosporidium* genotypes in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6748–6752.
- Chalmers, R.M., Smith, R., Elwin, K., Clifton-Hadley, F.A., Giles, M., 2011. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004–2006. *Epidemiol. Infect.* 139, 700–712.
- Cieloszyk, J., Goñi, P., García, A., Remacha, M.A., Sánchez, E., Clavel, A., 2012. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 30, 549–551.
- Davies, A.P., Campbell, B., Evans, M.R., Bone, A., Roche, A., Chalmers, R.M., 2009. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 838–840.
- Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., Chalmers, R.M., 2012. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. *Epidemiol. Infect.* 140, 673–683.
- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124, 90–97.
- Fayer, R., Santín, M., Macarasin, D., 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172, 23–32.
- Feltus, D.C., Giddings, C.W., Schneck, B.L., Monson, T., Warshauer, D., McEvoy, J.M., 2006. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4303–4308.
- Feng, Y., 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6475–6483.
- Feng, Y., Lal, A.A., Li, N., Xiao, L., 2011. Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.* 127, 238–242.
- Guo, Y., Cebelinski, E., Matusevich, C., Alderisio, K.A., Lebbad, M., McEvoy, J., Roellig, D.M., Yang, C., Feng, Y., Xiao, L., 2015. Subtyping novel zoonotic pathogen *Cryptosporidium* chipmunk genotype I. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1648–1654.
- Harrison, R., Bogdanowicz, S., Hoffmann, R., Yensen, E., Sherman, P., 2003. Phylogeny and evolutionary history of the ground squirrels (Rodentia: Marmotinae). *J. Mamm. Evol.* 10, 249–276.
- Herron, M.D., Castoe, T.A., Parkinson, C.L., 2004. Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 1015–1030.
- Jellison, K.L., Lynch, A.E., Ziemann, J.M., 2009. Source tracking identifies deer and geese as vectors of human-infectious *Cryptosporidium* genotypes in an urban/suburban watershed. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4267–4272.
- Jiang, J., Alderisio, K.A., Xiao, L., 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4446–4454.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., Faruque, A.S.G., Zaidi, A.K.M., Saha, D., Alonso, P.L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ochieng, J.B., Omere, R., Oundo, J.O., Hossain, A., Das, S.K., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Adegbola, R.A., Antonio, M., Hossain, M.J., Akinsola, A., Mandomando, I., Nhamposha, T., Acácio, S., Biswas, K., O'Reilly, C.E., Mintz, E.D., Berkeley, L.Y., Muhsen, K., Sommerfelt, H., Robins-Browne, R.M., Levine, M.M., 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382, 209–222.
- Kváč, M., Hofmannová, L., Bertolino, S., Wauters, L., Tosi, G., Modrý, D., 2008. Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitol.* 55, 95–99.
- Lebbad, M., Besser, J., Insulander, M., Karlsson, L., Mattsson, J.G., Svenungsson, B., Axen, C., 2013. Unusual cryptosporidiosis cases in Swedish patients: extended molecular characterization of *Cryptosporidium* *viatorum* and *Cryptosporidium* chipmunk genotype I. *Parasitology* 140, 1735–1740.
- Lehmer, E., Van Horne, B., Kulbartz, B., Florant, G., 2001. Facultative torpor in free-ranging black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *J. Mammal.* 82, 551–557.
- Li, N., Xiao, L., Alderisio, K., Elwin, K., Cebelinski, E., Chalmers, R., Santín, 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. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 217–224.
- Li, X., Pereira, M.D.G.C., Larsen, R., Xiao, C., Phillips, R., Striby, K., McCowan, B., Atwill, E.R., 2015. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4, 343–350.
- Ly, C., Zhang, L., Wang, R., Jian, F., Zhang, S., Ning, C., Wang, H., Feng, C., Wang, X., Ren, X., Qi, M., Xiao, L., 2009. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in China: prevalence and molecular characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7692–7699.
- Mercer, J.M., Roth, V.L., 2003. The effects of Cenozoic global change on squirrel phylogeny. *Science* 299, 1568–1572.
- Peng, M.M., Meshnick, S.R., Cunliffe, N.A., Thindwa, B.D., Hart, C.A., Broadhead, R.L., Xiao, L., 2003. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50, 557–559 (Suppl.).
- Pereira, M.G., Li, X., McCowan, B., Phillips, R.L., Atwill, E.R., 2010. Multiple unique *Cryptosporidium* isolates from three species of ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*, *S. beldingi*, and *S. lateralis*) in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8269–8276.
- Robinson, G., Elwin, K., Chalmers, R.M., 2008. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1800–1802.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- 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*). *Infect. Genet. Evol.* 32, 113–123.
- Sulaiman, I.M., Lal, A.A., Xiao, L., 2002. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J. Parasitol.* 88, 388–394.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- R Development Core Team, 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0 Available online at <http://www.R-project.org/>.
- Xiao, L., Singh, A., Limor, J., Graczyk, T.K., Gradus, S., Lal, A., 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1097–1101.
- Xiao, L., Sulaiman, I.M., Ryan, U.M., Zhou, L., Atwill, E.R., Tischler, M.L., Zhang, X., Fayer, R., Lal, A.A., 2002. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int. J. Parasitol.* 32, 1773–1785.
- Ziegler, P.E., Wade, S.E., Schaaf, S.L., Chang, Y.F., Mohammed, H.O., 2007. *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York City watershed. *J. Wildl. Dis.* 43, 586–596.

PŘÍLOHA 2

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.

Native and introduced squirrels in Italy host different *Cryptosporidium* spp.

Jitka Prediger^{a,b}, Michaela Horčíčková^{a,b}, Lada Hofmannová^c,
Bohumil Sak^a, Nicola Ferrari^d, Maria Vittoria Mazzamuto^e,
Claudia Romeo^d, Lucas A. Wauters^e, John McEvoy^f, Martin Kváč^{a,b,*}

^aInstitute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic

^bFaculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

^cDepartment of Pathology and Parasitology, University of Veterinary and Pharmaceutical sciences, Brno, Czech Republic

^dDepartment of Veterinary Sciences and Public Health, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

^eDepartment of Theoretical and Applied Sciences, Università degli Studi dell'Insubria, Varese, Italy

^fVeterinary and Microbiological Sciences Department, North Dakota State University, Fargo, USA

Received 12 July 2017; received in revised form 13 September 2017; accepted 15 September 2017

Available online 21 September 2017

Abstract

The present study was undertaken to describe *Cryptosporidium* spp. infection in tree squirrels from 17 locations in Northern Italy. A total of 357 squirrels were examined, including species native to Europe (*Sciurus vulgaris*; n = 123), and species introduced from North America (*Sciurus carolinensis*; n = 162) and Southeast Asia (*Callosciurus erythraeus*; n = 72). Faecal samples of all squirrels were examined for the presence of *Cryptosporidium* infection by microscopy (flotation method) and PCR/sequence analysis of the *Cryptosporidium* 18S rRNA, actin, and gp60 genes. Despite the overlapping ranges of native and introduced tree squirrel species in the study area, they host different *Cryptosporidium* spp. *Sciurus vulgaris* were exclusively infected with *Cryptosporidium* ferret genotype (n = 13) belonging to three novel gp60 subtypes, VIIIb–VIIId. *Sciurus carolinensis* hosted *C. ubiquitum* subtype XIIb (n = 2), *Cryptosporidium* skunk genotype subtype XVIa (n = 3), and chipmunk genotype I subtype XIVa (n = 1). *Cryptosporidium* chipmunk genotype I subtype XIVa was also found in two *C. erythraeus*. Comparing data from this and previous studies, we propose that *Cryptosporidium* skunk genotype and possibly *C. ubiquitum* subtype XIIb were introduced to Europe with eastern grey squirrels. *Cryptosporidium* chipmunk genotype I and ferret genotype were associated with high intensity infections, but there was no association with diarrhoea.

© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: *Cryptosporidium*; gp60; Infection; Italy; Phylogeny; Tree squirrels

Introduction

Cryptosporidium is a genus of apicomplexan parasites that infect epithelial cells in the microvillus border of the gastrointestinal tract of all classes of vertebrates (Ryan and

*Corresponding author at: Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Branišovská 31, 370 05, České Budějovice, Czech Republic. Fax: +42 0385310388.

E-mail address: kvac@paru.cas.cz (M. Kváč).

Table 1. *Cryptosporidium* spp. identified in tree squirrels worldwide.

Host (scientific name)	<i>Cryptosporidium</i> taxa	Locality	Reference
American red squirrel (<i>Tamiasciurus hudsonicus</i>)	<i>C. ubiquitum</i> chipmunk genotype I deer mouse genotype III skunk genotype	North America	Stenger et al. (2015), Ziegler et al. (2007a), Ziegler et al. (2007b)
Eastern grey squirrel (<i>Sciurus carolinensis</i>)	<i>C. baileyi</i> <i>C. muris</i> <i>C. parvum</i> ^a <i>C. ubiquitum</i> chipmunk genotype I deer mouse genotype III skunk genotype	North America	Feng et al. (2007), Stenger et al. (2015), Sundberg et al. (1982), Ziegler et al. (2007a), Ziegler et al. (2007b)
Eurasian red squirrel (<i>Sciurus vulgaris</i>)	<i>C. parvum</i> ^a chipmunk genotype I [#] ferret genotype ^{#,§}	Europe [#] and Asia [§]	Bertolino et al. (2003), Feng et al. (2007), Kváč et al. (2008), Lv et al. (2009)
Fox squirrel (<i>Sciurus niger</i>)	<i>C. ubiquitum</i> , <i>Cryptosporidium</i> sp.	North America	Current (1990), Stenger et al. (2015)

^a Determined based on oocyst size by microscopy.

Xiao 2014) and cause the diarrheal disease cryptosporidiosis. Human cryptosporidiosis is primarily caused by the zoonotic *Cryptosporidium parvum* and anthroponic *Cryptosporidium hominis*, but there are an increasing number of reports describing human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium* originating from wildlife animals, including squirrels (Elwin et al. 2012a; Koehler et al. 2014; Kváč et al. 2009; Kváč et al. 2014b; Ortega and Kváč 2013; Rašková et al. 2013; Robinson et al. 2008; Stenger et al. 2015; Waldron et al. 2010). The squirrel, family *Sciuridae*, is one of the most diverse and widely distributed families of mammals, and their members host several different *Cryptosporidium* species and genotypes (Kváč et al. 2014a). Tree squirrels, a polyphyletic tribe in the squirrel family, include hundreds of species. *Cryptosporidium parvum* has been reported in the eastern grey squirrel (*Sciurus carolinensis*; hereafter grey squirrel) and fox squirrel (*Sciurus niger*) in the US (Current 1990; Sundberg et al. 1982) and in the Eurasian red squirrel (*Sciurus vulgaris*; hereafter red squirrel) in Italy (Bertolino et al. 2003). However, these studies were performed before the advent of molecular tools, when oocysts were identified based on their morphology and frequently described as *C. parvum* (smaller, spherical oocysts) or *C. muris* (larger, ovoid oocysts). Based on the current knowledge that species and genotypes of *Cryptosporidium* cannot be reliably identified from morphological data, many of the isolates identified as *C. parvum* may have been other taxa (Kváč et al. 2014a; Robertson et al. 2014). Molecular studies on *Cryptosporidium* in tree squirrels have been performed mostly in North America and Europe, with only two studies from Asia and no studies from South America and Africa (Feng et al. 2007; Kváč et al. 2008; Lv et al. 2009; Stenger et al. 2015; Ziegler et al. 2007a,b). Tree squirrels are known to host four *Cryptosporidium* species and three genotypes (Table 1). Stenger et al. (2015) showed that some *Cryptosporidium* spp. are broadly distributed across squirrel

tribes, while others have a narrow host and geographic range. *Cryptosporidium* deer mouse genotype III and skunk genotype are frequently detected in tree squirrels in North America, but have not been detected in animals from Europe or Asia (Table 1), with the exception of a single report of the skunk genotype in a North American raccoon (*Procyon lotor*) from Poland (Lesnianska et al. 2016). Based on the knowledge that squirrels are considered among the most invasive mammalian taxa and that several squirrel species have been introduced into Europe (Bertolino 2009; Wauters et al. 2005), we hypothesized that *Cryptosporidium* species and genotypes infecting alien hosts would be more typical of the native region of those hosts. In Northern Italy, the range of native red squirrels extensively overlaps that of grey squirrels, which were introduced from North America during the last century, and, to a lesser extent, overlaps that of Pallas's squirrels (*Callosciurus erythraeus*), which were introduced from Southeast Asia in the last decade (Bertolino et al. 2014; Martinoli et al. 2010; Mazzamuto et al. 2016). Squirrels that were introduced to Italy represent a threat to red squirrels, which are distributed throughout continental Europe, and the recently described Calabrian black squirrel (*Sciurus meridionalis*), which is endemic to Southern Italy (Wauters et al. 2005, 2017).

We undertook the present study to describe the presence of *Cryptosporidium* spp. in native (*S. vulgaris*) and introduced (*S. carolinensis* and *C. erythraeus*) tree squirrels in Northern Italy. These data were used to determine whether there is interspecific transmission of *Cryptosporidium* spp. among the three host species, and to evaluate the role of tree squirrels as a reservoir of human pathogenic *Cryptosporidium* spp. Additionally, we explored host factors (i.e. population density, age, and sex) potentially affecting the distribution of *Cryptosporidium* in these hosts.

Material and Methods

Ethics statement

Traps were checked frequently and handling time was minimised to reduce animal stress, and all applicable international, national and institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Permits for trapping and handling squirrels were granted by Italian Institute for Environmental Protection and Research (ISPRA), Lombardy Region (Authorization No.: 3892, 02/05/2011), Cuneo Province (Permit No.: 473, 12/05/2011) and Torino Province (Permit No.: 180-14616/2011).

Study site

Faecal samples were collected from red squirrels, grey squirrels, and Pallas's squirrels at 17 locations in Northern Italy, including six mountain locations and 11 lowland locations (Fig. 1). Some sites were inhabited by a single squirrel species only: seven locations had only red squirrels (area of study sites: 30–95 ha) and five locations had only grey squirrels (3–20 ha). Four locations had both red and grey squirrels (10–50 ha) and one location had red squirrels and Pallas's squirrels (126 ha). None of the locations had all three tree squirrel species. For each species of squirrel at each sample location the population density was described as high or low according to number of squirrels per hectare (ha) (Fig. 1). Based on the different ecology and social behaviour of the three species (Thorington et al. 2012). High population density for Eurasian red squirrels was defined as more than 0.3 squirrels per ha and for eastern grey and Pallas's squirrels as more than 1 squirrel per ha.

Sample collection and parasitological examination

Squirrels were live-trapped in Tomahawk cage traps, which were baited with hazelnuts. The age class (i.e. adult or subadult) of red and grey squirrels was determined during handling based on a combination of body mass and reproductive conditions. We could not determine age class based on external characteristics of Pallas's squirrels. Faecal samples from trapped squirrels were collected directly from the trap or from the animal during handling. All faecal samples were stored in 2.5% potassium dichromate at 4 °C prior to microscopic examination and DNA extraction. The faecal consistency (presence of diarrhoea) was noted at the time of sampling. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples was screened using light microscopy (200× and 400× magnifications) following modified Sheather's sugar flotation (specific density 1.3) (Eckert et al. 1995). The infection intensity was scored semiquantitatively (Table 2).

Molecular analyses

To detect and identify species of *Cryptosporidium*, DNA from faecal samples was extracted using the Exgene Stool SV mini kit (GeneAid, Seoul, Korea) which preceded homogenisation of sample by glass beads as previously reported (Sak et al. 2008) and nested-PCR protocols (AmpONE, HS-Taq premix, GeneAid, Korea) were used to amplify partial sequences of the *Cryptosporidium* 18S rRNA gene according to Jiang et al. (2005) and Xiao et al. (2001), actin gene according to Sulaiman et al. (2002) and *Cryptosporidium* 60-kDa glycoprotein gene (gp60) according to Alves et al. (2003), Li et al. (2014) or Guo et al. (2015b). The gp60 gene was amplified and sequenced from 1936-ScCa-MN1 and 2052-Tahu-MN2, which were previously isolated from an grey squirrel and American red squirrel (*Tamiasciurus hudsonicus*), respectively, and identified as *Cryptosporidium* skunk genotype (Stenger et al. 2015), and SV33 and SV59, which were previously isolated from red squirrels and identified as *Cryptosporidium* chipmunk genotype I (Kváč et al. 2008).

Secondary PCR products were separated on an agarose gel and visualized under UV illumination using ethidium bromide staining. Products were purified (GenElute Gel Extraction Kit, Sigma, St. Louis, MO) and sequenced in both directions with secondary primers using a BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit in an ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Sequencing of each locus was repeated two times. The nucleotide sequences of each gene obtained in this study were manually edited using the program ChromasPro 2.1.4 (Technelysium, Pty, Ltd., South Brisbane, Australia), and aligned with previously published sequences using the MAFFT version 7 online server using the Q-INS-i algorithm for 18S rDNA and actin sequences and L-INS-i algorithm for GP60 sequences (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). The alignment included published sequences from *Cryptosporidium* species, sequences with a high similarity to study sequences using BLAST analysis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Alignments were manually edited, including trimming at both ends, and phylogenetic analyses were performed using MEGA 6.0. Trees were inferred by the Maximum likelihood (ML) method with the substitution model that best fit the alignment selected using the Bayesian information criterion. The General Time Reversible model was selected for all alignments. All models were used under an assumption that rate variation among sites was gamma distributed with invariant sites. A bootstrap consensus tree was inferred from 1000 pseudoreplicates. Phylogenetic trees were edited for style using CorelDrawX7 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Canada). Sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers MF411071-MF411090 and MF45685.

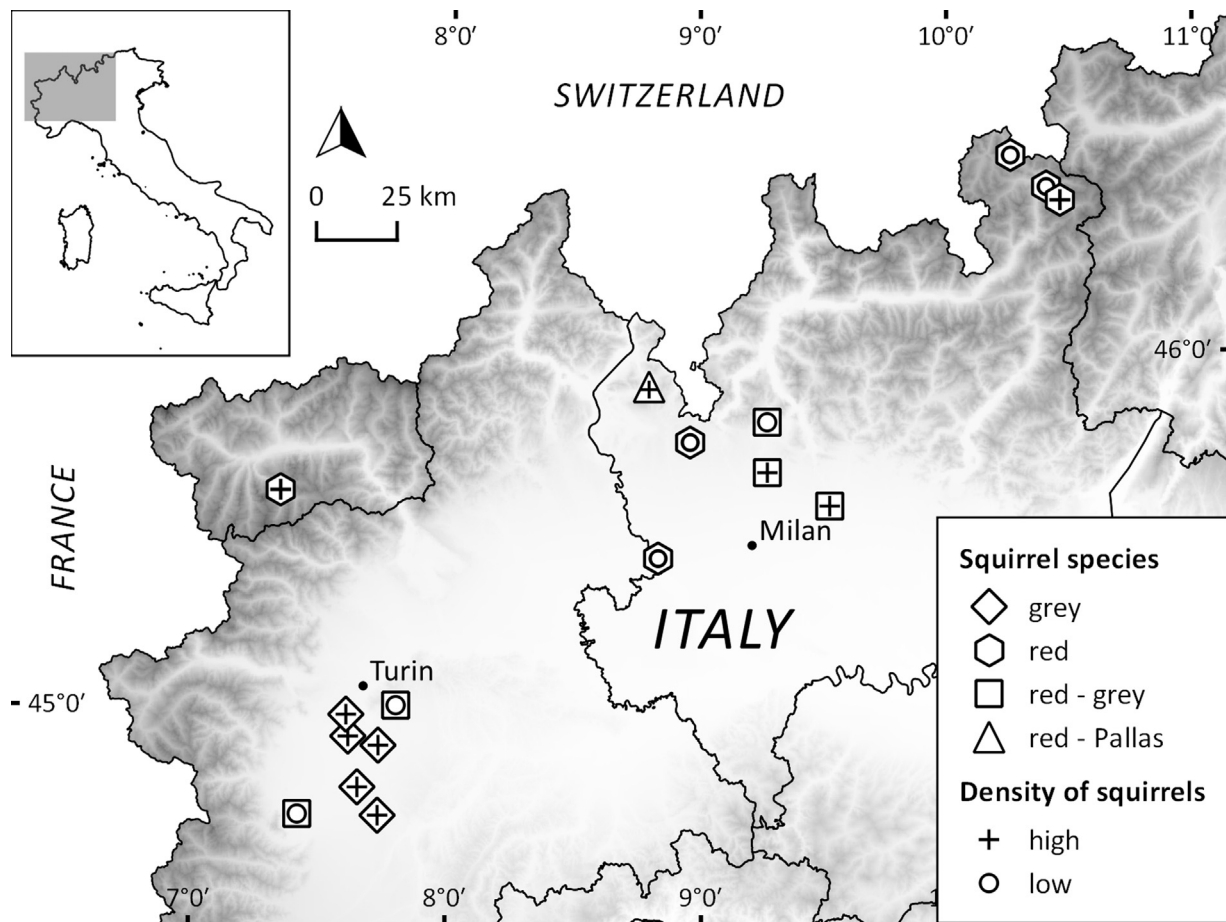


Fig. 1. Location of sites sampled in Northern Italy. For each site, symbol shape indicates which tree squirrel species are present (i.e. Eurasian red, eastern grey and Pallas's squirrel) and fill pattern indicates density of squirrels (i.e. high or low, cut-off value at 0.3 squirrels/ha for Eurasian red squirrels and at 1 squirrel/ha for eastern grey and Pallas's squirrels).

Table 2. Scale for semiquantitative evaluation of infection intensity at the flotation by light microscopy at a $\times 200$ magnification.

Infection intensity		Microscopy finding
–	No infection	No oocysts detected
+	Mild infection	Sporadic occurrence of oocysts
++	Medium infection	10–30 oocysts (total) in 10 fields
+++	Severe infection	31–50 oocysts (total) in 10 fields
++++	Intense infection	More than 50 oocysts (total) in 10 fields

Statistical analyses

The probability of infection by *Cryptosporidium* spp. was determined through logistic regression using infection status as a dependent variable. We applied a general model on the entire dataset, testing for differences in prevalence of infection among the three host species, and separate sub-models on red and grey squirrels to explore the effect of host-related and extrinsic factors on *Cryptosporidium* spp. infection. Pallas's squirrels were not analysed further due to the low prevalence of infection found in this host species. For the red squirrel dataset, we tested for an effect of host sex, age class (i.e. subadult or adult), population density of hosts (i.e. low or

high, cut-off value at 0.3 squirrels/ha) and habitat type (i.e. lowland mixed-deciduous woods or mountain conifer forests) on individual infection status. For the grey squirrel dataset, we tested only for an effect of sex, age, and population density (i.e. low or high, cut-off value at 1 squirrel/ha), since the species in Italy inhabits mostly lowland, mixed-deciduous woods. Pallas's squirrels were not analysed further due to the low prevalence of infection, the absence of age class data and the absence of variability in habitat or population density (they were exclusively found at a single site). On these sub-models, we applied Firth's penalized maximum likelihood method to cope with low prevalence and quasi-separation of data (Heinze and Schemper 2002). All the analyses were

Table 3. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. infection in Eurasian red squirrel (*Sciurus vulgaris*), eastern grey squirrel (*Sciurus carolinensis*), and Pallas's squirrel (*Callosciurus erythraeus*) in two habitats and at two population density levels.

Host species	Number of screened/positive animals (%)	SE	95%CL	Habitat		Population density ^a	
				Lowland	Mountain	Low	High
Eurasian red squirrel	123/13 (10.7)	2.7	5.1–16.1	0	13	5	8
Eastern grey squirrel	162/6 (3.7)	1.5	0.8–6.6	6	–	–	6
Pallas's squirrel	72/2 (2.8)	1.9	0–6.7	0	2	–	2

^a cut-off value between low and high population density was 0.3 squirrels/ha for Eurasian red squirrels; 1 squirrel/ha for eastern grey squirrels, and for Pallas's squirrels.

carried out using PROC LOGISTIC in SAS[®] 9.4 Software (Copyright © 2012 SAS Institute Inc., Cary, NC).

Results

Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in squirrels

Out of 357 squirrels sampled at selected locations in Northern Italy, 11 and 21 were positive for *Cryptosporidium* by microscopy and PCR, respectively. All microscopically positive animals were also PCR positive (Table 3). Logistic regression on the entire dataset revealed a difference in prevalence of *Cryptosporidium* spp. among the three species of squirrel ($\chi^2_2 = 6.34$; $p = 0.042$), with a significantly greater prevalence in red squirrels than the other two squirrel species (see Table 3 for details). Specific models on red and grey squirrels showed that host sex, age class and population density had no effect on infection status of either of the two species (all $p > 0.05$). However, specific models on red squirrels showed that probability of infection by *Cryptosporidium* spp. in this species was significantly affected by habitat ($\chi^2_1 = 6.84$; $p = 0.0089$), with no infected animals recorded in lowland woods ($n = 59$), and 20.3% (95%CL: 10.2%–30.4%; $n = 64$) of animals infected in mountain forests.

Only *Cryptosporidium* ferret and chipmunk genotypes were detected microscopically (Table 4). Logistic regression revealed no association between age class and infection in either red or grey squirrels (both $p > 0.05$). Moreover, no animals had signs of diarrhoea at the time of sampling, so *Cryptosporidium* infection was not associated with clinical cryptosporidiosis.

Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from red, grey, and Pallas's squirrels

A ML tree constructed from 18S rRNA gene sequences in this study and representative sequences in GenBank showed the presence of four distinct clades that included previously reported *Cryptosporidium* species and genotypes. All isolates ($n = 13$) from red squirrels were identical to *Cryptosporidium* ferret genotype [accession no. EU25085]. Two isolates from

Pallas's squirrels and an isolate from a grey squirrel were identical to *Cryptosporidium* chipmunk genotype I [accession no. JX978272]. Of the five remaining isolates, all from grey squirrels, two were identical to *C. ubiquitum* [accession no. AF262328] and three were identical to *Cryptosporidium* skunk genotype [accession no. JQ413444] (Fig. 2; Table 4). A fragment of the actin gene was amplified and sequenced from all samples that were positive for the 18S rRNA gene (Fig. 2). A ML tree constructed from actin gene sequences supported the phylogenetic position of all detected *Cryptosporidium* species and genotypes, and sequences shared 100% identity with previously published sequences (Fig. 3; Table 4).

Using primers reported by Alves et al. (2003), a fragment of the gp60 gene was amplified from 13 isolates, which were identified as *Cryptosporidium* ferret genotype based on 18S rDNA and actin sequences. A ML tree showed the presence of three novel gp60 clades in the *Cryptosporidium* ferret genotype: VIIIb, VIIIc, and VIId (Fig. 4). The gp60 gene was amplified from the remaining isolates using primers described by (Guo et al. 2015b; Li et al. 2014). Sequences of the gp60 gene from *C. ubiquitum* and *Cryptosporidium* chipmunk genotype I clustered with subtype XIId [accession no. JX4112926] and XIVa [accession no. KP099082], respectively. *Cryptosporidium* chipmunk genotype I gp60 sequences from grey and Pallas's squirrels in the present study were identical to those found in red squirrels in an earlier study (Fig. 4; Kváč et al. 2008). gp60 sequences from *Cryptosporidium* skunk genotype isolates, identified in this study and a previous study (Stenger et al. 2015), clustered with a sequence previously identified in wastewater [accession no. KP099095], sharing 100% sequence identity (Fig. 4, Table 4).

Discussion

The genus *Cryptosporidium* comprises many species and genotypes with different host specificities. While some species, including *C. parvum*, *C. ubiquitum*, and *C. baileyi* are generalists, most infect only a narrow range of closely related hosts or a single host (e.g. *C. wrairi*) (Nakamura and Meireles 2015; Stenger et al. 2015; Vetterling et al. 1971). This study

Table 4. The distribution of *Cryptosporidium* spp. in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*), eastern grey squirrels (*Sciurus carolinensis*), and Pallas's squirrels (*Callosciurus erythraeus*).

Host species	n ₁	Sex	Age	n ₂	Isolate number ^a	MIC	Detected species and genotypes	
							18S rDNA and actin	gp60
Eurasian red squirrel	123	F	SA	16	14695	–	ferret genotype	VIIIId A16G1R1
					14573	–	ferret genotype	VIIIc A12G2R1
					14682	+	ferret genotype	VIIIc A12G2R1
					14699	+	ferret genotype	VIIIc A12G2R1
					14714	++	ferret genotype	VIIIc A12G2R1
		M	A	44	14713	–	ferret genotype	VIIIb A11G1R1
					14701	+++	ferret genotype	VIIIc A12G2R1
					14694	++++	ferret genotype	VIIIb A9G1R1
					14700	+	ferret genotype	VIIIc A12G2R1
					14707	++++	ferret genotype	VIIIc A12G2R1
		F	SA	10	14582	–	ferret genotype	VIIIc A12G2R1
					14697	++	ferret genotype	VIIIId A16G1R1
					14698	+	ferret genotype	VIIIc A12G2R1
					14669	–	C. ubiquitum	XIb
					14669	–	C. ubiquitum	XIb
Eastern grey squirrel	162	F	SA	22	14669	–	C. ubiquitum	XIb
			A	64		–	–	–
		M	SA	15	14550	–	skunk genotype	XVIaA14R1
					14668	–	skunk genotype	XVIaA14R1
			A	59	14762	++	chipmunk genotype I	XIVa16G2T2
					14550	–	skunk genotype	XVIaA14R1
Pallas's squirrels	72	F	ND	31	14668	–	C. ubiquitum	XIb
		M	ND	41	17064	++++	chipmunk genotype I	XIVa16G2T2
					15003	–	chipmunk genotype I	XIVa16G2T2

^a PCR positive samples; MIC results of microscopic examination; n₁ number of examined animal of appropriate host species; n₂ number of examined animal of appropriate age and sex category; F female; M male; SA subadult; A adult; – microscopically negative; + mild infection; ++ medium infection; +++ severe infection; ++++ intense infection (for key to infection intensity see Table 2); ND not determined.

on *Cryptosporidium* spp. in tree squirrels from Northern Italy has shown that native red squirrels and introduced grey and Pallas's squirrels host different *Cryptosporidium* spp., with no evidence of transmission between introduced and native hosts. Similarly, Hofmannova et al. (2016) reported that these three squirrel species over the same range hosted different *Eimeria* spp.

Native red squirrels sampled in the present study were exclusively infected with *Cryptosporidium* ferret genotype, which was originally described as a common parasite of the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) and domestic ferret (*Mustela putorius furo*) in the USA and Japan (Abe and Iseki 2003; Sulaiman et al. 2000; Xiao et al. 1999). Additionally, Gómez-Couso et al. (2007) described a genotype closely related to the ferret genotype (one nucleotide difference) from farmed American mink (*Mustela vison*) in Spain. This genotype was found to be the dominant *Cryptosporidium* taxon in previous studies of red squirrels in Italy and China (Kváč et al. 2008; Lv et al. 2009). Surprisingly, *Cryptosporidium* ferret genotype has not been found in other tree squirrels, but it has been reported in pet Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus*) from China (Lv et al. 2009). The prevalence of *Cryptosporidium* ferret genotype in this study (10.7%) is similar to the 10.6% reported by Kváč et al. (2008) in red squirrels from Italy and lower than the 26.3% reported by Lv

et al. (2009) in pet red squirrels from China. It should also be noted that in both this study and in the study by Kváč et al. (2008), *Cryptosporidium* ferret genotype was found only in red squirrels inhabiting mountain conifer forests. This finding suggests that the circulation of this genotype in squirrels may be linked to some extrinsic factors such as the presence of another host species which is absent from other habitat types

Sequence analyses of the gp60 gene showed that red squirrels in Northern Italy were infected with different subtypes (VIIIb–VIIIId) of *Cryptosporidium* ferret genotype than red squirrels and Siberian chipmunks in China (VIIIa) Lv et al. (2009). Subtyping tools targeting the polymorphic gp60 gene have been used to characterize the transmission and host specificity of *Cryptosporidium* species and genotypes (Guo et al. 2015b). For example, two host-specific subtypes (IXa and IXb) of *C. tyzzeri* were observed in *Mus musculus musculus* and *M. m. domesticus*, mouse subspecies that diverged 0.5 Mya (Kváč et al. 2013). Similarly, *Cryptosporidium* horse genotype VIa subtype is common in horses, whereas human infection is caused by VIb subtype, which has never been found in horses (Wagnerová et al. 2015; Xiao et al. 2009). Also, the distribution and host specificity of various *C. parvum* and *C. hominis* gp60 subtypes has been well described (Nichols et al. 2014). Phylogenetic analyses

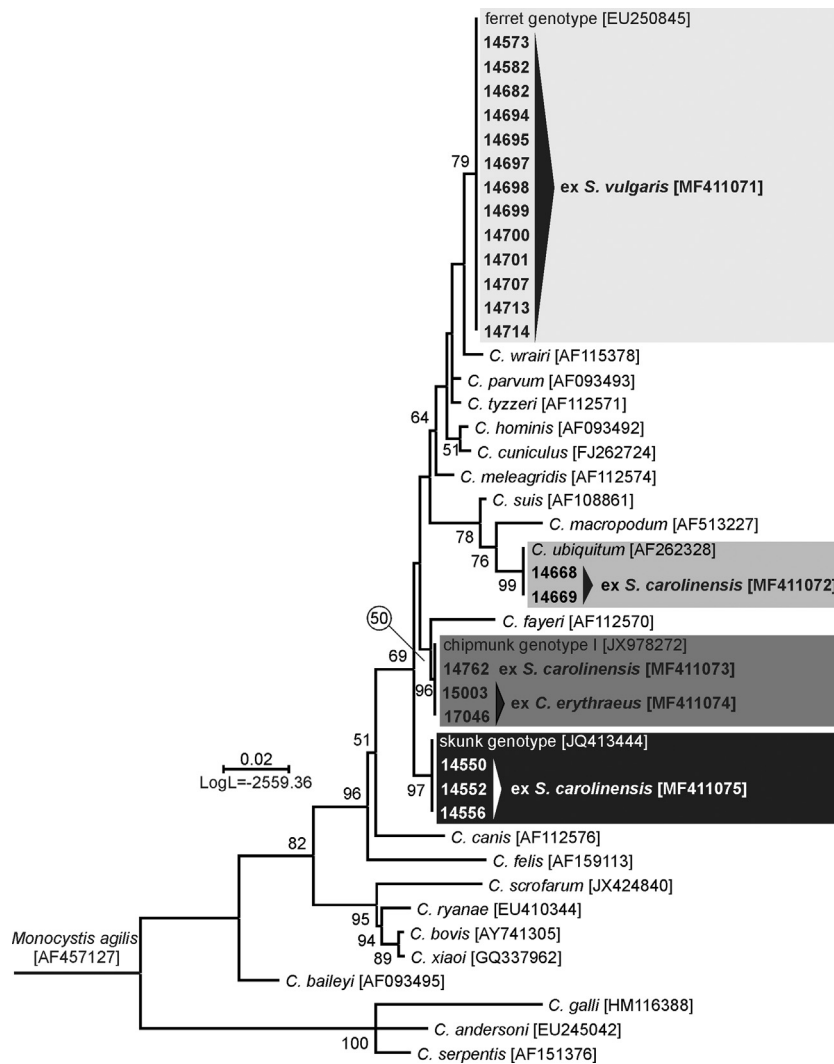


Fig. 2. Phylogenetic relationship among the subtypes of *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* skunk genotype, *Cryptosporidium* chipmunk genotype I, and *Cryptosporidium* ferret genotype and other *Cryptosporidium* spp. by a maximum likelihood analysis of the partial sequences of 18S rRNA gene calculated by General Time Reversible model. Numbers on branches are percent bootstrapping values (>50) using 1000 replicates. Clades representing *Cryptosporidium* taxa are identified by shading and labelled. The host is included in each sequence. The tree was rooted with the 18S rDNA sequence of *Monocystis agilis* [AF457127].

revealed that subtypes VIIIb and VIIIc of *Cryptosporidium* ferret genotype are closely related to a subtype previously reported in China; in contrast, VIIIc clusters with *C. erinacei*, *C. cuniculus*, and *C. hominis*.

Grey squirrels and Pallas's squirrels, which are not native to Europe, hosted *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* chipmunk genotype I and/or *Cryptosporidium* skunk genotype. *Cryptosporidium ubiquitum* has a wide geographic distribution and a broad host range, including human and non-human primates (lemurs), carnivores (raccoons), wild ruminants (mouflon sheep, blesboks, nyalas, white-tailed deer, Père David's deer, sika deer, ibexes, buffalos, and yaks) and rodents (squirrels, chipmunks, woodchucks, beavers, porcupines, deer mice, house mice, and gerbils) (Li et al. 2014; Ryan and Xiao 2014). In squirrels, it has been detected in grey squirrels, American red squirrels and eastern chipmunks

(*Tamias striatus*) in the US (Feng et al. 2007; Stenger et al. 2015; Ziegler et al. 2007a,b). The gp60 subtype from the present study (XIIb) also was the same as that reported in American red squirrels and eastern chipmunks in the US (Li et al. 2014; Stenger et al. 2015). The presence of this subtype in squirrels supports the suggestion by Li et al. (2014) that *C. ubiquitum* subtypes have different geographic distributions and host specificities. XIIa is associated with ruminants worldwide, XIIb–XIIc are most frequently found in rodents in the US, and XIIe and XIIc have been found only in rodents in Europe. The detection of XIIb in grey squirrels in the present study is the only report of this subtype outside of North America, and it leads us to propose that it was introduced to Europe with the grey squirrel. In contrast to the higher prevalence of *C. ubiquitum* in tree squirrels from the US (9–28%) (Feng et al. 2007; Stenger et al. 2015), their

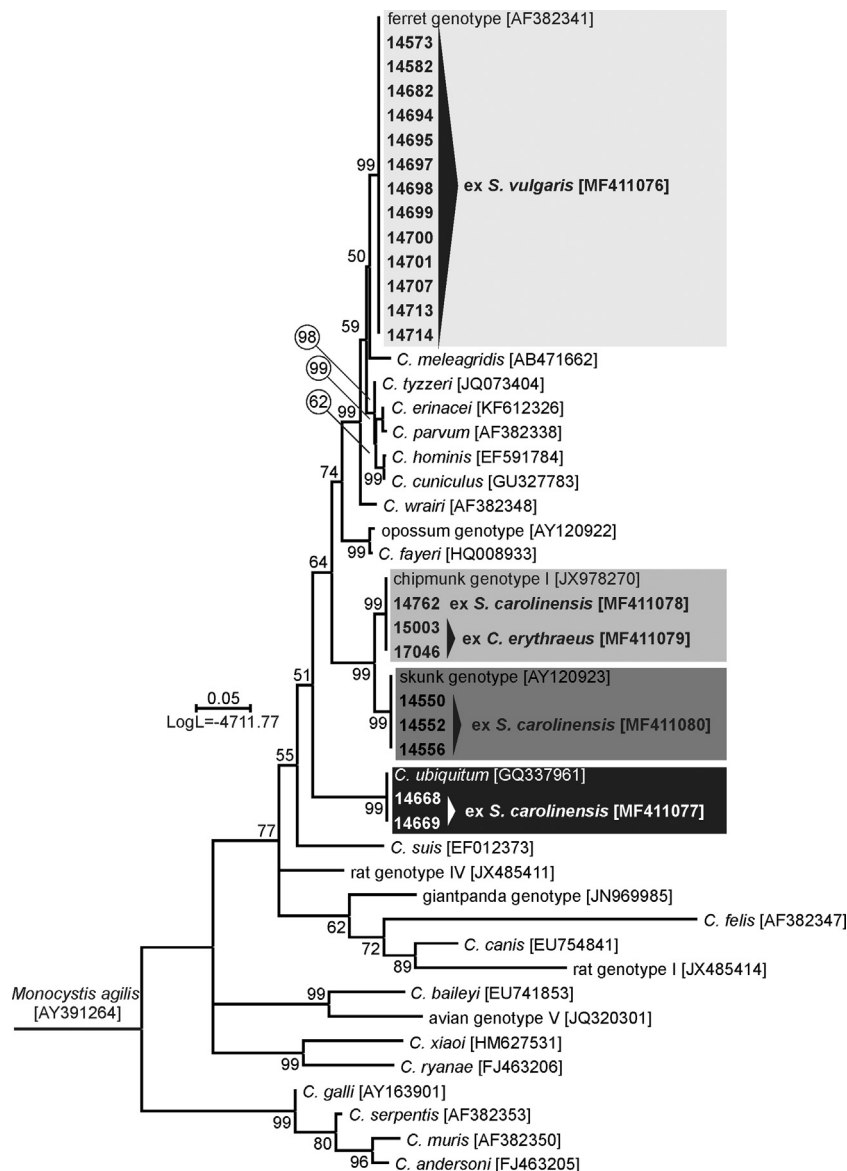


Fig. 3. Phylogenetic relationship among the subtypes of *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* skunk genotype, *Cryptosporidium* chipmunk genotype I, and *Cryptosporidium* ferret genotype and other *Cryptosporidium* spp. by a maximum likelihood analysis of the partial sequences of actin gene calculated by General Time Reversible model. Numbers on branches are percent bootstrapping values (>50) using 1,000 replicates. Clades representing *Cryptosporidium* taxa are identified by shading and labelled. The host is included in each sequence. The tree was rooted with the actin sequence of *Monocystis agilis* [AY391264].

native environment, the prevalence in squirrels introduced in Europe was low (1.2%). Grey squirrels infected with *C. ubiquitum* showed no signs of diarrhoea and had low levels of oocyst excretion, similar to previous studies (Kotková et al. 2016; Skerrett and Holland 2001; Stenger et al. 2015).

Cryptosporidium chipmunk genotype I was found in grey and Pallas's squirrels, but not red squirrels in present study. However, *Cryptosporidium* chipmunk genotype I was previously reported in red squirrels (Kváč et al. 2008). *Cryptosporidium* chipmunk genotype I infects a broad range of hosts, including rodents, insectivores, and humans (Feltus et al. 2006; Song et al. 2015), and it has been reported in eastern chipmunks and grey squirrels in the US (Stenger

et al. 2015). The same gp60 subtype (XIVa) was found in grey and Pallas's squirrels in the present study, and this was similar to that reported in grey squirrels, eastern chipmunks and humans in the US (Guo et al. 2015b). These are the first *Cryptosporidium* isolates from Pallas's squirrels to be genotyped, so it is too early to conclude that Pallas's squirrels are a major host for *Cryptosporidium* chipmunk genotype I. Considering that isolates SV33 and SV59, from the study by Kváč et al. (2008), are also subtype XIVa, we propose that *Cryptosporidium* chipmunk genotype I was introduced to Europe with grey squirrels, their natural host. Data from squirrels in the present study and the study by Kváč et al. (2008) in Northern Italy suggest that the prevalence of *Cryp-*

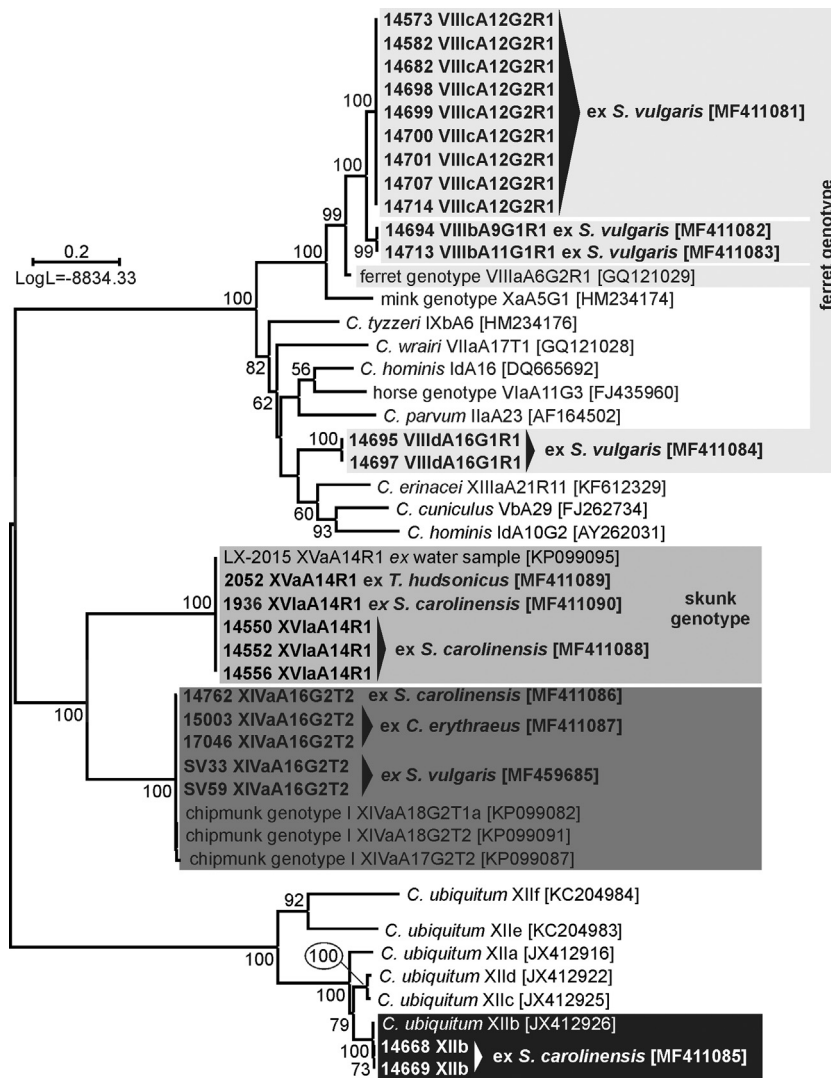


Fig. 4. Phylogenetic relationship among the subtypes of *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* skunk genotype, *Cryptosporidium* chipmunk genotype I, and *Cryptosporidium* ferret genotype and other *Cryptosporidium* spp. by a maximum likelihood analysis of the partial sequences of gp60 gene calculated by General Time Reversible model. Numbers on branches are percent bootstrapping values (>50) using 1000 replicates. Clades representing *Cryptosporidium* taxa are identified by shading and labelled. The host is included in each sequence.

tosporidium chipmunk genotype I is low in this area (0.8 to 1.4%). In contrast, Ziegler et al. (2007a) and Song et al. (2015) reported 14.3% and 45.5% prevalence in eastern chipmunks and shrews, respectively, although their sample size was low ($n = 7$ and 11, respectively). *Cryptosporidium* chipmunk genotype I and ferret genotype were associated with intense infections and they were the only taxa detectable by microscopy, but infections with these genotypes were not associated with clinical signs of diarrhoea. This is consistent with previous reports that *Cryptosporidium* chipmunk genotype I and ferret genotype do not cause clinical disease in wild animals (Abe and Iseki 2003; Kváč et al. 2008; Lv et al. 2009; Song et al. 2015; Sulaiman et al. 2000; Xiao et al. 1999). In contrast, *Cryptosporidium* chipmunk genotype I causes clinical disease in humans (Lebbad et al. 2013), and it is increasingly associated with human cryptosporid-

iosis in the US (Guo et al. 2015a). In contrast, only three cases have been reported in two European countries, two in Sweden (Lebbad et al. 2013) and one in France (Anofel *Cryptosporidium* National Network 2010), and red squirrels, which have been identified as hosts of *Cryptosporidium* chipmunk genotype I, are widespread in both countries.

Until recently, *Cryptosporidium* skunk genotype was only reported in North America. However, Lesnianska et al. (2016) reported this genotype in raccoons (*Procyon lotor*) introduced to Poland. *Cryptosporidium* skunk genotype, as the name suggests, was originally isolated from a striped skunk (Xiao et al. 2002) and was subsequently detected in raccoons, the North American river otter (*Lontra canadensis*), and three tree squirrel species: grey squirrels, American red squirrels, and fox squirrels (Feng et al. 2007; Chavez et al. 2012; Jellison et al. 2009; Stenger et al. 2015; Zhou et al.

2004). Sequences of gp60 gene from grey squirrels and American red squirrels from the US Stenger et al. (2015) were compared to those obtained from grey squirrels in this study. All sequences shared 100% identity with each other and with sequences previously isolated from water (Guo et al. 2015b). Since *Cryptosporidium* skunk genotype has been found exclusively in grey squirrels and a raccoon in Europe, we propose that it may have been introduced to Europe with these hosts that are native to North America. The sources of recent *Cryptosporidium* skunk genotype infections in humans in the UK were not identified (Davies et al. 2009; Elwin et al. 2012b; Chalmers et al. 2009); however, given that grey squirrels and raccoons were introduced to the UK from the US (Beltran-Beck et al. 2012; Bertolino 2008), these animals could be considered as reservoirs of the infection.

Conclusions

In conclusion, despite overlapping ranges, tree squirrel species that are native and non-native to Europe host different *Cryptosporidium* species and genotypes. The grey squirrel, which was introduced to Europe from the US, hosts the same *Cryptosporidium* spp. in both continents, including *C. ubiquitum* subtype XIIb, *Cryptosporidium* skunk genotype and *Cryptosporidium* chipmunk genotype I, suggesting that it may be responsible for introducing these *Cryptosporidium* spp. into Europe. Because the *Cryptosporidium* spp. identified in squirrels in the present study have been associated with human disease, and squirrel habitats frequently overlap urban and rural areas, squirrels could represent a potential reservoir of human cryptosporidiosis.

Acknowledgements

This study was funded by the Czech Science Foundation (15-01090S), Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LTAUSA17165), and by Grant Agency of the University of South Bohemia (002/2016/Z). We would like to thank LIFE09 NAT/IT/00095 EC-SQUARE, Parco Pineta, Adda Nord and Valle del Lambro Regional Parks, Stelvio National Park, Cuneo and Turin Provinces and all the private estate owners that allowed field collection. Thanks also to all the people and students that helped with sampling and laboratory analysis.

References

- Abe, N., Iseki, M., 2003. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from ferrets in Japan. *Parasitol. Res.* 89, 422–424, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-002-0805-2>.
- Alves, M., Xiao, L.H., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O., Antunes, F., 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2744–2747, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.6.2744-2747.2003>.
- Anofel *Cryptosporidium* National Network, 2010. Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006–2009. *Euro Surveill.* 15, 19642.
- Beltran-Beck, B., Garcia, F.J., Gortazar, C., 2012. Raccoons in Europe: disease hazards due to the establishment of an invasive species. *Eur. J. Wildlife Res.* 58, 5–15, <http://dx.doi.org/10.1007/s10344-011-0600-4>.
- Bertolino, S., 2008. Introduction of the American grey squirrel (*Sciurus carolinensis*) in Europe: a case study in biological invasion. *Curr. Sci.* 95, 903–906.
- Bertolino, S., 2009. Animal trade and non-indigenous species introduction: the world-wide spread of squirrels. *Divers. Distrib.* 15, 701–708, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-4642.2009.00574.x>.
- Bertolino, S., di Montezemolo, N.C., Preatoni, D.G., Wauters, L.A., Martinoli, A., 2014. A grey future for Europe: *Sciurus carolinensis* is replacing native red squirrels in Italy. *Biol. Invasions* 16, 53–62, <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-013-0502-3>.
- Bertolino, S., Wauters, L.A., De Bruyn, L., Canestri-Trotti, G., 2003. Prevalence of coccidia parasites (Protozoa) in red squirrels (*Sciurus vulgaris*): effects of host phenotype and environmental factors. *Oecologia* 137, 286–295, <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-003-1345-x>.
- Current, W.L., 1990. *Cryptosporidium* spp. In: Walzer, P.D., Genta, R.M. (Eds.), *Parasitic Infections in the Compromised Host*. Dekker, New York, pp. 281–341.
- Chalmers, R.M., Elwin, K., Thomas, A.L., Guy, E.C., Mason, B., 2009. Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. *Euro Surveill.* 14.
- Chavez, D.J., LeVan, I.K., Miller, M.W., Ballweber, L.R., 2012. *Baylisascaris procyonis* in raccoons (*Procyon lotor*) from eastern Colorado, an area of undefined prevalence. *Vet. Parasitol.* A 2011 Elsevier B.V., Netherlands, pp. 330–334.
- Davies, A.P., Campbell, B., Evans, M.R., Bone, A., Roche, A., Chalmers, R.M., 2009. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 838–840, <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e31819d646d>.
- Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P., 1995. *Biotechnology—Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. ECSC-EC-EAEC, Brussels-Luxembourg, p. 306.
- Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., Chalmers, R.M., 2012a. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. *Epidemiol. Infect.* 140, 673–683, <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268811000860>.
- Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., Chalmers, R.M., 2012b. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. *Epidemiol. Infect.* 140, 673–683, <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268811000860>.
- Feltus, D.C., Giddings, C.W., Schneck, B.L., Monson, T., Warshawer, D., McEvoy, J.M., 2006. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4303–4308.
- Feng, Y., Alderisio, K.A., Yang, W., Blancero, L.A., Kuhne, W.G., Nadeski, C.A., Reid, M., Xiao, L., 2007. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York

- watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6475–6483, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01034-07>.
- Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Ares-Mazas, E., 2007. First report of *Cryptosporidium parvum* 'ferret' genotype in American mink (*Mustela vison* Shreber 1777). *Parasitol. Res.* 100, 877–879, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-006-0338-1>.
- Guo, Y., Cebelinski, E., Matusevich, C., Alderisio, K.A., Lebbad, M., McEvoy, J., Roellig, D.M., Yang, C., Feng, Y., Xiao, L., 2015a. Subtyping novel zoonotic pathogen *Cryptosporidium* chipmunk genotype I. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1648–1654, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03436-14>.
- Guo, Y., Cebelinski, E., Matusevich, C., Alderisio, K.A., Lebbad, M., McEvoy, J., Roellig, D.M., Yang, C., Feng, Y., Xiao, L., 2015b. Subtyping novel zoonotic pathogen *Cryptosporidium* chipmunk genotype I. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1648–1654, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03436-14>.
- Heinze, G., Schemper, M., 2002. A solution to the problem of separation in logistic regression. *Stat. Med.* 21, 2409–2419, <http://dx.doi.org/10.1002/sim.1047>.
- Hofmannova, L., Romeo, C., Stohanzlova, L., Jirsova, D., Mazamuto, M.V., Wauters, L.A., Ferrari, N., Modry, D., 2016. Diversity and host specificity of coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) in native and introduced squirrel species. *Eur. J. Protistol.* 56, 1–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2016.04.008>.
- Jellison, K.L., Lynch, A.E., Ziemann, J.M., 2009. Source tracking identifies deer and geese as vectors of human-infectious *Cryptosporidium* genotypes in an urban/suburban watershed. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4267–4272, <http://dx.doi.org/10.1021/es900081m>.
- Jiang, J., Alderisio, K.A., Xiao, L., 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4446–4454, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.8.4446-4454.2005>.
- Koehler, A.V., Whipp, M.J., Haydon, S.R., Gasser, R.B., 2014. *Cryptosporidium cuniculus*—new records in human and kangaroo in Australia. *Parasites Vectors* 7, 492, <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-014-0492-8>.
- Kotkova, M., Němejck, K., Sak, B., Hanzal, V., Květoňová, D., Hlášková, 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 Parasitol.* 63, <http://dx.doi.org/10.14411/fp.2016.003>.
- Kváč, M., Hofmannová, L., Bertolino, S., Wauters, L., Tosi, G., Modrý, D., 2008. Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitol.* 55, 95–99.
- Kváč, M., Květoňová, D., Sak, B., Ditrich, O., 2009. *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 982–983, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1506.071621>.
- Kváč, M., McEvoy, J., Loudová, M., Stenger, B., Sak, B., Květoňová, D., Ditrich, O., Rašková, V., Moriarty, E., Rost, M., Macholán, M., Piálek, J., 2013. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *Int. J. Parasitol.* 43, 805–817, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.04.007>.
- Kváč, M., McEvoy, J., Stenger, B., Clark, M., 2014a. *Cryptosporidiosis* in other vertebrates. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. 1st ed. Springer, Wien, pp. 237–326.
- Kváč, M., Saková, K., Květoňová, D., Kicia, M., Wesolowska, M., McEvoy, J., Sak, B., 2014b. Gastroenteritis caused by the *Cryptosporidium* hedgehog genotype in an immunocompetent man. *J. Clin. Microbiol.* 52, 347–349, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02456-13>.
- Lebbad, M., Beser, J., Insulander, M., Karlsson, L., Mattsson, J.G., Svenungsson, B., Axén, C., 2013. Unusual cryptosporidiosis cases in Swedish patients: extended molecular characterization of *Cryptosporidium viatorum* and *Cryptosporidium* chipmunk genotype I. *Parasitology* 140, 1735–1740, <http://dx.doi.org/10.1017/S003118201300084x>.
- Lesnianska, K., Perec-Matysiak, A., Hildebrand, J., Bunkowska-Gawlik, K., Pirog, A., Popiolek, M., 2016. *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in introduced raccoons (*Procyon lotor*)—first evidence from Poland and Germany. *Parasitol. Res.* 115, 4535–4541, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5245-5>.
- 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. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 217–224, <http://dx.doi.org/10.3201/eid2002.121797>.
- Lv, C., Zhang, L., Wang, R., Jian, F., Zhang, S., Ning, C., Wang, H., Feng, C., Wang, X., Ren, X., Qi, M., Xiao, L., 2009. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7692–7699.
- Martinoli, A., Bertolino, S., Preatoni, D.G., Balduzzi, A., Marsan, A., Genovesi, P., Tosi, G., Wauters, L.A., 2010. Headcount 2010: the multiplication of the grey squirrel introduced in Italy. *Hystrix* 21, 127–136, <http://dx.doi.org/10.4404/Hystrix-21.2-4463>.
- Mazzamuto, M.V., Galimberti, A., Cremonesi, G., Pisanu, B., Chapuis, J.L., Stuyck, J., Amori, G., Su, H., Aloise, G., Preatoni, D.G., Wauters, L.A., Casiraghi, M., Martinoli, A., 2016. Preventing species invasion: a role for integrative taxonomy? *Integr. Zool.* 11, 214–228, <http://dx.doi.org/10.1111/1749-4877.12185>.
- Nakamura, A.A., Meireles, M.V., 2015. *Cryptosporidium* infections in birds—a review. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 24, 253–267, <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015063>.
- Nichols, G.L., Chalmers, R.M., Hadfield, S.J., 2014. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. 1st ed. Springer, pp. 237–326.
- Ortega, Y.R., Kváč, M., 2013. Foodborne protozoa. In: Labbé, R.G., García, S. (Eds.), *Guide to Foodborne Pathogens*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Oxford, pp. 303–316.
- Rašková, V., Květoňová, D., Sak, B., McEvoy, J., Edwinston, A., Stenger, B., Kváč, M., 2013. Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *J. Clin. Microbiol.* 51, 360–362, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02346-12>.
- Robertson, L.J., Björkman, C., Axén, C., Fayer, R., 2014. Cryptosporidiosis in farmed animals. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, pp. 149–236.
- Robinson, G., Elwin, K., Chalmers, R.M., 2008. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1800–1802, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1411.080239>.
- Ryan, U., Xiao, L., 2014. Taxonomy and molecular taxonomy. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. 1st ed. Springer, pp. 3–42.

- Sak, B., Kváč, M., Hanzlíková, D., Cama, V., 2008. First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 153, 220–224, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.043>.
- Skerrett, H.E., Holland, C.V., 2001. Asymptomatic shedding of *Cryptosporidium* oocysts by red deer hinds and calves. *Vet. Parasitol.* 94, 239–246.
- Song, J., Kim, C.Y., Chang, S.N., Abdelkader, T.S., Han, J., Kim, T.H., Oh, H., Lee, J.M., Kim, D.S., Kim, J.T., Oh, H.S., Hur, M., Suh, J.H., Park, J.H., 2015. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rodents and insectivores in South Korea. *Korean J. Parasitol.* 53, 737–743, <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2015.53.6.737>.
- Stenger, B.L., Clark, M.E., Kváč, M., Khan, E., Giddings, C.W., Prediger, J., McEvoy, J.M., 2015. North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes. *Infect. Genet. Evol.* 36, 287–293, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.002>.
- Sulaiman, I.M., Lal, A.A., Xiao, L., 2002. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J. Parasitol.* 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2385–2391, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.6.2385-2391.2000>.
- Sundberg, J.P., Hill, D., Ryan, M.J., 1982. Cryptosporidiosis in a gray squirrel. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181, 1420–1422.
- Thorington, R.W., Koprowski, J.L., Steele, M.A., Wharton, J.F., 2012. *Squirrels of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA, p. 472.
- 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. *J. Protozool.* 18, 243–247.
- Wagnerová, P., Sak, B., McEvoy, J., Rost, M., Perec Matysiak, A., Ježková, J., Kváč, M., 2015. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland. *Parasitol. Res.* 114, 1619–1624, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-015-4353-y>.
- Waldron, L.S., Cheung-Kwok-Sang, C., Power, M.L., 2010. Wildlife-associated *Cryptosporidium fayeri* in human, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 2006–2007, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1612.100715>.
- Wauters, L., Tosi, G., Gurnell, J., 2005. A review of the competitive effects of alien grey squirrels on behaviour, activity and habitat use of red squirrels in mixed, deciduous woodland in Italy. *Hystrix* 16, 27–40.
- Wauters, L.A., Amori, G., Aloise, G., Gippoliti, S., Agnelli, P., Galimberti, A., Casiraghi, M., Preatoni, D., Martinioli, A., 2017. New endemic mammal species for Europe: *Sciurus meridionalis* (Rodentia, Sciuridae). *Hystrix* 28, <http://dx.doi.org/10.4404/hystrix-28.1-12015>.
- Xiao, L., Hlavsa, M.C., Yoder, J., Ewers, C., Dearen, T., Yang, W., Nett, R., Harris, S., Brend, S.M., Harris, M., Onischuk, L., Valderrama, A.L., Cosgrove, S., Xavier, K., Hall, N., Romero, S., Young, S., Johnston, S.P., Arrowood, M., Roy, S., Beach, M.J., 2009. Subtype analysis of *Cryptosporidium* specimens from sporadic cases in Colorado, Idaho, New Mexico, and Iowa in 2007: widespread occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and case history of an infection with the *Cryptosporidium* horse genotype. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3017–3020, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00226-09>.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C., Fayer, R., Lal, A.A., 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3386–3391.
- Xiao, L., Singh, A., Limor, J., Graczyk, T.K., Gradus, S., Lal, A., 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1097–1101.
- Xiao, L., Sulaiman, I.M., Ryan, U.M., Zhou, L., Atwill, E.R., Tischler, M.L., Zhang, X., Fayer, R., Lal, A.A., 2002. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int. J. Parasitol.* 32, 1773–1785.
- Zhou, L., Fayer, R., Trout, J.M., Ryan, U.M., Schaefer, F.W., Xiao 3rd, L., 2004. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7574–7577, <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.12.7574-7577.2004>.
- Ziegler, P.E., Wade, S.E., Schaaf, S.L., Chang, Y.F., Mohammed, H.O., 2007a. *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York City watershed. *J. Wildl. Dis.* 43, 586–596.
- Ziegler, P.E., Wade, S.E., Schaaf, S.L., Stern, D.A., Nadeski, C.A., Mohammed, H.O., 2007b. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Vet. Parasitol.* 147, 176–184, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.024>.

PŘÍLOHA 3

Prediger J., Ježková J., Holubová N., Sak B., Konečný R., Rost M., McEvoy J., Rajský D., Kváč M. 2021: *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*). Microorganisms 9: 2050.



Article

Cryptosporidium sciurinum n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Eurasian Red Squirrels (*Sciurus vulgaris*)

Jitka Prediger ^{1,†}, Jana Ježková ^{1,†}, Nikola Holubová ^{1,2}, Bohumil Sak ², Roman Konečný ¹, Michael Rost ¹, John McEvoy ³, Dušan Rajský ⁴ and Martin Kváč ^{1,2,*}

¹ Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; jitka.prediger@gmail.com (J.P.); jezkja@seznam.cz (J.J.); nikoletto@seznam.cz (N.H.); konechyroman@centrum.cz (R.K.); rost@jcu.cz (M.R.)

² Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; casio@paru.cas.cz

³ Microbiological Sciences Department, North Dakota State University, 1523 Centennial Blvd, Van Es Hall, Fargo, ND 58102, USA; john.mcevoy@ndsu.edu

⁴ Faculty of Forestry, Technical University in Zvolen, T.G. Masaryka 24, 960 01 Zvolen, Slovakia; dusan.rajsky@gmail.com

* Correspondence: kvac@paru.cas.cz; Tel.: +420-387775419

† These authors contributed equally.

Citation: Prediger, J.; Ježková, J.; Holubová, N.; Sak, B.; Konečný, R.; Rost, M.; McEvoy, J.; Rajský, D.; Kváč, M. *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Eurasian Red Squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Microorganisms* **2021**, *9*, 2050. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102050>

Academic Editors: Chao-Nan Lin and Peck Toun Ooi

Received: 20 August 2021

Accepted: 24 September 2021

Published: 28 September 2021

Abstract: *Cryptosporidium* spp. are common protozoan pathogens in mammals. The diversity and biology of *Cryptosporidium* in tree squirrels are not well studied. A total of 258 Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) from 25 and 15 locations in the Czech Republic and Slovakia, respectively, were examined for *Cryptosporidium* spp. oocysts and specific DNA at the *SSU*, *actin*, *HSP70*, *TRAP-C1*, *COWP*, and *gp60* loci. Out of 26 positive animals, only juveniles (9/12) were microscopically positive (18,000 to 72,000 OPG), and molecular analyses revealed the presence of *Cryptosporidium* sp. ferret genotype in all specimens. Oocysts obtained from naturally-infected squirrels measured 5.54–5.22 µm and were not infectious for laboratory mice (BALB/c and SCID), Mongolian gerbils, Guinea pigs, Southern multimammate mice, chickens, or budgerigars. None of naturally infected squirrels showed clinical signs of disease. The frequency of occurrence of the ferret genotype in squirrels did not vary statistically based on host age, gender or country of capture. Phylogenetic analysis of sequences from six loci revealed that *Cryptosporidium* sp. ferret genotype is genetically distinct from the currently accepted *Cryptosporidium* species. Morphological and biological data from this and previous studies support the establishment of *Cryptosporidium* sp. ferret genotype as a new species, *Cryptosporidium sciurinum* n. sp.

Keywords: occurrence; biology; course of infection; infectivity; oocyst size; phylogeny; *Cryptosporidium* sp. ferret genotype

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cryptosporidium is a genus of single-cell protist parasites that infect the gastrointestinal, respiratory, and/or the urogenital tract of most vertebrates, including humans, causing the disease cryptosporidiosis [1]. The course of infection and severity of the disease depends on a host factors such as age, competence and maturity of the immune system, condition, the presence of secondary infections, and on the characteristics of the *Cryptosporidium* species or genotype [2]. Most of the species validly described so far (48) are narrowly host specific, and only a small number, including *C. parvum*, *C. ubiquitum*, and *C. baileyi*, have a broad host range [3,4]. In addition to the validly described species, dozens of genotypes have been described that lack sufficient data to justify a species designation. Genotypes are typically named for the host from which the novel *Cryptosporidium* DNA

sequence is first identified. For example, *C. suis* was originally described as the *Cryptosporidium* pig genotype because it was first identified in a pig [5]. New genotypes are most frequently described from partial sequences of the small subunit rRNA gene. The squirrel, family *Sciuridae*, is one of the most diverse and widely distributed families of mammals, and they host several species and genotypes of *Cryptosporidium*, some of which are infectious to humans and can cause severe and life-threatening diarrhoea [6].

Tree squirrels diverged from ground squirrels about 30 million years ago, and this polyphyletic tribe comprises hundreds of extant species. *Cryptosporidium* was first reported in a tree squirrel in 1982, when Sundberg et al. [7] isolated oocysts from an eastern grey squirrel (*Sciurus carolinensis*). Current [8] subsequently reported *Cryptosporidium* oocysts in a fox squirrel (*Sciurus niger*). Both authors identified the isolates as *C. parvum*, but this was likely incorrect, based on our present knowledge. We now know that several distinct *Cryptosporidium* species and genotypes with overlapping oocyst sizes infect tree squirrels. Four species and five genotypes of *Cryptosporidium* have been described in tree squirrels inhabiting North America: *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotype I, deer mouse genotype III, and skunk genotype in the American red squirrel (*Tamiasciurus hudsonicus*); *C. baileyi*, *C. muris*, *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotype I, deer mouse genotype III, and skunk genotype in the Eastern grey squirrel (*Sciurus carolinensis*); *C. ubiquitum* in the Fox squirrel (*Sciurus niger*) [7,9–12]. Fewer studies have reported on *Cryptosporidium* in tree squirrels outside of North America. In China, *C. parvum*, *C. wairi*, and *Cryptosporidium* sp. rat genotype II have been detected in wild Pallas's squirrels (*Callosciurus erythraeus*), and *C. parvum*, *C. ratti*, *Cryptosporidium* sp. rat genotype II, ferret genotype, and chipmunk genotype III have been reported in Eurasian red squirrels [13–15]. In Europe, native Eurasian red squirrels are almost exclusively infected with *Cryptosporidium* sp. ferret genotype [16,17], although other *Cryptosporidium* species and genotypes, such as *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* sp. skunk genotype, and chipmunk genotype I, have been reported in areas where the Eurasian red squirrel is threatened by invasive, non-native species from Asia and North America [16,17]. It can be concluded from the literature that Eurasian red squirrels primarily host *Cryptosporidium* sp. ferret genotype, whereas the *C. ubiquitum* and *Cryptosporidium* skunk genotypes are most common in North American squirrels [7,9–17].

This study aimed to describe the biological, morphological, and genetic characteristics of *Cryptosporidium* sp. ferret genotype from Eurasian red squirrels in Central Europe. Our data show that the ferret genotype is the major *Cryptosporidium* species infecting Eurasian red squirrels in this region, and it is genetically and biologically distinct from valid *Cryptosporidium* species. We therefore propose that it be named *Cryptosporidium sciurinum* n. sp.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

Traps were checked at least twice per day and handling time was minimized to reduce animal stress; all applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Permits for trapping and handling squirrels and for the transmission study complied with the laws of the Czech Republic (Act No. 246/1992 Coll., on the protection of animals against cruelty). The study design was approved by the ethical committees at the Biology Centre of CAS, the State Veterinary Administration, and the Central Commission for Animal Welfare under protocol Nos. MZP/2019/603/1411 and 35/2018.

2.2. Trapping and Specimen Collection

Faecal samples were collected between June 2019 and June 2021 from Eurasian red squirrels at 25 locations, including seven rescue stations in the Czech Republic and 15 locations in Slovakia (Figure 1). A total of 265 faecal samples were obtained from 258 Eurasian red squirrels. Of these, 147 samples were from squirrels trapped in the wild and 111 were from animals housed at rescue stations. Two squirrels kept at a rescue station (nos. 45901 and 51489) were screened repeatedly. Wild squirrels were live-captured in a Sherman box baited with a mixture of nuts and seeds. Each trapped squirrel was placed into a wire-mesh handling cone to minimize stress during handling and the sex, age, and body condition were recorded following [18]. The presence of any faecal material on the fur around the rectum was also recorded. After release of the trapped animal, faecal samples were collected from traps and individually placed in a sterile plastic tube, which was stored at 4–8°C until subsequent processing. The consistency of faecal samples was recorded at the time of collection. A faecal smear was prepared from each sample, stained with aniline-carbol-methyl violet (ACMV) [19], and examined for the presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts. Oocysts were quantified and the infection intensity was estimated using the method described by Kváč et al. [20]. Briefly, the slide was weighed to the nearest 0.001 g before and after preparation of the smear to determine the mass of faecal material added to the slide. After ACMV staining, all oocysts on the slide were counted and the number of oocysts per gram of faeces was calculated. Oocysts were enumerated from triplicate smears prepared from each sample. All samples were subsequently screened in triplicate for the presence of *Cryptosporidium*-specific DNA by PCR/sequencing of a fragment of the small subunit rRNA gene (SSU). If *Cryptosporidium*-specific DNA was detected, genotyping at other loci was performed as described below.

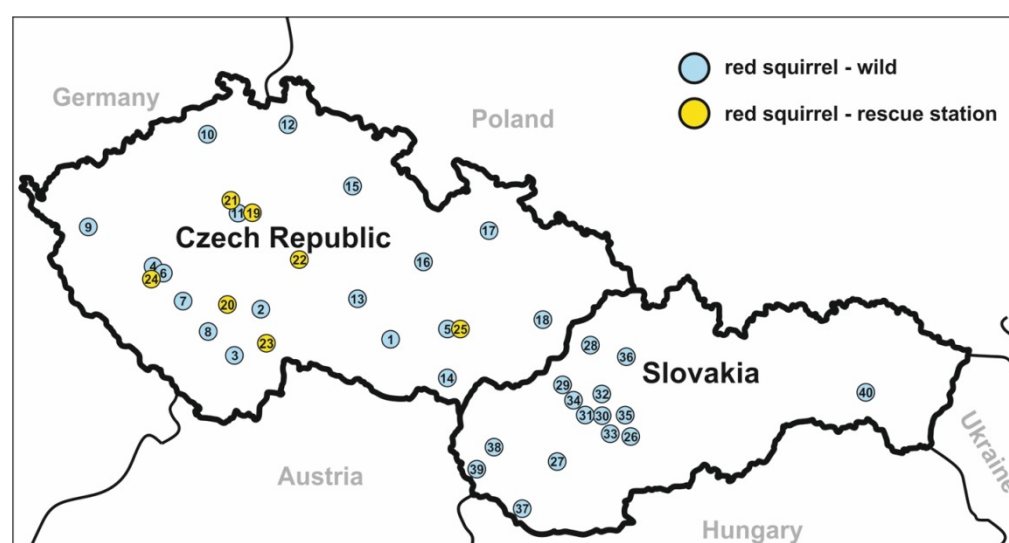


Figure 1. Sampling localities in the Czech Republic and Slovakia: For each site, the number indicates the name of locations (1) Třebíč; (2) Brandlín; (3) České Budějovice; (4) Plzeň; (5) Brno; (6) Starý Plzeň; (7) Chocenice; (8) Strakonice; (9) Mariánské Lázně; (10) Ústí nad Labem; (11) Praha; (12) Liberec; (13) Jihlava; (14) Břeclav; (15) Jaroměř; (16) Svitavy; (17) Bruntál; (18) Valašské Meziříčí; (19) Jinonice; (20) Makov; (21) Praha; (22) Vlašim; (23) Třeboň; (24) Plzeň; (25) Brno; (26) Zvolen; (27) Nitra; (28) Považská Bystrica; (29) Trenčín; (30) Handlová; (31) Prievidza; (32) Turčianské Teplice; (33) Žiar nad Hronom; (34) Bánovce nad Bebravou; (35) Kremnica; (36) Martin; (37) Gabčíkovo; (38) Pezinok; (39) Bratislava; (40) Košice.

2.3. Source of Oocysts of *Cryptosporidium* sp. Ferret Genotype

An isolate of *Cryptosporidium* sp. ferret genotype was obtained from a juvenile Eurasian red squirrel at a rescue station (isolate 45901, locality no. 23). Faecal samples from this squirrel were individually collected into sterile 50 mL vials with a few drops of dH₂O and

stored at 4–8 °C. Oocysts were purified using caesium chloride gradient centrifugation [21] and used for morphometry and transmission studies (described below). Oocyst viability was examined following propidium iodide (PI) staining by a modified assay of Sauch et al. [22]. The oocysts were stored in PBS at 4–8 °C for a maximum of 4 weeks.

2.4. Molecular Characterization

Total genomic DNA (gDNA) was extracted from 5000 purified oocysts, 200 mg of faeces or 200 mg of tissue (see Clinical and Pathomorphological Examinations) by bead disruption (all sample types) for 60 s at 5.5 m/s using 0.5 mm glass beads in a FastPrep®24 Instrument (MP Biomedicals, CA, USA) followed by isolation/purification using Exgene™ Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology Co. Ltd., Seoul, Korea) or DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. Purified DNA was stored at −20 °C prior to amplification by PCR. Nested-PCR protocols were used to amplify partial sequences of genes encoding *SSU*, actin, the 70 kDa heat shock protein (*HSP70*), the thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1 (*TRAP-C1*), *Cryptosporidium* oocyst wall protein (*COWP*), and the 60 kDa glycoprotein (*gp60*) using previously published protocols and primers [23–29]. Negative (molecular grade water) and positive controls (DNA of *C. tyzzeri* subtype family XIa) were included in each PCR amplification.

2.5. Sequence and Phylogenetic Analysis

Secondary PCR products were purified using Gen Elute Gel Extraction Kit (Sigma, St. Louis, MO, USA) and sequenced in both directions using an ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using secondary PCR primers according to the manufacturer's instructions in a commercial laboratory (SEQme, Dobříš, Czech Republic). Sanger sequencing chromatogram files were edited using the ChromasPro 2.1.8 software (Technelysium, Pty, Ltd., South Brisbane, Australia), the obtained nucleotide sequences of each gene were aligned with each other and with reference sequences from GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, accessed on 9 August 2021) using MAFFT version 7 online server (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>, accessed on 9 August 2021) and manually edited and trimmed using BioEdit v.7.0.5 [30]. Maximum likelihood (ML) and Neighbor-joining (NJ) trees were constructed using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGAX) software after computing the most appropriate evolutionary models and values of all parameters for each model. Bootstrap support for branching was based on 1000 replications. Estimates of pairwise distances between species as the number of base substitutions per site from between sequences were calculated in MEGAX. Sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers MZ726453–MZ726454 (*SSU*), MZ772035–MZ772036 (actin), MZ772046–MZ772047 (*HSP70*), MZ772037–MZ772038 (*TRAP-C1*), MZ772044–MZ772045 (*COWP*), and MZ772039–MZ772042 (*gp60*).

2.6. Oocyst Morphometry

The length and width of *Cryptosporidium* sp. ferret genotype oocysts (n = 50) was determined using a digital analysis of images (Olympus cellSens Entry 2.1 software, Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japan) collected using an Olympus Digital Colour Camera DP73 (Olympus), using differential interference contrast (DIC) microscopy at 1000× magnification (Olympus IX70, Tokyo, Japan). These measurements were used to calculate the mean length, width, and the length-to-width ratio. Oocyst size was measured using the same microscope and by the same person. Faecal smears with oocysts of *Cryptosporidium* sp. ferret genotype were stained by modified ACMV, Ziehl–Neelsen (ZN; [31]) and labelled with a Cy3-labelled mouse monoclonal antibody targeting the *Cryptosporidium* oocyst outer wall antigenic sites (A400Cy2R-20X, Crypt-a-Glo, Waterborne, Inc.,

New Orleans, LA, USA) and with genus-specific, FITC-conjugated antibodies (IFA; *Cryptosporidium* IF Test, Crypto cel, Cellabs Pty Ltd., Brookvale, Australia). Type microphotographs of oocysts were taken from each staining/labeling.

2.7. Transmission Studies

All animals used in transmission studies were screened every day for the presence of oocysts of *Cryptosporidium* spp. and specific DNA (*SSU*) a week prior to transmission studies. Five seven-day-and-eight-week-old SCID (strain C.B-17) and BALB/c mice (*Mus musculus*), five seven-day-and-eight-week-old Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*), five seven-day-and-eight-week-old guinea pigs (*Cavia porcellus*), five seven-day-and-eight-week-old Southern multimammate mice (*Mastomys coucha*), five seven-day-old chickens (*Gallus gallus f. domestica*), and five adult budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) were used for transmission studies. Three animals from each strain/species were used as a negative control. To prevent environmental contamination with *Cryptosporidium* spp., animals were housed in plastic cages/aviaries and supplied with a sterilized diet for appropriate host-species and sterilized water ad libitum. Seven-day-and-eight-week-old animals were each inoculated orally by stomach tube with 5000 purified viable oocysts suspended in 50 µL and 200 µL of distilled water, respectively. Faecal samples from all inoculated and control animals were collected daily for 20 days. All samples were screened for the presence of *Cryptosporidium* oocysts and specific DNA using microscopy (following ACMV staining) and PCR amplification of the *SSU* gene, respectively (methods described above). Animals were housed under conditions in accordance with Czech legislation (Act No 246/1992 Coll., on protection of animals against cruelty). Animal caretakers always wore sterile shoe covers, disposable coveralls, and disposable gloves when they entered the experimental room. Woodchip bedding and disposable protective clothing were removed from the experimental room and incinerated.

2.8. Clinical and Pathomorphological Examinations

All animals were sacrificed in accordance with Czech legislation (Act No 246/1992 Coll) at 20 days post-infection (DPI), and the complete examination of all gastrointestinal organs was conducted at necropsy. Tissue specimens from the oesophagus; stomach; duodenum; proximal, central and distal jejunum; ileum; caecum; colon; liver; spleen; kidney; bladder and lung were collected using different sterile dissection tools for each location and processed for histology [32], scanning electron microscopy (SEM) [33], and PCR amplification of the *SSU* gene. Histology sections (5 µm) were stained with hematoxylin and eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS) and were examined at 100–400× magnification (Olympus IX70). Specimens for SEM were examined using a JEOL JSM-7401F-FE scanning electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

2.9. Statistical Analysis

For the evaluation of difference in relative frequency in positivity between groups (country, age, gender), we used the two sample test for equality of proportions without continuity correction. Differences in oocyst sizes were tested using Hotelling's multivariate version of the 2 sample *t*-test, package ICSNP: Tools for Multivariate Nonparametrics (Nordhausen et al. 2018) in R 4.1.0. [34]. The hypothesis tested was that two-dimensional mean vectors of measurement are the same in the two populations being compared.

3. Results

Cryptosporidium-specific DNA was identified in 26 squirrels by nested PCR targeting the *SSU* gene (Table 1). Of these 26 squirrels, nine (34.6%) were microscopically positive for the presence of *Cryptosporidium* oocysts, with an infection intensity ranging from 18,000 to 72,000 OPG. Microscopically detectable infection was observed exclusively in juvenile squirrels. However, the occurrence of infection detected by PCR did not differ

between juveniles (8.9%) and adults (11.8%; $\chi^2 = 0.52991$, $d.f. = 1$, p -value = 0.4666). Similarly, the occurrence of infection was not affected by host gender ($\chi^2 = 0.2966$, $d.f. = 1$, p -value = 0.5860) or country of capture ($\chi^2 = 0.0028$, $d.f. = 1$, p -value = 0.9388; Table S1). Phylogenetic trees (ML, NJ) constructed from *SSU* sequences showed the presence of *Cryptosporidium* sp. ferret genotype in all samples (Figure 2). Out of the 26 *Cryptosporidium*-positive squirrels, 26, 26, 19, 16, 15, and 26 were genotyped by sequence analysis of the *SSU*, *actin*, *HSP70*, *TRAP-C1*, *COWP*, and *gp60* genes, respectively. For the remaining samples, either the PCR product was not amplified or the sequencing failed. For the *actin*, *HSP70*, *TRAP-C1*, and *COWP* genes, isolates of *Cryptosporidium* sp. ferret genotype in this study shared 100% identity with each other and 99.8–100% identity with previously reported sequences (Figures S1–S4). Sequences of the *gp60* gene were obtained from all 26 isolates and were identified as *Cryptosporidium* sp. ferret genotype subtype families VIIIb ($n = 12$) and VIIIc ($n = 14$; Figure 3).

Microscopic, molecular, and histological examination of inoculated animals showed no evidence of infection in juvenile or adult SCID and BALB/c mice, Mongolian gerbils, guinea pigs, Southern multimammate mice, juvenile chickens, and adult budgerigars. For logistical reasons, we were unable to determine the infectivity of *Cryptosporidium* sp. ferret genotype for squirrels under experimental conditions. We therefore determined the infection intensity in squirrels of different ages kept at rescue stations. Nine of the eleven juvenile animals infected with *Cryptosporidium* sp. ferret genotype shed microscopically detectable oocysts (18,000–74,000 OPG). In contrast, oocyst numbers were below the detection limit (2000 OPG) in animals older than 10 weeks of age. The highest infection intensity was observed in animals aged 6–7 weeks (mean 49,666 OPG) compared to animals aged 4–5 weeks (mean 22,666 OPG) and 8–9 weeks (mean 21,000 OPG) (Figure 4). The consistency of the faeces and lack of faeces in the fur surrounding the rectum indicated an absence of diarrhoeal disease. Oocysts of *Cryptosporidium* sp. ferret genotype were spherical, with a thick, clear, and smooth oocyst wall. Oocysts from isolate 45901, which were measured in suspension after purification, measured $5.54 \times 5.22 \mu\text{m}$, with a length to width ratio of 1.07 (Figure 5a). There was no significant difference in oocyst size between isolate 45901 and other isolates (40793, 51489, and 53289; Table S2). Oocysts of *Cryptosporidium* sp. ferret genotype in the faecal smears stained by AVMC and ZN showed typical *Cryptosporidium* staining characteristics (Figure 5b,c) and cross-reacted with immunofluorescence reagents developed originally for *C. parvum* (Figure 5d,e). Oocysts that were dried and fixed onto slides for staining and labelling were smaller than those measured in suspension (data not shown).

Based on the data presented here, we propose *Cryptosporidium* sp. ferret genotype as a new species—*Cryptosporidium sciurinum* n. sp.—, whose description is presented below.

Table 1. The occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) trapped in the wild (W) and screened at rescue stations (RS) in the Czech Republic and Slovakia. Detected isolates were genotyped by sequence analysis of the small subunit ribosomal rRNA (SSU), actin, 70 kDa heat-shock protein (HSP70), thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1), *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP), and 60 kDa glycoprotein (gp60) gene fragments. Oocysts were quantified by microscopy and were reported per gram of faeces (OPG).

Country	Locality	Type	No. of Screened/No. of Positive	ID of Positive Animal	Microscopical Positivity	Sex/Age	Genotyping at the Gene Loci					
							SSU	Actin	HSP70	COWP	TRAP-C1	gp60
Czech Republic	(1)	W	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(2)	W	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(3)	W	5/2	48358	No	F/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	VIIIbA11GIR1
	(4)	W	2/0	50030	No	M/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	<i>C. sciurinum</i>	-	VIIIbA11GIR1
	(5)	W	15/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				47183	No	M/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	<i>C. sciurinum</i>	VIIIbA11GIR1
				47189	No	F/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	-	-	VIIIbA11GIR1
				47193	No	M/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	<i>C. sciurinum</i>	VIIIbA11GIR1
	(6)	W	1/0	47200	No	F/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	VIIIbA11GIR1
				-	-	-	-	-	-	-	-	-
				-	-	-	-	-	-	-	-	-
				-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(7)	W	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(8)	W	4/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(9)	W	3/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(10)	W	3/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(11)	W	7/1	38512	No	F/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	-	VIIIcA10G2R1
	(12)	W	3/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(13)	W	6/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(14)	W	5/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(15)	W	5/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(16)	W	3/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(17)	W	4/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(18)	W	5/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(19) J	RC	14/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(20)	RC	4/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(21)	RC	37/5	40736	Yes	F/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	VIIIcA10G2R1
				40737	Yes	M/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	VIIIcA10G2R1
				40738	Yes	F/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	VIIIcA10G2R1
				40739	Yes	M/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	VIIIcA10G2R1
	(22)	RC	23/2	40741	Yes	M/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	VIIIcA10G2R1
				41839	Yes	F/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	VIIIcA10G2R1
				41840	No	M/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	-	<i>C. sciurinum</i>	VIIIcA10G2R1
				45526	No	M/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	<i>C. sciurinum</i>	VIIIbA11GIR1
	(23)	RC	21/5	45901	Yes	F/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	VIIIbA11GIR1

Slovakia

(24)	RC	15/1	51489	Yes	M/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	VIIIbA11G1R1
(25)	RC	15/0	53289	Yes	F/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	VIIIbA11G1R1
(26)	W	8/0	51295	No	M/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	-	<i>C. sciurinum</i>	VIIIbA11G1R1
(27)	W	2/0	46479	No	F/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	-	VIIIbA11G1R1
(28)	W	5/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(29)	W	2/0	45562	No	M/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	VIIIcA10G2R1
(30)	W	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(31)	W	5/1	45560	No	F/J	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	<i>C. sciurinum</i>	VIIIcA10G2R1
(32)	W	4/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(33)	W	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(34)	W	6/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(35)	W	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(36)	W	4/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(37)	W	1/1	45561	No	F/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	VIIIcA10G2R1
(38)	W	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(39)	W	7/2	53942	No	F/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	-	<i>C. sciurinum</i>	VIIIcA10G2R1
(40)	W	8/1	53943	No	M/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	VIIIcA10G2R1
			53944	No	M/A	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	<i>C. sciurinum</i>	-	-	VIIIcA10G2R1

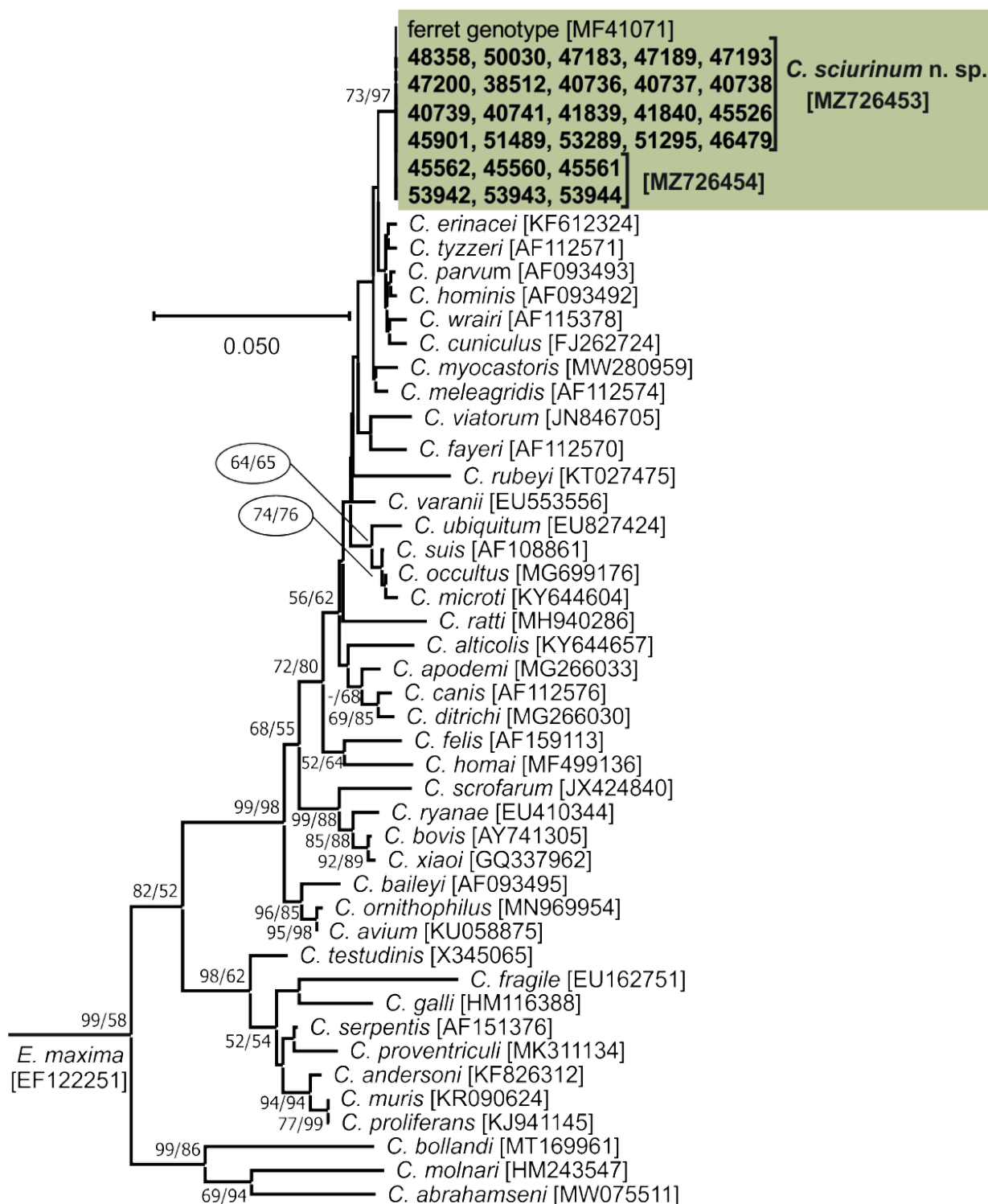


Figure 2. Evolutionary relationships of *Cryptosporidium* spp. at the small subunit rRNA (SSU) locus inferred by Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) analyses using a General Time Reversible model with a gamma distribution: Percentage support (>50%) from 1000 pseudoreplicates from ML and NJ analysis, respectively, are indicated next to supported node. The ‘-’ indicates support value <50%. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The analysis involved 70 nucleotide sequences and there were a total of 771 positions in the final dataset. The tree was rooted with the SSU sequence of *Eimeria maxima* [EF122251]. Sequences obtained in this study are identified by isolate number (e.g., 45901). The GenBank Accession number is in parenthesis. Isolates detected in this study are colour-coded.

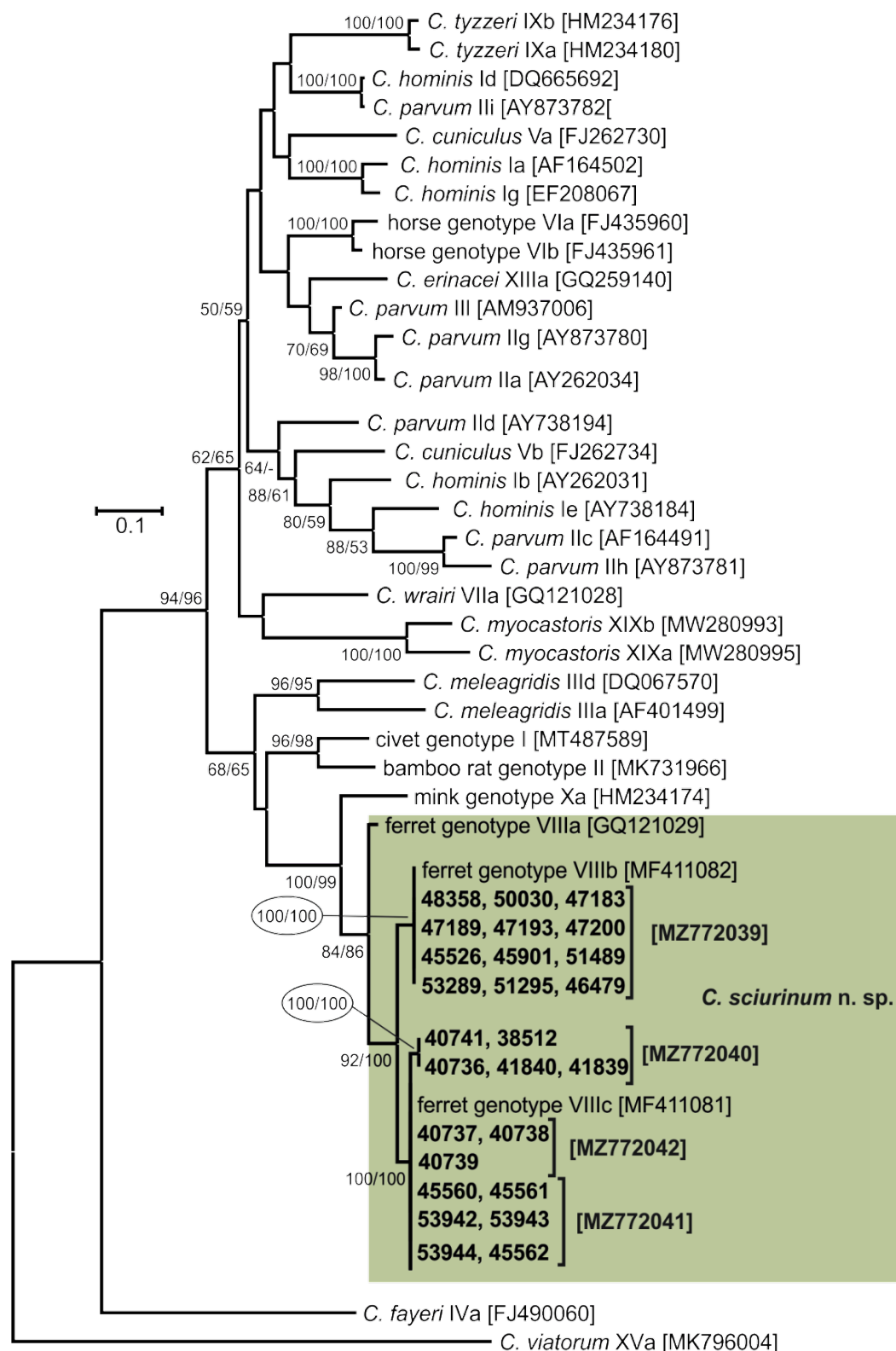


Figure 3. Evolutionary relationships of *Cryptosporidium* spp. at 60 kDa glycoprotein (*gp60*) locus inferred by Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) analyses using a General Time Reversible model with a gamma distribution: Percentage support (>50%) from 1000 pseudoreplicates from ML and NJ analysis, respectively, are indicated next to supported node. The '-' indicates support value <50%. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The analysis involved 58 nucleotide sequences and there were a total of 1134 positions in the final dataset. The tree was rooted with the *gp60* sequence of *Cryptosporidium viatorum* [MK796004]. Sequences obtained in this study are identified by isolate number (e.g., 45901). The GenBank Accession number is in parenthesis. Isolates detected in this study are colour-coded.

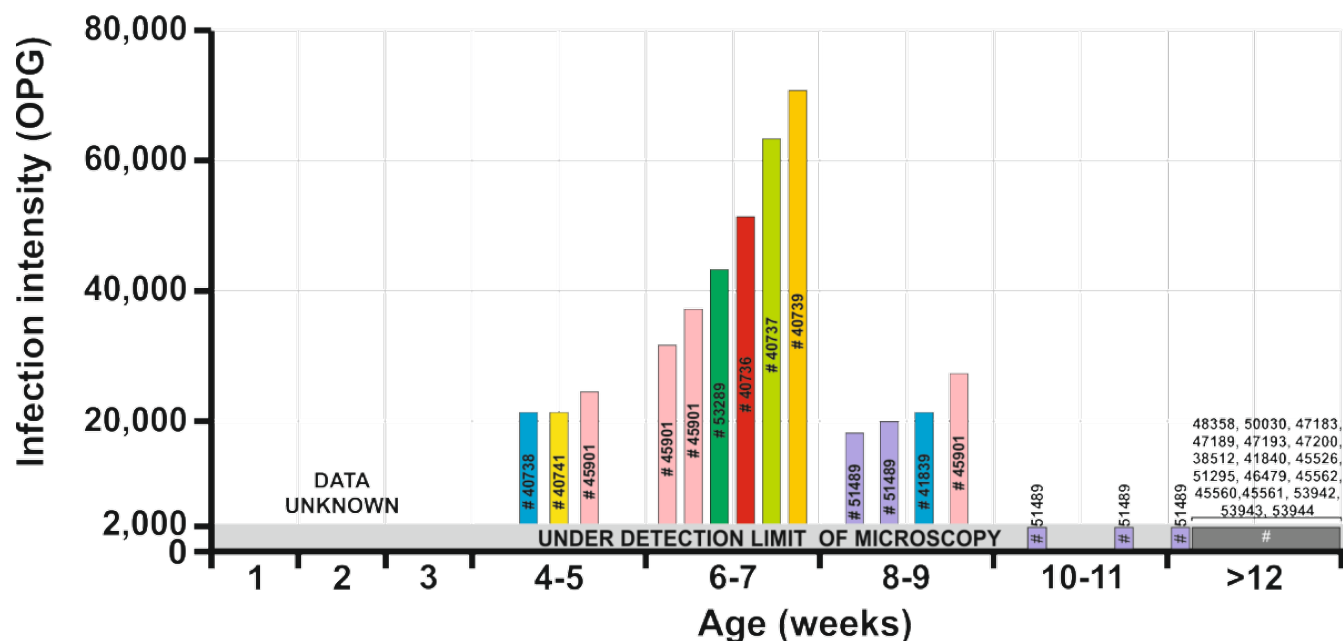


Figure 4. Infection intensity of *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) expressed as number of oocysts per gram of faeces (OPG). Data were collected from naturally infected Eurasian red squirrels. Animals aged 4–11 weeks old originated from rescue stations, and some of those animals were screened repeatedly (each animal is marked with a colour). The animal number (e.g., #45901) corresponds with the numbers in Table 1.

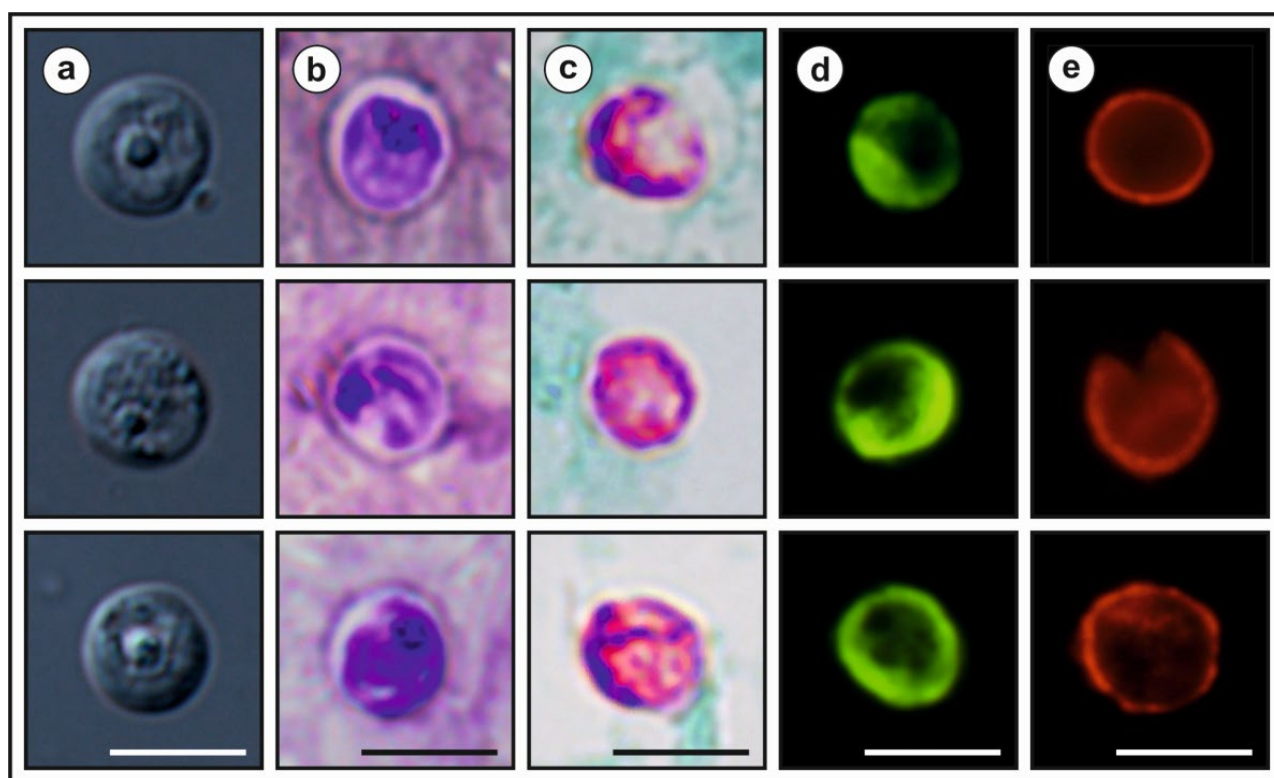


Figure 5. Oocysts of *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. (a) under differential interference contrast microscopy, (b) stained by aniline-carbol-methyl violet staining, (c) stained by Ziehl-Nielsen staining, (d) labelled with anti-*Cryptosporidium* FITC-conjugated antibody, (e) labelled with anti-*Cryptosporidium* Cy3-conjugated antibody. Bar = 5 μ m.

Taxonomic summary**Family** Cryptosporidiidae Léger, 1911**Genus** *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907*Cryptosporidium sciurinum* n. sp.**Syn:** *Cryptosporidium parvum* ferret genotype ex black-footed ferret (*Mustela nigripes*) and *Cryptosporidium* sp. ferret genotype ex black-footed ferret (*Mustela nigripes*) of Xiao et al. [35].**Type-host:** *Sciurus vulgaris* Linnaeus, 1758 (Rodentia: Muridae) Eurasian red squirrel.**Other natural hosts:** black-footed ferret (*Mustela nigripes*), Siberian chipmunk (*Tamias sibiricus*), Eastern chipmunk (*Tamias striatus*), budgerigar (*Melopsittacus undulatus*).**Type-locality:** Třeboň, Czech Republic.**Other localities:** České Budějovice, Brno, Praha, Vlašim, whole Czech Republic; Povážská Bystrica, Handlová, Gabčíkovo, Bratislava, Košice, whole Slovakia; Guangdong, China; Northern Italy; Georgia, USA.**Type-material:** Faecal smear slides with oocysts stained by ACMV and ZN staining (nos. MV1-3/45901 and ZN1-2/45901) and gDNA isolated from faecal samples of a naturally infected Eurasian red squirrel (isolate 45901) are deposited at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Czech Republic.**Site of infection:** unknown.**Distribution:** As *Cryptosporidium* sp. ferret genotype ex *Sciurus vulgaris*: China, Italy [13,16,17]; as *Cryptosporidium* sp. ferret genotype or *Cryptosporidium parvum* ferret genotype ex *Mustela nigripes*: USA [35], as *Cryptosporidium* sp. ferret genotype ex *Tamias striatus*, *T. sibiricus* and *Melopsittacus undulatus*: China [13,36].**Prepatent period:** unknown.**Patent period:** At least 5 weeks in naturally infected *Sciurus vulgaris* (isolate 51489 in the present study).**Representative DNA sequences:** Representative nucleotide sequences of SSU [MZ726453], actin [MZ772035], HSP70 [MZ772047], TRAP-C1 [MZ772037], COWP [MZ772045], and gp60 [MZ772039–MZ772042] genes are deposited in the GenBank database.**ZooBank registration:** To comply with the regulations set out in Article 8.5 of the amended 2012 version of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN) [37], details of the new species have been submitted to ZooBank. The Life Science Identifier (LSID) of the article is urn:lsid:zoobank.org:pub:83ABAD68-07C6-4E51-8234-A2AC4C0EE72C. The LSID for the new name *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. is urn:lsid:zoobank.org:act:E13F2B9F-D9C6-4ED9-9EA8-B94AEB6189A2.**Etymology:** The species name *sciurinum* is derived from the Latin noun *sciurus*, meaning squirrel.**Description.** Oocysts of *C. sciurinum* n. sp. (isolate 45901) are spherical, measuring $5.12\text{--}6.00 \times 4.77\text{--}5.66$ ($5.54 \pm 0.20 \times 5.22 \pm 0.18$) with a length-to-width ratio of $1.00\text{--}1.26$ (1.07 ± 0.05) (Figure 5). The oocyst wall is smooth and colourless (Figure 5a). The oocyst residuum is composed of numerous small granules and one spherical globule is clearly visible; a suture is not noticeable. Sporozoites are occasionally visible within oocysts. Morphology and morphometry of other developmental stages is unknown.**Remarks.** Oocysts of *C. sciurinum* n. sp. are stained by ACMV and ZN staining methods, similar to other *Cryptosporidium* spp. (Figure 5b,c), and their oocyst wall cross reacts with immunofluorescence reagents developed originally for *C. parvum* (Figure 5d,e). Oocysts from naturally infected squirrels did not differ significantly in size (Table S2). Oocysts of *C. sciurinum* n. sp. are larger than those of *C. parvum* ($T^2 = 88.89$, $df_1 = 2$, $df_2 = 61.94$, $p < 0.001$), *C. occultus* ($T^2 = 45.84$, $df_1 = 2$, $df_2 = 65.83$, $p < 0.001$) and *C. ratti* ($T^2 = 88.22$, $df_1 = 2$, $df_2 = 24.75$, $p < 0.001$), but these differences are not of practical significance for identification.

Cryptosporidium sciurinum n. sp. can be differentiated genetically from other *Cryptosporidium* species based on sequences of *SSU*, *actin*, *HSP70*, *TRAP-C1*, *COWP*, and *gp60* genes. At *gp60* locus, *C. sciurinum* n. sp. is known to form three subtype families VIIIa, VIIIb, and VIIIc.

4. Discussion

Molecular studies conducted on three continents (North America, Europe, and Asia) have shown that tree squirrels host a variety of *Cryptosporidium* spp. [9–13,16,17]. While wild North American and Asian tree squirrels can be infected by a large number of species and genotypes of the genus *Cryptosporidium* [9–13], results from this and other studies suggest that wild Eurasian red squirrels are predominantly parasitized by *C. sciurinum* n. sp. [13,16,17]. The only exceptions are two cases of *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotype I, which naturally infects grey squirrels, and two cases of *C. parvum* reported in Eurasian red squirrels in Italy [13,16,17]. In contrast to wild animals, Eurasian red squirrels kept as caged pets in China were found to be infected with *C. ratti* and *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotype III, which are specific for other hosts [13]. In the present study, 10.1% (26/258) of Eurasian red squirrels were infected with *C. sciurinum* n. sp. Previous studies of *C. sciurinum* n. sp. in Eurasian red squirrels have reported prevalences of 10.6% (13/123) and 21.5% (15/70) in Italy and 26.3% in China [13,16,17]. The prevalence range of *Cryptosporidium* is similar with that found in other wild rodents, such as 14% in *Apodemus* spp. in Europe, 27% in *Apodemus speciosus* in Japan, 16% in brown rats (*Rattus norvegicus*) in Czech Republic, 12% in muskrats (*Ondatra zibethicus*) in USA, 30% in Chinese bamboo rats (*Rhizomys sinensis*) in China, or 7–14% in voles in Europe [38–42]. Consistent with most reports describing natural infections with *Cryptosporidium* spp. in wild rodents [16,17,38,42–44], Eurasian red squirrels infected with *C. sciurinum* n. sp. shed low numbers of oocysts, often below the detection limit of microscopy. A characteristic of *C. sciurinum* n. sp. infection in Eurasian red squirrels is that mostly juveniles shed oocysts at levels that are detectable by microscopy [16,17]. This age-dependent variation in *Cryptosporidium* spp. infection intensity has been observed previously in several studies [44–49]. Juveniles are probably more susceptible to infection because of their naive and immature immune system, which permits a higher intensity of infection. The prepatent period of *C. sciurinum* n. sp. is unknown. From the results we have collected, it is clear that pups become infected at a very early age (as early as 4 weeks), and that the infection persists for more than a month. It is possible that asymptotically infected adults are a source of infection for their young, but this would need to be investigated experimentally. The pathogenicity of *C. sciurinum* n. sp. is unknown; however, based on the observations of naturally infected squirrels in rescue stations, this *Cryptosporidium* species appears to have low pathogenicity for infected individuals. This finding is consistent with previously published results [16,17].

Cryptosporidium sciurinum n. sp. was firstly identified in three naturally infected ferrets (reported as *C. parvum* ferret genotype (AF112572)) [35]. Since then, this species has been found in five captive chipmunks (*T. sibiricus* and *T. striatus*), one budgerigar (*M. undulatus*), and dozens of wild and captive Eurasian red squirrels [13,15–17,35,36], suggesting that Eurasian red squirrels are a natural host of this parasite. This is supported by the finding in the present study that *C. sciurinum* n. sp. is not infective for SCID and BALB/c mice, Mongolian gerbils, guinea pigs, Southern multimammate mice, chickens, and budgerigars. The solitary infection reported in a budgerigar [36] could be the result of environmental contamination and the passage of oocysts or specific DNA through the digestive tract of a non-specific host, as has been described previously [50–53].

Oocysts of *C. sciurinum* n. sp. measured $5.54 \times 5.22 \mu\text{m}$, which is similar in size to a previously published isolate of *C. sciurinum* n. sp. ($5.5 \times 5.2 \mu\text{m}$). *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. is larger than *C. parvum* ($5.2 \times 4.9 \mu\text{m}$) and *C. ratti* ($4.9 \times 4.6 \mu\text{m}$), and is smaller than *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotype I ($5.8 \times 5.4 \mu\text{m}$), a species previously reported in Eurasian red squirrels [16,40]. However, the difference in size is not practically useful for distinguishing species by routine microscopy.

Although a description of oocyst morphology is a requirement for species description, molecular characterisation is necessary for species identification. Several previous studies have shown the presence of divergent copies of *SSU* gene within a *Cryptosporidium* species. Stenger et al. [54] found highly divergent *SSU* genotypes in *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotype II. The co-occurrence of the genotypes in a host and the homogeneity of actin and *HSP70* sequences supported the conclusion that the divergent types are paralogs in a single *Cryptosporidium* lineage. Similarly, divergent types of *SSU* have been reported within, e.g., *C. andersoni*, *C. apodemi*, *C. ditrichi*, *C. parvum*, *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* sp. apodemus genotype I and II, or *Cryptosporidium* rat genotype II and III [15,42,43,55,56]. As inferring the evolutionary relationships of *Cryptosporidium* spp. using *SSU* sequences alone can lead to erroneous conclusions [54,57,58], we included other polymorphic loci for our analyses. Although some previous studies have shown polymorphism in actin, *HSP70*, and *TRAP-C1* genes in *Cryptosporidium* spp. [42,43,56], studies from our group and others have failed to find variants of these genes in *C. sciurinum* n. sp. [17,24,25]. All isolates of *C. sciurinum* n. sp. from the present study shared 100% identity at the COWP locus and differed from a sequence obtained from ferret (*Mustela putorius furo*) in Japan (AB469366) by a synonymous SNP (C/T) at position 387. A similar synonymous SNP at the COWP locus was observed in geographically distinct isolates of *C. tyzzeri* [59].

Phylogenetic analyses of *C. sciurinum* n. sp. at *SSU*, actin, *HSP70*, *TRAP-C1*, COWP, and *gp60* loci confirmed its status as a separate species from valid *Cryptosporidium* species. At all loci, *C. sciurinum* n. sp. formed a separate clade within the group of intestinal *Cryptosporidium* spp. that includes *C. meleagridis*, *C. parvum*, *C. hominis*, *C. wrairi*, and *C. tyzzeri*. At actin, *HSP70*, *TRAP-C1*, and COWP loci, the pairwise distances between *C. sciurinum* n. sp. and *C. meleagridis* (0.026, 0.036, 0.050, and 0.024, respectively) are similar to those between *C. andersoni* and *C. muris* (0.037, 0.018, 0.041, and 0.018, respectively) and *C. hominis* and *C. parvum* (0.018, 0.013, 0.018, and 0.016, respectively).

At the *gp60* locus, only subtype families VIIIb and VIIIc were detected in the present study. Both subtypes have been found exclusively in Europe. In contrast, subtype VIIla was found exclusively in China [13]. Other studies have found that *gp60* subtype families differ in their geographic distribution. For example, *C. tyzzeri* subtype IXa has been detected only in house mice (*Mus musculus musculus*) inhabiting Eastern Europe, China, and Kuwait, while subtype IXb is found (*Mus musculus domesticus*) in Western Europe, USA, and New Zealand [59]. A similar difference in distribution has been reported for *C. parvum* and *C. ubiquitum* *gp60* subtypes [57,60]. It should be noted that *gp60* subtype family VIIId was incorrectly reported in Eurasian red squirrels in Italy (the sequences actually belonged to *C. parvum* subtype IIa) and it should no longer be used for *C. sciurinum* n. sp. [17].

5. Conclusions

In summary, the present study confirms that *Cryptosporidium* sp. ferret genotype is genetically distinct from all currently accepted species of the genus *Cryptosporidium*, and its specificity for tree squirrels under natural conditions supports its description as a new species, which we propose be named *Cryptosporidium sciurinum* n. sp.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms9102050/s1: **Figure S1.** Evolutionary relationships of *Cryptosporidium* spp. at the actin locus inferred by Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) analyses using the Tamura-3-parameter model with a gamma distribution: Percentage support (>50%) from 1000 pseudoreplicates from ML and NJ analysis, respectively, are indicated next to supported node. The '-' indicates support value <50%. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The analysis involved 69 nucleotide sequences and there were a total of 727 positions in the final dataset. The tree was rooted with the actin sequence of *Plasmodium* sp. [KF159609]. Sequences obtained in this study are identified by isolate number (e.g., 45901). The GenBank Accession number is in parenthesis. Isolates

detected in this study are colour-coded. **Figure S2.** Evolutionary relationships of *Cryptosporidium* spp. at 70 kDa heat-shock protein (*HSP70*) locus inferred by Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) analyses using a General Time Reversible model with a gamma distribution: Percentage support (>50%) from 1000 pseudoreplicates from ML and NJ analysis, respectively, are indicated next to supported node. The ‘-’ indicates support value <50%. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The analysis involved 69 nucleotide sequences and there were a total of 1728 positions in the final dataset. The tree was rooted with the *HSP70* sequence of *Eimeria maxima* [Z46964]. Sequences obtained in this study are identified by isolate number (e.g., 45901). The GenBank Accession number is in parenthesis. Isolates detected in this study are colour-coded. **Figure S3.** Evolutionary relationships of *Cryptosporidium* spp. at thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium-1* (*TRAP-C1*) locus inferred by Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) analyses using a General Time Reversible model with a gamma distribution: Percentage support (>50%) from 1000 pseudoreplicates from ML and NJ analysis, respectively, are indicated next to supported node. The ‘-’ indicates support value <50%. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The analysis involved 29 nucleotide sequences and there were a total of 470 positions in the final dataset. The tree was rooted with the *TRAP-C1* sequence of gastric *Cryptosporidium* spp. Sequences obtained in this study are identified by isolate number (e.g., 45901). The GenBank Accession number is in parenthesis. Isolates detected in this study are colour-coded. **Figure S4.** Evolutionary relationships of *Cryptosporidium* spp. at *Cryptosporidium* oocyst wall protein (*COWP*) locus inferred by Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) analyses using a General Time Reversible model with a gamma distribution: Percentage support (>50%) from 1000 pseudoreplicates from ML and NJ analysis, respectively, are indicated next to supported node. The ‘-’ indicates support value <50%. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The analysis involved 41 nucleotide sequences and there were a total of 477 positions in the final dataset. The tree was rooted with the *COWP* sequence of gastric *Cryptosporidium* spp. Sequences obtained in this study are identified by isolate number (e.g., 45901). The GenBank Accession number is in parenthesis. Isolates detected in this study are colour-coded. **Table S1.** Occurrence of *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. in faeces of Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) based on microscopic and molecular examination. **Table S2.** Size of *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. oocysts obtained from naturally infected Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*).

Author Contributions: Conceptualization, M.K., J.J. and J.P.; methodology, D.R. and B.S.; software, M.R.; validation, J.P., J.J., M.K. and B.S.; formal analysis, J.P., J.J., N.H., R.K. and B.S.; investigation, J.J., J.P., N.H., B.S., D.R. and R.K.; resources, D.R., J.J., J.P., N.H. and B.S.; data curation, J.P., J.J., J.M. and M.R.; writing—original draft preparation, J.P. and J.J.; writing—review and editing, M.K. and J.M.; visualization, B.S. and M.K.; supervision, M.K. and J.M.; project administration, M.K.; funding acquisition, M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by GACR 21-23773S, and the Grant Agency of the University of South Bohemia (028/2019/Z).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee of the Biology Centre of CAS (MZP/2019/603/1411 approved 10 June 2019, and 35/2018 1 May 2018).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or Supplementary Material.

Acknowledgments: We acknowledge the Laboratory of Electron Microscopy, Institute of Parasitology, Biology Centre, CAS supported by the MEYS CR (LM2015062 *Czech-Bioimaging*) for the preparation of specimens for electron microscopy.

Conflicts of Interest: None of the authors has any competing interest in the manuscript.

References

1. Nader, J.L.; Mathers, T.C.; Ward, B.J.; Pachebat, J.A.; Swain, M.T.; Robinson, G.; Chalmers, R.M.; Hunter, P.R.; van Oosterhout, C.; Tyler, K.M. Evolutionary genomics of anthroponosis in *Cryptosporidium*. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 826–836, doi:10.1038/s41564-019-0377-x.
2. Caccio, S.M.; Putignani, L. Epidemiology of Human Cryptosporidiosis. In *Cryptosporidium: Parasite and Disease*, 1st ed.; Caccio, S.M., Widmer, G., Eds.; Springer: Vienna, Austria, 2014; pp. 43–80.

3. Kváč, M.; McEvoy, J.; Stenger, B.; Clark, M. Cryptosporidiosis in other vertebrates. In *Cryptosporidium: Parasite and Disease*, 1st ed.; Cacciò, S.M., Widmer, G., Eds. Springer: Vienna, Austria, 2014; pp. 237–326.
4. Zahedi, A.; Bolland, S.J.; Oskam, C.L.; Ryan, U. *Cryptosporidium abrahamseni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from red-eye tetra (*Moenkhausia sanctaefilomenae*). *Exp. Parasitol.* **2021**, *223*, 108089, doi:10.1016/j.exppara.2021.108089.
5. Ryan, U.M.; Monis, P.; Enemark, H.L.; Sulaiman, I.; Samarasinghe, B.; Read, C.; Buddle, R.; Robertson, I.; Zhou, L.; Thompson, R.C.A.; et al. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* **2004**, *90*, 769–773.
6. Bujila, I.; Troell, K.; Fischerstrom, K.; Nordahl, M.; Killander, G.; Hansen, A.; Soderlund, R.; Lebbad, M.; Beser, J. *Cryptosporidium* chipmunk genotype I—An emerging cause of human cryptosporidiosis in Sweden. *Infect. Genet. Evol.* **2021**, *92*, 104895, doi:10.1016/j.meegid.2021.104895.
7. Sundberg, J.P.; Hill, D.; Ryan, M.J. Cryptosporidiosis in a gray squirrel. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1982**, *181*, 1420–1422.
8. Current, W.L. *Cryptosporidium* spp. In *Parasitic Infections in the Compromised Host*; Walzer, P.D., Genta, R.M., Eds.; Dekker: New York, NY, USA, 1990; pp. 281–341.
9. Stenger, B.L.; Clark, M.E.; Kváč, M.; Khan, E.; Giddings, C.W.; Prediger, J.; McEvoy, J.M. North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes. *Infect. Genet. Evol.* **2015**, *36*, 287–293, doi:10.1016/j.meegid.2015.10.002.
10. Ziegler, P.E.; Wade, S.E.; Schaaf, S.L.; Chang, Y.F.; Mohammed, H.O. *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York City watershed. *J. Wildl. Dis.* **2007**, *43*, 586–596.
11. Ziegler, P.E.; Wade, S.E.; Schaaf, S.L.; Stern, D.A.; Nadareski, C.A.; Mohammed, H.O. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Vet. Parasitol.* **2007**, *147*, 176–184, doi:10.1016/j.vetpar.2007.03.024.
12. Feng, Y.; Alderisio, K.A.; Yang, W.; Blancero, L.A.; Kuhne, W.G.; Nadareski, C.A.; Reid, M.; Xiao, L. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 6475–6483, doi:10.1128/AEM.01034-07.
13. Lv, C.; Zhang, L.; Wang, R.; Jian, F.; Zhang, S.; Ning, C.; Wang, H.; Feng, C.; Wang, X.; Ren, X.; et al. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in china: Prevalence and molecular characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7692–7699.
14. Chai, Y.J.; Deng, L.; Liu, H.F.; Yao, J.X.; Zhong, Z.J.; Xiang, L.Q.; Fu, H.L.; Shen, L.H.; Zhou, Z.Y.; Deng, J.L.; et al. First detection of *Cryptosporidium* spp. in red-bellied tree squirrels (*Callosciurus erythraeus*) in China. *Parasite* **2019**, *26*, 28, doi:10.1051/parasite/2019029.
15. Deng, L.; Chai, Y.; Luo, R.; Yang, L.; Yao, J.; Zhong, Z.; Wang, W.; Xiang, L.; Fu, H.; Liu, H.; et al. Occurrence and genetic characteristics of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bienersi* in pet red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in China. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1026, doi:10.1038/s41598-020-57896-w.
16. Kváč, M.; Hofmannová, L.; Bertolino, S.; Wauters, L.; Tosi, G.; Modrý, D. Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitol.* **2008**, *55*, 95–99.
17. Prediger, J.; Horčíková, M.; Hofmannová, L.; Sak, B.; Ferrari, N.; Mazzamuto, M.V.; Romeo, C.; Wauters, L.A.; McEvoy, J.; Kváč, M. Native and introduced squirrels in Italy host different *Cryptosporidium* spp. *Eur. J. Protistol.* **2017**, *61*, 64–75, doi:10.1016/j.ejop.2017.09.007.
18. Wauters, L.; Dhondt, A.A. Body-Weight, Longevity and Reproductive Success in Red Squirrels (*Sciurus vulgaris*). *J. Anim. Ecol.* **1989**, *58*, 637–651, doi:10.2307/4853.
19. Miláček, P.; Vítovec, J. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* **1985**, *32*, 50.
20. Kváč, M.; Ondráčková, Z.; Květoňová, D.; Sak, B.; Vítovec, J. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* **2007**, *143*, 229–233, doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.031.
21. Arrowood, M.J.; Donaldson, K. Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *J. Eukaryot. Microbiol.* **1996**, *43*, 895.
22. Sauch, J.F.; Flanagan, D.; Galvin, M.L.; Berman, D.; Jakubowski, W. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 3243–3247.
23. Xiao, L.; Escalante, L.; Yang, C.; Sulaiman, I.; Escalante, A.A.; Montali, R.J.; Fayer, R.; Lal, A.A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1578–1583.
24. Sulaiman, I.M.; Morgan, U.M.; Thompson, R.C.; Lal, A.A.; Xiao, L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2385–2391, doi:10.1128/AEM.66.6.2385-2391.2000.
25. Sulaiman, I.M.; Lal, A.A.; Xiao, L.H. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J. Parasitol.* **2002**, *88*, 388–394, doi:10.1645/0022-3395(2002)088[0388:MPAERO]2.0.CO;2.
26. Spano, F.; Putignani, L.; Naitza, S.; Puri, C.; Wright, S.; Crisanti, A. Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *92*, 147–162.
27. Jiang, J.; Alderisio, K.A.; Xiao, L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4446–4454, doi:10.1128/AEM.71.8.4446-4454.2005.
28. Spano, F.; Puri, C.; Ranucci, L.; Putignani, L.; Crisanti, A. Cloning of the entire COWP gene of *Cryptosporidium parvum* and ultrastructural localization of the protein during sexual parasite development. *Parasitology* **1997**, *114* Pt 5, 427–437.
29. Alves, M.; Xiao, L.H.; Sulaiman, I.; Lal, A.A.; Matos, O.; Antunes, F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 2744–2747, doi:10.1128/JCM.41.6.2744-2747.2003.

30. Hall, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
31. Henriksen, S.A.; Pohlenz, J.F. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.* **1981**, *22*, 594–596.
32. Kváč, M.; Vítovec, J. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med. B* **2003**, *50*, 451–457, doi:10.1046/j.0931-1793.2003.00701.x.
33. Holubová, N.; Zikmundová, V.; Limpouchová, Z.; Sak, B.; Konečný, R.; Hlášková, L.; Rajský, D.; Kopacz, Z.; McEvoy, J.; Kváč, M. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *Eur. J. Protistol.* **2019**, *69*, 70–87, doi:10.1016/j.ejop.2019.03.001.
34. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2019.
35. Xiao, L.; Morgan, U.M.; Limor, J.; Escalante, A.; Arrowood, M.; Shulaw, W.; Thompson, R.C.; Fayer, R.; Lal, A.A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 3386–3391.
36. Li, Q.; Li, L.; Tao, W.; Jiang, Y.; Wan, Q.; Lin, Y.; Li, W. Molecular investigation of *Cryptosporidium* in small caged pets in north-east China: Host specificity and zoonotic implications. *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 2905–2911, doi:10.1007/s00436-016-5076-4.
37. ICZN. International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the international code of zoological nomenclature to expand and refine methods of publication. *Bull. Zool. Nomencl.* **2012**, *69*, 161–169.
38. Stenger, B.L.S.; Horčíčková, M.; Clark, M.E.; Kváč, M.; Čondlová, S.; Khan, E.; Widmer, G.; Xiao, L.; Giddings, C.W.; Pennil, C.; et al. *Cryptosporidium* infecting wild cricetid rodents from the subfamilies Arvicolinae and Neotominae. *Parasitology* **2017**, *145*, 326–334, doi:10.1017/S0031182017001524.
39. Li, F.L.; Zhang, Z.J.; Hu, S.H.; Zhao, W.T.; Zhao, J.G.; Kváč, M.; Guo, Y.Q.; Li, N.; Feng, Y.Y.; Xiao, L.H. Common occurrence of divergent *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* subtypes in farmed bamboo rats (*Rhizomys sinensis*). *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 149, doi:10.1186/s13071-020-04021-5.
40. Ježková, J.; Prediger, J.; Holubová, N.; Sak, B.; Konečný, R.; Feng, Y.; Xiao, L.; Rost, M.; McEvoy, J.; Kváč, M. *Cryptosporidium ratti* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in the Czech Republic. *Parasitology* **2021**, *148*, 84–97, doi:10.1017/S0031182020001833.
41. Murakoshi, F.; Fukuda, Y.; Matsubara, R.; Kato, Y.; Sato, R.; Sasaki, T.; Tada, C.; Nakai, Y. Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Vet. Parasitol.* **2013**, *196*, 184–188, doi:10.1016/j.vetpar.2013.02.011.
42. Čondlová, S.; Horčíčková, M.; Havrdová, N.; Sak, B.; Hlášková, L.; Perec-Matysiak, A.; Kicia, M.; McEvoy, J.; Kváč, M. Diversity of *Cryptosporidium* spp. in *Apodemus* spp. in Europe. *Eur. J. Protistol.* **2019**, *69*, 1–13, doi:10.1016/j.ejop.2019.02.005.
43. Čondlová, S.; Horčíčková, M.; Sak, B.; Květoňová, D.; Hlášková, L.; Konečný, R.; Stanko, M.; McEvoy, J.; Kváč, M. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. *Eur. J. Protistol.* **2018**, *63*, 1–12, doi:10.1016/j.ejop.2017.12.006.
44. Horčíčková, M.; Čondlová, S.; Holubová, N.; Sak, B.; Květoňová, D.; Hlášková, L.; Konečný, R.; Sedláček, F.; Clark, M.; Giddings, C.; et al. Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology* **2019**, *146*, 220–233, doi:10.1017/S0031182018001142.
45. Holubová, N.; Sak, B.; Hlášková, L.; Květoňová, D.; Hanzal, V.; Rajský, D.; Rost, M.; McEvoy, J.; Kváč, M. Host specificity and age-dependent resistance to *Cryptosporidium avium* infection in chickens, ducks and pheasants. *Exp. Parasitol.* **2018**, *191*, 62–65, doi:10.1016/j.exppara.2018.06.007.
46. Pavlásek, I. Findings of cryptosporidia in the stomach of hens and of exotic and wild birds. *Veterinářství (Czech)* **2001**, *51*, 103–108.
47. Sreter, T.; Varga, I.; Bekesi, L. Age-dependent resistance to *Cryptosporidium baileyi* infection in chickens. *J. Parasitol.* **1995**, *81*, 827–829, doi:10.2307/3283992.
48. Rhee, J.K.; So, W.S.; Kim, H.C. Age-dependent resistance to *Cryptosporidium muris* (strain MCR) infection in golden hamsters and mice. *Korean J. Parasitol.* **1999**, *37*, 33–37.
49. Kváč, M.; Sak, B.; Květoňová, D.; Secor, W.E. Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet. Parasitol.* **2009**, *163*, 33–38, doi:10.1016/j.vetpar.2009.03.047.
50. Kváč, M.; Kestřánová, M.; Květoňová, D.; Kotková, M.; Ortega, Y.; McEvoy, J.; Sak, B. *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Exp. Parasitol.* **2012**, *131*, 107–110, doi:10.1016/j.exppara.2012.03.016.
51. Graczyk, T.K.; Cranfield, M.R. Experimental transmission of *Cryptosporidium* oocyst isolates from mammals, birds and reptiles to captive snakes. *Vet. Res.* **1998**, *29*, 187–195.
52. Graczyk, T.K.; Cranfield, M.R.; Fayer, R. Oocysts of *Cryptosporidium* from snakes are not infectious to ducklings but retain viability after intestinal passage through a refractory host. *Vet. Parasitol.* **1998**, *77*, 33–40.
53. Crawshaw, G.J.; Mehren, K.G. Cryptosporidiosis in Zoo and Wild Animals. In *Erkrankungen der Zootiere, Verhandlungsbericht des 29. Proceedings of the Internationalen Symposiums Über die Erkrankungen der Zootiere*, Cardiff, UK, 20–24 May 1987; Internationales Symposium über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Berlin, Germany, 1987; pp. 353–362.
54. Stenger, B.L.; Clark, M.E.; Kváč, M.; Khan, E.; Giddings, C.W.; Dyer, N.W.; Schultz, J.L.; McEvoy, J.M. Highly divergent 18S rRNA gene paralogs in a *Cryptosporidium* genotype from eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Infect. Genet. Evol.* **2015**, *32*, 113–123, doi:10.1016/j.meegid.2015.03.003.
55. Le Blancq, S.M.; Khramtsov, N.V.; Zamani, F.; Upton, S.J.; Wu, T.W. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *90*, 463–478, doi:10.1016/s0166-6851(97)00181-3.

-
56. Ng-Hublin, J.S.; Singleton, G.R.; Ryan, U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rats and mice from rural communities in the Philippines. *Infect. Genet. Evol.* **2013**, *16*, 5–12, doi:10.1016/j.meegid.2013.01.011.
 57. Li, N.; Xiao, L.; Alderisio, K.; Elwin, K.; Cebelinski, E.; Chalmers, R.; Santin, M.; Fayer, R.; Kváč, M.; Ryan, U.; et al. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 217–224, doi:10.3201/eid2002.121797.
 58. Ježková, J.; Limpouchová, Z.; Prediger, J.; Holubová, N.; Sak, B.; Konečný, R.; Květoňová, D.; Hlášková, L.; Rost, M.; McEvoy, J.; et al. *Cryptosporidium myocastoris* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae), the Species Adapted to the Nutria (*Myocastor coypus*). *Microorganisms* **2021**, *9*, 813, doi:10.3390/microorganisms9040813.
 59. Kváč, M.; McEvoy, J.; Loudová, M.; Stenger, B.; Sak, B.; Květoňová, D.; Ditrich, O.; Rašková, V.; Moriarty, E.; Rost, M.; et al. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *Int. J. Parasitol.* **2013**, *43*, 805–817, doi:10.1016/j.ijpara.2013.04.007.
 60. Xiao, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp. Parasitol.* **2010**, *124*, 80–89.