

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Živočišné biotechnologie

Katedra: Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Vedoucí katedry: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

Diplomová práce

Diverzita kryptosporidií infikujících hlodavce rodu
Apodemus v České republice

Autor: Bc. Šárka Čondlová

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

České Budějovice, duben 2013

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

.....
Bc. Šárka Čondlová

Tímto bych chtěla poděkovat všem, kteří mi byli nápomocni při mé práci. Největší poděkování patří mému školiteli doc. Ing. Martinu Kváčovi, PhD., za odborné vedení mé práce, ochotu a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat všem pracovníkům laboratoře Veterinární a humánní protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za ochotu, cenné rady a přátelské jednání.

Velké poděkování patří i mé rodině za podporu a vytvoření vhodných podmínek pro studium. A dále také Janu Veselému za ochotu, pochopení a výpomoc při odchycích.

Tato studie byla finančně podpořena grantovou agenturou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (011/2013/Z) a grantovým projektem Ministerstva školství, tělovýchovy a mládeže Kontakt II (LH11061).

Abstract

V průběhu roku 2012 byli na 10 vybraných lokalitách v České republice vyšetřeni volně žijící hlodavci z rodu *Apodemus* na přítomnost kryptosporidiových infekcí. Celkem bylo odebráno 207 vzorků trusu, 182 vzorků z myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) a 25 kusů myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*), a vyšetřeno na přítomnost *Cryptosporidium* spp. pomocí specifického barvení anilin-karbol-methyl violetí a molekulárními metodami. Mikroskopické vyšetření vzorků odhalilo přítomnost oocyst *Cryptosporidium* sp. ve 24 vzorcích myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) a v 1 vzorku myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*). Genomová DNA byla izolována jak z mikroskopicky pozitivních, tak negativních vzorků. Pomocí nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) byla detekována přítomnost specifické DNA kryptosporidií ve 25 vzorcích. Stejných výsledků bylo dosaženo i u nested PCR amplifikující gen kódující aktin. Všechny mikroskopicky pozitivní vzorky byly současně i PCR pozitivní. Pouze 19 vzorků bylo úspěšně sekvenováno a následné fylogenetické analýzy ukázaly přítomnost 2 nových genotypů. První genotyp je fylogeneticky nejbližší *C. ubiquitum* (1 vzorek) a druhý genotyp (obsahující několik podskupin) je fylogeneticky příbuzný s *Cryptosporidium canis* (18 vzorků). Nové genotypy se zdají být hostitelsky specifické, nicméně tato hypotéza musí být v budoucnu ověřena pomocí experimentálních infekcí. Dle našich znalostí se jedná o první popis těchto genotypů u zástupců rodu *Apodemus* a současně o první popis vůbec.

Klíčová slova: *Cryptosporidium* spp.; *Apodemus*; diverzita; PCR

Summary

We investigated the species and genotypes of *Cryptosporidium* infecting wild rodents from the genus *Apodemus* in ten areas in the year 2012 in the Czech Republic. A total of 207 faecal samples, 182 samples of *Apodemus flavicollis* and 25 of *Apodemus sylvaticus*, were screened for presence of *Cryptosporidium* spp. using both the aniline-carbol-methyl violet staining method and molecular tools. Microscopy examination revealed the presence of *Cryptosporidium* sp. oocyst in 24 samples of *Apodemus flavicollis* and 1 sample of *Apodemus sylvaticus*. Genomic DNA was isolated from both microscopy positive and negative samples. Using the nested PCR amplifying gene encoding the small ribosomal subunit (SSU rRNA) 25 samples were detected positive for the presence of *Cryptosporidium*-specific DNA. The same results were obtained also in the nested PCR amplifying gene encoding actin. All microscopy positive samples were also PCR positive. Only 19 samples were successfully sequenced, following phylogeny analyses showed presence of two new genotypes. First genotype is phylogenetically related to *Cryptosporidium ubiquitum* (1 sample) and the second genotype (consisting of several subgroups) related to *C. canis* (18 samples). The new genotypes seem to be host specific, however this hypothesis needs to be verified using experimental infection in the future. This is the first report of these *Cryptosporidium* genotypes in *Apodemus* spp. and for the first time ever.

Keywords: *Cryptosporidium* spp.; *Apodemus*; diversity; PCR

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod..... | 8 |
| 2. Literární přehled..... | 9 |
| 2.1 Historie..... | 9 |
| 2.2 Taxonomie | 9 |
| 2.3 Přenos infekce | 10 |
| 2.4 Životní cyklus..... | 11 |
| 2.5 Hostitelská specifita..... | 12 |
| 2.6 Klinické příznaky kryptosporidiózy | 13 |
| 2.7 Průběh infekce..... | 13 |
| 2.8 Terapie a prevence..... | 14 |
| 2.9 Kryptosporidie a kryptosporidióza hlodavců | 14 |
| 2.9.1 Kryptosporidie a kryptosporidióza podčeledi pravé myši (Murinae) | 15 |
| 2.10 Charakteristika zástupců rodu Myšice (<i>Apodemus</i>) vyskytujících se v České republice | 17 |
| 2.10.1 Myšice lesní (<i>Apodemus flavicollis</i>) | 18 |
| 2.10.2 Myšice křovinná (<i>Apodemus sylvaticus</i>) | 18 |
| 2.10.3 Myšice temnopásá (<i>Apodemus agrarius</i>) | 19 |
| 2.10.4 Myšice malooká (<i>Apodemus microps</i>) | 20 |
| 3. Cíle práce..... | 21 |
| 4. Materiál a metody | 22 |
| 4.1 Lokality | 22 |
| 4.2 Návnada a pasti | 24 |
| 4.3 Odběr vzorků..... | 24 |
| 4.4 Barvení mikroskopických preparátů dle Miláčka a Vítovce..... | 24 |
| 4.5 Morfometrická analýza oocyst | 25 |
| 4.6 Izolace DNA..... | 25 |
| 4.7 PCR - polymerázová řetězová reakce..... | 26 |
| 4.8 Elektorforéza | 29 |
| 4.9 Izolace z gelu..... | 29 |
| 4.10 Vyhodnocení intenzity infekce..... | 29 |
| 4.11 Sekvenace..... | 30 |
| 4.12 Fylogenetická analýza..... | 30 |
| 4.13 Statistická analýza | 30 |
| 5. Výsledky | 31 |
| 5.1 Výskyt a prevalence kryptosporidií na základě mikroskopického vyšetření | 31 |
| 5.2 Genotypizace..... | 32 |
| 5.3 Morfologie oocyst | 35 |
| 5.4 Vliv věku na výskyt a prevalenci kryptosporidií u myšic | 36 |
| 5.5 Vliv pohlaví na výskyt a prevalenci kryptosporidií u myšic | 36 |
| 5.6 Vliv průjmu na výskyt a prevalenci kryptosporidií u myšic | 37 |
| 6. Diskuze | 38 |
| 7. Závěry..... | 40 |
| 8. Seznam literatury | 41 |

1. Úvod

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou jednobuněční, obligátní parazitičtí prvoci s epiplazmatickou lokalizací endogenních vývojových stádií, kteří infikují buňky gastrointestinální soustavy celé řady obratlovců (ryb, obojživelníků, plazů, ptáků a savců) včetně lidí (Dubey et al. 2002; Fayer et al. 2000; Ziegler et al. 2007). U imunokompetentních jedinců způsobují tyto prvoci vodnatý průjem, ale u pacientů se sníženou imunitou mohou způsobovat dehydratující chronické průjmy s fatálními následky (Guk et al. 2004; Sunnotel et al. 2006).

K popsání prvních druhů kryptosporidií došlo již na počátku 20. století, ale až na konci 20. století byly kryptosporidie uznány jako významné patogeny. Jako první popsal v roce 1907 Ernest Edvard Tyzzer životní cyklus tohoto prvoka, kterého našel ve sliznici žaludku laboratorních myší a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). V roce 1912 byl stejným autorem popsán další druh kryptosporidií s vývojovým cyklem v tenkém střevě myší nazvaný jako *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). V dnešní době je známo více než 30 druhů kryptosporidií a velké množství jejich genotypů (Kváč et al. 2013a).

Hlodavci v mnoha ekosystémech představují jeden z hlavních zdrojů potravy pro predátory, rychle se množí a mohou fungovat i jako vektory mnoha chorob. Jejich všudypřítomnost ve volné přírodě a synantropní způsob života může představovat významný zdroj infekčních agens jak pro hospodářská zvířata, tak především pro člověka. U zástupců podčeledi *Murinae* (pravé myši) byly popsány přirozené infekce různými druhy a genotypy rodu *Cryptosporidium*, např. *C. andersoni*, *C. muris*, *C. parvum* nebo *C. tyzzeri*, přičemž všechny zmíněné druhy kryptosporidií jsou současně infekční pro člověka (Rašková et al. 2013). Do současné doby byly přirozené infekce u myšic studovány jen v několika málo případech, nicméně všechny práce byly založeny pouze na mikroskopické detekci a morfologických odlišnostech exogenních vývojových stádií (např. Bajer 2008; Bajer et al. 2001; Bednarska et al. 2007).

2. Literární přehled

2.1 Historie

K popsání prvních druhů kryptosporidií došlo již na počátku 20. století, ale až na konci 20. století byly kryptosporidie uznány jako významné patogeny.

Jako první popsal Ernest Edvard Tyzzer v roce 1907 životní cyklus tohoto prvoka, kterého našel ve sliznici žaludku laboratorních myší a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). V roce 1912 byl stejným autorem popsán další druh kryptosporidií s vývojovým cyklem v tenkém střevě myší nazvaný jako *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). V pořadí třetím druhem rodu kryptosporidium bylo *C. meleagridis* popsáné u krůt v roce 1955 (Slavin 1955). Jako původci průjmových onemocnění skotu jsou kryptosporidie zmiňovány v roce 1970 (Meutin et al. 1974; Panciera et al. 1971) a v roce 1976 dochází i k nálezu parazita rodu *Cryptosporidium* u imunokompromitovaných lidí (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976).

2.2 Taxonomie

Kryptosporidie se v současné době řadí do čeledi *Cryptosporiidae* v rámci kmene Apicomplexa. Dříve byly kryptosporidie na základě vývojového cyklu v gastrointestinálním traktu nesprávně řazeny mezi kokcidie (Fayer et al. 1997). Pozdější molekulární analýzy však odhalily bližší příbuznost s gregarinami (Gregarinasina) než s kokcidiemi (Coccidiasina) (Carreno et al. 1999).

V současné době je známo více než 30 druhů kryptosporidií a velké množství jejich genotypů (Kváč et al. 2013a). Platné druhy rodu *Cryptosporidium* spolu s jejich typickými hostiteli jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Platné druhy kryptosporidií se svými typickými hostiteli.

| Název druhu | Typický hostitel |
|-----------------------------|---|
| <i>C. andersoni</i> | Skot (<i>Bos taurus</i>) |
| <i>C. baileyi</i> | Kuře (<i>Gallus gallus</i>) |
| <i>C. bovis</i> | Skot (<i>Bos taurus</i>) |
| <i>C. canis</i> | Pes (<i>Canis familiaris</i>) |
| <i>C. cichlidis</i> | Ryby (<i>Pterophyllum scalare</i>) |
| <i>C. cuniculus</i> | Králík (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) |
| <i>C. ducismarci</i> | Želvy (<i>Malacochersus tornieri</i> , <i>Testudo marginata</i> , <i>Testudo horsfieldii</i>) |
| <i>C. fayeri</i> | Klokan (<i>Macropus rufus</i>) |
| <i>C. felis</i> | Kočka (<i>Felis catus</i>) |
| <i>C. fragile</i> | Ropucha (<i>Duttaphrynus melanostictus</i>) |
| <i>C. galli</i> | Ptáci (<i>Spermestidae</i> , <i>Fringillidae</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Tetrao urogallus</i> , <i>Pinicola enucleator</i>) |
| <i>C. hominis</i> | Člověk (<i>Homo sapiens</i>) |
| <i>C. macropodum</i> | Klokan (<i>Macropus giganteus</i>) |
| <i>C. meleagridis</i> | Krocán (<i>Meleagris gallopavo</i>) |
| <i>C. molnari</i> | Ryby (<i>Sparus aurata</i> , <i>Dicentrarchus labrax</i>) |
| <i>C. muris</i> | Myš (<i>Mus musculus</i>) |
| <i>C. nasorum</i> | Ryby (<i>Naso literatus</i>) |
| <i>C. parvum</i> | Myš (<i>Mus musculus</i>) |
| <i>C. reichenbacklinkei</i> | Čichavec (<i>Trichogaster leeri</i>) |
| <i>C. ryanae</i> | Skot (<i>Bos taurus</i>) |
| <i>C. scophthalmi</i> | Ryby (<i>Scophthalmus maximus</i>) |
| <i>C. scrofarum</i> | Prase (<i>Sus scrofa</i>) |
| <i>C. serpentis</i> | Hadí (<i>Elaphe guttata</i> , <i>E. subocularis</i> , <i>Sanzinia madagascarensis</i>) |
| <i>C. suis</i> | Prase (<i>Sus scrofa</i>) |
| <i>C. tyzzeri</i> | Myš (<i>Mus musculus</i>) |
| <i>C. ubiquitousum</i> | Savci (<i>Mammalia</i>) |
| <i>C. varanii</i> | Plazi (<i>Eumeces schneideri</i> , <i>Varanus griseus</i> , <i>Elaphe guttata</i>) |
| <i>C. viatorum</i> | Člověk (<i>Homo sapiens</i>) |
| <i>C. wrairi</i> | Morče (<i>Cavia porcellus</i>) |
| <i>C. xiao</i> | Ovce (<i>Ovis aries</i>) |

2.3 Přenos infekce

Infekční oocysty jsou velmi odolné ve vnějším prostředí a jsou nejčastěji uvolňovány do prostředí prostřednictvím výkalů hostitele. Oocysty si mohou zachovat za vhodných podmínek (vlhká půda, povrchové vody - kde teplota neklesá pod bod mrazu) infekčnost i po dobu 6 měsíců (Bednarska et al. 2003; Fayer 2004).

Hostitelé mohou být infikováni přímým kontaktem, nebo nepřímo - konzumací kontaminovaných potravin a vody (Feng 2008; Ziegler et al. 2007). Za nejvýznamnější zdroj přenosu kryptosporidií je v dnešní době považována voda, ať už se jedná o vody pitné nebo rekreační (Bednarska et al. 2007).

2.4 Životní cyklus

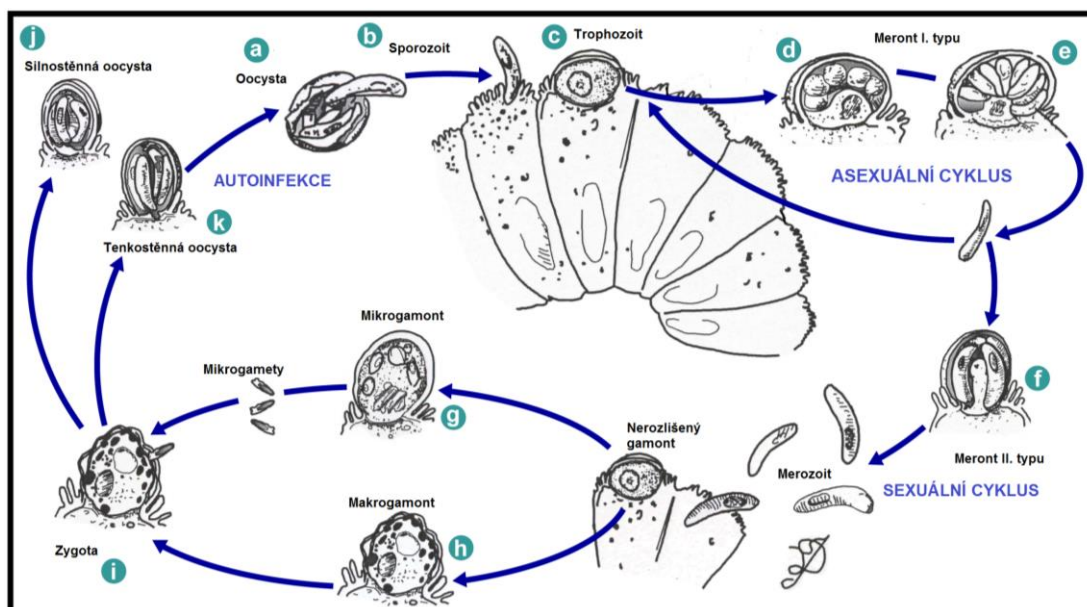
Zástupci rodu *Cryptosporidium* mají složitý životní cyklus, který dělíme na sexuální a asexuální reprodukční fáze. Dle místa průběhu vývojového cyklu je možno tento rod dělit na dvě různé skupiny. U první skupiny dochází k vývoji v žaludečním epitelu a u druhé v epitelu střev. Rozlišení lze provést již podle odlišných tvarů a velikostí oocyst. Druhy infikující epitel jak tenkého, tak tlustého střeva vytvářejí menší a kulaté oocysty, zatímco druhy vyvíjející se v pravém žaludku svých hostitelů mají větší oválné oocysty. V rámci tohoto pravidla existují i výjimky, například *C. baileyi* u kuřat upřednostňuje dýchací trakt a kloaku (Current et al. 1986).

Vlastní vývojový cyklus začíná požitím životaschopných oocyst vnímavým hostitelem. Infekční dávka se v závislosti na odolnosti liší u jednotlivých hostitelů, i malé množství oocyst je schopné vyvolat onemocnění (Zambriski et al. 2013). Oocysty se dostávají do gastrointestinálního nebo dýchacího traktu, kde dochází k excystaci a uvolnění čtyř infekčních sporozoitů aktivně napadajících buňky epitelu (Hijawi et al. 2002). Poté dochází k asexuálnímu množení (merogonie) za postupného vzniku dvou typů odlišných merontů (Hijawi et al. 2004). Meronti typ I. obsahují 6-8 merozoitů, přičemž merogonie se opakuje. V případě následné merogonie II. typu jsou produkováni jen 4 merozoiti, kteří dávají vzniknout mikro- a makrogametocytům a vývojový cyklus přechází do sexuální fáze (Sunotel et al. 2006).

Při pohlavním množení (gametogonie) dochází ke vzniku gamontů, samčích mikrogamontů a samičích makrogamontů. Následuje vznik mikro- a makrogamet z mikro- a makrogamontů a po následném oplození makrogamety mikrogametou dochází k formování zygoty (Sunotel et al. 2006). Zygota dále prochází sporogonií (meiosa) a uvnitř ní vznikají 4 sporozoity (Liu et al. 2009). U druhu *C. parvum* byla popsána produkce dvou druhů oocyst, tenkostěnných oocyst způsobujících autoinfekci hostitele a silnostěnných oocyst uvolňovaných do vnějšího prostředí

(cca 80 %) (Sunnotel et al. 2006). U ostatních druhů kryptosporidií nebyla přítomnost tenkostěnných oocyst prokázána. Životní cyklus kryptosporidií je znázorněn na obrázku 1.

Obrázek 1. Životní cyklus parazitů rodu *Cryptosporidium*. Po pozření (ev. inhalování) oocysty vhodným hostitelem dochází k excystaci (a) a k uvolnění sporozoitů, parazitujících v buňkách epitelu gastrointestinálního traktu (b, c) nebo v jiných tkáních (např. dýchacího ústrojí). V těchto buňkách se parazit asexuálně rozmnožuje (schizogonie nebo merogonie) (d, e, f) a pak se sexuálně množí (gametogonie) a produkuje mikrogamonty (samčí - g) a makrogamonty (samičí - h). Po oplodnění makrogamety mikrogametami vzniká zygota (i) a následně dva různé typy oocyst, silnostěnné, které jsou běžně vylučovány ven z hostitele (j), a tenkostěnné oocysty, které se podílejí zejména na autoinfekcích (k).



(upraveno dle Current et Garcia 1991)

2.5 Hostitelská specifita

Většina druhů kryptosporidií není přísně hostitelsky specifických, např. *Cryptosporidium parvum* - nejméně hostitelsky specifický druh, bylo detekováno a experimentálně přeneseno do celé řady hostitelů včetně člověka (Fayer 2004). Za hostitelsky specifické je považováno *C. baileyi* u kuřat, *C. canis* u psů, *C. felis* u koček, *C. meleagridis* u krůt a *C. muris* u myší nebo *C. wrairi* u morčat. Nicméně všechny tyto druhy mohou způsobovat infekce lidí a proto jsou

považovány za zoonotické (Caccio et al. 2002; Ditrich et al. 1991; Guyot et al. 2001; Pedraza-Diaz et al. 2000; Pedraza-Diaz et al. 2001; Xiao et al. 2001).

2.6 Klinické příznaky kryptosporidiózy

Kryptosporidióza, onemocnění způsobené zástupci rodu *Cryptosporidium*, je považována za velmi významnou zoonózu. U imunokompetentních jedinců tento prvek způsobuje mírný až vyčerpávající vodnatý průjem, ale u pacientů se sníženou imunitou může způsobovat dehydratující chronické průjmy s fatálními následky (Guk et al. 2004; Sunnotel et al. 2006). V průjmech je někdy přítomna sliznice, ale krev a leukocyty jsou velmi vzácné (Fayer 2004). Průjmové onemocnění lidí může být doprovázeno bolestmi břicha, nechutenstvím, nevolnostmi, zvracením, ztrátou hmotnosti, horečkou, únavou a dýchacími problémy. U zvířat jsou klinické příznaky vzácné. Pokud se vyskytnou, jsou podobné klinickým příznakům u lidí (Fayer 2004). Průměrná doba trvání nemoci se pohybuje v rozmezí od 2 do 26 dnů, nejčastěji však 12 dní. Žádoucím výsledkem odpovědi imunitního systému je samovyléčení („self-cure“), které nastává u imunokompetentních jedinců.

2.7 Průběh infekce

Prepatentní období, doba od pozření infekčních oocyst po vyloučení oocyst do vnějšího prostředí, je závislá na hostiteli, druhu a genotypu kryptosporidie a infekční dávce (Hijjawi et al. 2002). Mezní hodnota je 3–24 dnů. Inkubační doba trvá přibližně 5–7 dní (Fayer et al. 2005). Vlastní patentní doba, vylučování oocyst do vnějšího prostředí, trvá nejčastěji v rozmezí 1–20 dní. Tato doba je také ovlivněna dalšími faktory jako je hostitel, druh *Cryptosporidium* a další (Hijjawi et al. 2002). Patentní a prepatentní období některých druhů kryptosporidií jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Patentní a prepatentní období některých druhů kryptosporidií u nejdůležitějších hostitelů.

| Druh | Hostitel | Prepatentní období (dny) | Patentní období (dny) |
|---------------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------|
| <i>C. andersoni</i> | skot | 18 | >90 |
| <i>C. baileyi</i> | kuře | 4–24 | 18 |
| <i>C. bovis</i> | skot | 10–12 | 18 |
| <i>C. felis</i> | kočka | 5–6 | 7–10 |
| <i>C. galli</i> | drůbež | 5 | 6 |
| <i>C. hominis</i> | člověk | 4–5 | Dle stavu imunitního systému |
| <i>C. muris</i> | myš | 6–21 | 20–30 |
| | tele | 2–7 | 1–12 |
| <i>C. parvum</i> | člověk | 4–22 | Dle stavu imunitního systému |
| <i>C. scrofarum</i> | prase | 6–7 | >30 |
| <i>C. suis</i> | prase | 2–9 | 9–15 |
| <i>C. tyzzeri</i> | myš | 6–7 | 24–28 |

2.8 Terapie a prevence

V průběhu posledního desetiletí byl u mnoha testovaných chemoterapeutik prokázán značný toxický účinek na organismus nebo výskyt reziduí v živočišných produktech. Ačkoli některá léčiva významně zkracují dobu trvání průjmů a snižují množství vylučovaných oocyst (Hijjawi et al. 2004), do dnešní doby není známo žádné účinné chemoterapeutikum vhodné k léčbě hlavně imunokompromitovaných jedinců (Ryan et al. 2003). V případě vypuknutí infekce je nutné zajistit rehydrataci a iontovou rovnováhu organismu. Za prevenci lze považovat základní hygienické návyky (Feng 2008).

2.9 Kryptosporidie a kryptosporidióza hlodavců

Kryptosporidiózám hlodavců by měla být věnována zvláštní pozornost, zmiňování autoři se domnívají, že hlodavci slouží jako rezervoáry těchto parazitů (Kimura et al. 2007; Klesius et al. 1986; Rašková et al. 2013). Významná je i všudypřítomnost hlodavců ve volné přírodě a v okolí hospodářských zvířat (Feng 2008). Kromě toho, hlodavci představují velmi vhodný model pro studie, a to díky dynamice a vysoké rozmanitosti populací (Bajer 2008).

Cryptosporidium ubiquitum obvykle se vyskytující u buvolce běločelého (*Damaliscus pygargus phillipsi*), jelena siky (*Cervus nippon*), jelence běloocasého

(*Odocoileus virginianus*), nyaly jižní (*Tragelaphus angasii*) a u dalších, bylo nalezeno i u některých hlodavců (Feng et al. 2007; Perz et Le Blancq 2001; Ryan et al. 2003; Wang et al. 2008). Dále byl popsán výskyt *C. wrairi* u morčete domácího (*Cavia aperea porcellus*) (Feng et al. 2010) a *C. meleagridis* u křečka dlouhoocasého (*Peromyscus maniculatus*) (Feng et al. 2007; Xiao et al. 2002).

U hrabošů bylo detekováno *Cryptosporidium* vole genotype I a *Cryptosporidium* muscrat genotype II (Feng et al. 2007; Ziegler et al. 2007). U veverek byly popsány infekce způsobené *C. parvum*, *C. muris*, *Cryptosporidium* squirrel genotype, cervine genotype, ferret genotype, skunk genotype, chipmunk genotype I, a deer mouse genotype III (Feng et al. 2007; Kváč et al. 2008; Sundberg et al. 1982; Ziegler et al. 2007).

Oocysty kryptosporidií morfologicky podobné *C. muris* byly nalezeny v České republice u burunduka páskovaného (*Eutamias sibiricus*) (Hůrková et al. 2003).

2.9.1 Kryptosporidie a kryptosporidióza podčeledi pravé myši (Murinae)

V rámci zástupců podčeledi pravé myši (Murinae) byly dosud popsány následující druhy a genotypy kryptosporidií:

2.9.1.1 Žaludeční druhy a genotypy kryptosporidií

Žaludeční kryptosporidie nezpůsobují žádné klinické příznaky, plně nelze zjistit ani všechny makroskopické změny. Za charakteristické histopatologické změny jsou považovány hypertrofie, atrofie a metaplazie žláznatého epitelu a dilatace infikovaných žláz (Anderson 1987; Aydin et Özkul 1996; Kváč et Vítovec 2003; Özkul et Aydin 1994).

Cryptosporidium andersoni

Velikost oocyst je 7,7 (6,9–8,7) × 6,2 (5,5–6,9) μm, boční zploštění chybí (Hijjawi et al. 2002). Excystace sporozoitů oocyst *C. andersoni* je stejná jako u *C. parvum* (Hijjawi et al. 2001). Právě při excystaci je velmi důležité kyselé prostředí žaludečních šťáv (Hijjawi et al. 2002).

Cryptosporidium andersoni přirozeně se vyskytující u skotu se ukázalo být infekční i pro laboratorní myši (Matsubayashi et al. 2005). Infekce *C. andersoni* byla popsána také u krysy malé (*Mastomys coucha*) (Kváč et al. 2007).

Cryptosporidium muris

Vysporulované oocysty měří přibližně 8,4 (7,5–9,8) × 6,3 (5,5–7,0) μm (Iseki 1986).

Studie ukázaly, že druh *C. muris* je schopný infikovat širokou škálu dalších hostitelů včetně myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) (Torres et al. 2000), myšice východní (*Apodemus speciosus*) (Murakoshi et al. 2013), potkana ostrovního (*Rattus exulans*) (Ng-Hublin et al. 2013) a myši domácí (*Mus musculus*) (Chalmers et al. 1994). Torres et al. (2000) našel kombinované infekce *C. parvum* a *C. muris* u 5,8 % *Apodemus sylvaticus*.

2.9.1.2 Střevní druhy a genotypy kryptosporidií

Cryptosporidium parvum

Velikost oocyst je 4,2 (4,2–5,8) × 4,8 (3,5–5,0) μm (Hijjawi et al. 2002). Oocysty *C. parvum* byly nalezeny v trusu potkanů (*Rattus norvegicus*) v Japonsku (Inseki 1986; Miyaji et al. 1989) a ve Velké Británii (Webster et Macdonald 1995), ale také i u krys (*Rattus rattus*) v Japonsku (Miyaji et al. 1989; Yamura et al. 1990) a potkanů ostrovních (*Rattus exulans*) na Filipínských ostrovech (Ng-Hublin et al. 2013). U domácích myši (*Mus musculus*) v USA byla zjištěna prevalence 30 % (Klesius et al. 1986). Výzkum v Anglii, zjistil přítomnost *C. parvum* u divokých hlodavců (*M. domesticus*, *A. sylvaticus* a *C. glareolus*) (Chalmers et al. 1997). U myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) dosahovala prevalence v Polsku 15 %, u norníků rudých (*Clethrionomys glareolus*) 20 % - (Siński et al. 1993) a ve Španělsku u myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) 35,2 % (Torres et al. 2000). Pozdější výzkum na stejné lokalitě prokázal prevalenci 24 % u *Apodemus* sp., 23 % u *C. glareolus* a (Siński et al. 1998).

Cryptosporidium tyzzeri

Velikost oocyst je 4,64 (4,59–4,69) × 4,19 (4,13–4,25) μm (Ren et al. 2012).

Foo et al. (2007) popsal nález *Cryptosporidium* mouse genotype I u myši domácí (*Mus domesticus*). Tento genotyp byl později přejmenován na *C. tyzzeri*.

Cryptosporidium ubiquitum

Oocysty měří 5,04 (4,71–5,32) × 4,66 (4,33–4,98) μm (Fayer et al. 2010). Murakoshi et al. (2013) našel *C. ubiquitum* u myšice východní (*Apodemus speciosus*), tento nález byl podložen i molekulárními analýzami.

2.9.1.3 Další druhy a genotypy kryptosporidií infikující pravé myši (Murinae)

U potkanů ostrovních (*Rattus exulans*) na Filipínských ostrovech bylo poprvé popsáno *Cryptosporidium scrofarum* a *Cryptosporidium suis-like* genotype, dále byly nalezeny i *Cryptosporidium* rat genotypes I–IV (Ng-Hublin et al. 2013). U myšice východní (*Apodemus speciosus*) bylo popsáno *Cryptosporidium muris* Japanese field mouse genotype (Hikosaka at Nakai 2005). Murakoshi et al. (2013) ve své práci popisuje nález doposud nepopsaného genotypu *Cryptosporidium* v myšici východní (*Apodemus speciosus*) s odlišnými znaky než *Cryptosporidium muris* Japanese field mouse genotype a navrhuje ho pojmenovat jako Naruko genotype. Foo et al. (2007) popsal nález nového genotypu *Cryptosporidium* mouse genotype II u myši domácí (*Mus domesticus*).

2.10 Charakteristika zástupců rodu Myšice (*Apodemus*) vyskytujících se v České republice

Rod *Apodemus* zahrnuje druhy myšice temnopásá (*Apodemus agrarius*), myšice lesní (*Apodemus flavicollis*), myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*) a myšice malooká (*Apodemus microps*). V České republice se vyskytují všechny čtyři druhy, přičemž nejhojněji se vyskytují dva druhy a to myšice lesní a myšice křovinná.

Pro rozlišení jednotlivých druhů myšic se používají následující morfometrické ukazatele:

Hmotnost těla (G) zjištěna před pitvou.

Délka těla (LC) je měřena od špičky čenichu po řitní otvor.

Délka ocasu (LCd) od řitního otvoru po špičku ocasu, kde je možno ještě nahmatat ocasní obratle (tzn. bez koncových chlupů apod.).

Délka zadního chodidla (LTP) je vzdálenost od zadního okraje po konec nejdelšího prstu bez drápu, s přesností na 0,1 mm.

Délka ušního boltce (LA) měřena na vnitřní straně jako vzdálenost od spodního zářezu (základny boltce) po hrot boltce bez prodloužených chlupů.

2.10.1 Myšice lesní (*Apodemus flavicollis*)

G: 18–45 g

LC: 90–123 mm

LCd: 87–127 mm

LTP: 23–27 mm

LA: 17–21 mm

Myšice lesní je největší z myšic, spolehlivě ji lze určit dle délky zadní tlapy nad 24 mm (mladá zvířata a samice mají často LTP i pod touto hranicí). Ocas je u dospělých jedinců stejně dlouhý, nebo spíše delší než tělo (u mláďat činí délka ocasu asi 90–95 % délky těla) a lze na něm napočítat 180–230 kroužků zrohovatělé pokožky. V dospělosti mívá myšice lesní poměrně výrazné zbarvení, ve kterém ryšavě hnědý až kaštanový odstín na hřbetě a bocích odděluje ostrá hranice od téměř čistě bílého břicha. Na hrdle bývá velká žlutá skvrna, která se na vnitřní straně předních končetin napojuje na tmavší zbarvení boků. U mladých jedinců přechází světle šedohnědé zbarvení hřbetu a boků do šedobílé spodní strany těla bez zřetelnějšího ohraničení. Má nápadné korálkově černošklé oči o průměru asi 5 mm a velké, lysé ušní boltce. Obývá zvláště listnaté a smíšené lesy od nížin do hor. Rovněž osídluje chladnější místa na březích vodních toků, sady nebo polní remízky, v zimě se stahuje k obytným či hospodářským budovám (Anděra et Horáček 2005).

2.10.2 Myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*)

G: 13–38 g

LC: 75–110 mm

LCd: 70–106 mm

LTP: 19,5–23,5 (24) mm

LA: 14,5–18,5 mm

Podobá se myšici lesní, ale je v průměru menší. K určení je nevhodnější délka zadní tlapy s nejčastějšími hodnotami mezi 20,5 až 23 mm. Myšice křovinná má ocas obvykle kratší než tělo a na něm asi 150–180 ocasních kroužků. Ve zbarvení není hranice mezi tmavšími boky a světlejším břichem příliš patrná - hřbet je hnědý nebo světle rezavý, spodní strana těla špinavě bílá až šedivá. Žlutá skvrna na hrdle někdy chybí, pokud se vyskytuje, pak je menší, protáhlého tvaru a nezasahuje na přední končetiny.

Přednost dává otevřené krajině, v níž se soustřeďuje při okrajích lesních porostů, v hájích, sadech, na křovinatých stráních a mezích, v polích, rákosinách a podél vodních toků, ale najdeme ji i v lesích (včetně smrkových monokultur). Osídluje člověkem zdevastované a rekultivované plochy (opuštěné lomy, smetiště či výsypky dolů). Také žije ve vesnicích a osadách, jakož i v parcích, vilových čtvrtích a dokonce i v centru velkoměst. Na podzim se hromadně stěhuje do chat, chalup, seníků, kůlen, stodol a jiných stavení (Anděra et Horáček 2005).

2.10.3 Myšice temnopásá (*Apodemus agrarius*)

G: 15–40 g

LC: 70–125 mm

LCd: 65–90 mm

LTP: 17,5–21 mm

LA: 11–14,5 mm

Myšice temnopásá je větší, má kratší ocas a délku zadního chodidla mezi 17,5–21 mm. Svrchní stranu těla mívá rezavohnědou až žlutohnědou, břicho bílé nebo šedohnědé. Podélný, 2–3 mm široký, tmavý proužek se jí táhne od hlavy až ke kořeni ocasu. Je rozšířena na Chebsku, Děčínsku, Českolipsku - povodí Ploučnice a Smědé. Vyhledává hlavně vlhčí stanoviště s bujnou vegetací včetně rákosin, žije však také na polích, mezích a při okraji menších lesů. Snadno se přizpůsobí i k životu v blízkosti člověka, jen rozlehlejším lesním prostorům se vyhýbá (Anděra et Horáček 2005).

2.10.4 Myšice malooká (*Apodemus microps*)

G: 12–22 g

LC: 70–96 mm

LCd: 64–83 mm

LTP: 17–20,5 mm

LA: 11–15 mm

Zbarvením i menší velikostí připomíná myš domácí či mladé jedince myšice křovinné (s nimi byla původně zaměňována). Vyznačuje se především menšíma očima (průměru 3,5–3,9 mm), drobnými ušními boltci (výška pod 15 mm) a krátkými zadními tlapkami, nepřesahujícími délkou 20,5 mm. Dvoubarevný ocas je vždy kratší než tělo. Zbarvení těla bývá svrchu šedohnědé nebo šedožluté, vespod bílé až nažloutlé, přičemž hranice na bocích může být u dospělých zvířat poměrně výrazná. O vymezení druhu se stále vedou odborné diskuze (je také uváděna jako *A. uralensis*). Je rozšířena hlavně na Žatecku, v nížinách a pahorkatinách jižní Moravy a Slezska. Obývá převážně bezlesou krajinu, v níž během roku střídá několik stanovišť. V zimě a na jaře se drží na zaplevelených mezích, úhorech a zarostlých stráních, později se stěhuje na pole a k podzimu vyhledává strniště a kultury víceletých plodin. V menší míře obsazuje vlhčí místa při březích potoků a řek, louky, neobdělávané plochy, řídké prosvětlené listnaté lesíky a křovinaté paseky (Anděra et Horáček 2005).

3. Cíle práce

- Zdokumentovat výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikujících hlodavce rodu *Apodemus*.
- Pomocí molekulárních nástrojů popsat jednotlivé druhy a genotypy kryptosporidií infikující tuto skupinu hostitelů.
- Posoudit vliv věku, pohlaví a dalších faktorů na diverzitu a prevalenci kryptosporidií.
- Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů.

4. Materiál a metody

4.1 Lokality

Na základě biotopů jednotlivých druhů byly stanoveny odchytné lokality na Českobudějovicku, Tábořsku a Pelhřimovsku. Přesné údaje o jednotlivých lokalitách jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Umístění a rozloha jednotlivých lokalit.

| Lokalita | Souřadnice lokality | Rozloha lokality (m ²) |
|--------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Pole | 49°1'38.222"N, 14°27'30.992"E | 80 |
| Pole - remízek | 49°1'38.222"N, 14°27'30.992"E | 48 |
| Les - Opatovice | 49°2'17.606"N, 14°27'18.102"E | 1000 |
| Les - Opatovice B | 49°2'21.876"N, 14°27'15.408"E | 1400 |
| Kaplička | 49°0'32.761"N, 14°27'59.651"E | 100 |
| Zahrada | 49°2'59.621"N, 14°26'52.495"E | 19,5 |
| Les - Slavošovice | 48°57'36.043"N, 14°40'0.656"E | 900 |
| Brandlín - pole | 49°18'11.037"N, 14°47'28.693"E | 550 |
| Košice | 49°18'57.767"N, 14°45'33.170"E | 1100 |
| Pacov | 49°28'37.332"N, 15°0'56.802"E | 250 |

Pole: Lokalita se nachází poblíž obcí Bavorovice/Opatovice, jedná se o pšeničné pole, se kterým sousedí pás listnatých stromů s řídkým podrostem. Na této lokalitě byly pasti kladeny v pásu při severním okraji pole. Okolí tohoto pole bylo značně podmáčené.

Pole - remízek: Lokalita se nachází poblíž obcí Bavorovice/Opatovice, jedná se o pás listnatých stromů s řídkým podrostem, se kterým sousedí pšeničné pole. Pasti byly kladeny do podrostu poblíž stromů a dř.

Les - Opatovice: Lokalita u vesnice Opatovice, jedná se o pás listnatých stromů s velmi bujným podrostem, s touto lokalitou sousedí pole s pšenicí a ovsem. Vzhledem k velké ploše byla lokalita rozdělena na 2 části. V této části byl podrost méně bujný, místo bylo světlé. Pasti byly kladeny k myším díram a přímo pod stromy na obou stranách. Na této lokalitě byl zjištěn i výskyt norníka rudého (*Clethrionomys glareolus*).

Les - Opatovice B: Lokalita u vesnice Opatovice, jedná se o pás listnatých stromů s velmi bujným podrostem, s touto lokalitou sousedí pole s pšenicí a ovsem. Vzhledem k velké ploše byla lokalita rozdělena na 2 části. Tato část byla stinná s velmi bohatým podrostem. Pasti byly kladeny k myším dírám a přímo pod stromy na obou stranách. Na této lokalitě byl zjištěn i výskyt norníka rudého (*Clethrionomys glareolus*).

Kaplička: Velmi vlhká a stinná lokalita sousedící s pšeničným polem a strouhou, okrajová lokalita Českých Budějovic (Kněžské Dvory) poblíž mlýna Suchomel. Pasti byly kladeny v pásu vedeném od strouhy s bujným podrostem až k okraji pole. Na tomto místě docházelo k velkým ztrátám odchycených myší (predátoři).

Zahrada: Hluboká nad Vltavou - Zámostí, klidnější lokalita s ovocnými stromy, která se nachází na slunné části svahu. Zahrada byla považována pouze za migrační místo (loviště), místem výskytu byla pravděpodobně zahrada s akátovými nálety a bujným nepřístupným podrostem. Na této lokalitě byl zjištěn i výskyt norníka rudého (*Clethrionomys glareolus*).

Les - Slavošovice: Klidná lokalita u velmi málo frekventované cesty. Okrajová vlhká část listnatého lesa s nízkým podrostem sousedící s loukami. Na této lokalitě bylo dosahováno horších výsledků.

Brandlín - pole: Lokalita se nachází na klidném místě. Jedná se o pšeničné pole, které sousedí se stájem a výběhy pro koně. Pasti byly umístovány v pásu při okraji pole. Na této lokalitě byl zjištěn výskyt hraboše polního (*Microtus arvalis*).

Košice: Lokalita se nachází na klidném místě poblíž málo frekventované silnice, je ohraničena dvěma potoky a přímo sousedí s porostem listnatých stromů. Jedná se o pšeničné pole, na kterém byly pasti kladeny do okolí skruží uprostřed pole. Na této lokalitě byl také zjištěn výskyt hraboše polního (*Microtus arvalis*).

Pacov: Lokalita se nachází v těsné blízkosti zahrádkářské kolonie. Jedná se o menší plochu, která je ohraničena poli s pšenicí. Jedinci na této lokalitě jsou převážně škůdci v zahrádkářské kolonii.

4.2 Návnada a pastí

Odchyt probíhal pomocí dřevěných sklapovacích pastiček, kovové živochytky se neosvědčily. Každá lokalita byla předem otestována na přítomnost myšic malým množstvím pastí (cca 5–10 ks). V případě úspěšnosti během 3 nastražení došlo k rozšíření počtu pastí (dle velikosti dané lokality). Pastí byly pokládány před soumrakem a vybírány druhý den ráno. Vzhledem k noční aktivitě predátorů docházelo ke značným ztrátám (odhadováno 10 %). Pastí byly pokládány většinou do podrostu ke kmenům stromů a do okolí myších děr. Vzdálenost pastí se přibližně rovnala vzdálenosti mezi stromy, zhruba 4–5 m.

Návnada do pastí prošla jistým „vývojem“. Při prvních odchycích byly využívány 3 druhy návnad (játrová paštika, mrkev, mrkev s játrovou paštikou). Na základě literatury byla použita mrkev a mrkev s játrovou paštikou, které se ukázaly jako nevhodné k odchytu myšic. Jako další návnada byl vyzkoušen uzený sýr (Koliba), se kterým bylo dosaženo velmi dobrých výsledků.

4.3 Odběr vzorků

U všech odchycených jedinců byl určen druh a pohlaví. U jednotlivých jedinců byly odebrány vzorky pomocí pitvy (nutno dbát na čistotu pitevních nástrojů). Jedinec byl fixován k podložce pomocí jehel umístěných do tlapek. Dutina břišní byla otevřena v *linea alba* a stěny dutiny břišní zafixovány, u každého jedince byl odebrán obsah z koncové části tlustého střeva. Odebrané vzorky byly vloženy do sterilních 1,5 ml mikrokumavek, konzervovány dichromanem draselným a uchovávány v chladu (4 °C).

4.4 Barvení mikroskopických preparátů dle Miláčka a Vítovce

Zásobní roztoky

1. Roztok methyl-violeti

- 0,6 g methylvioleti
- 1 ml anilinu
- 1 g fenolu

- 30 ml 96% alkoholu
- 70 ml deionizované vody

2. Roztok tartrazinu

- 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

3. Roztok 2% kyseliny sírové

Pracovní postup

- Špejlí rozetřít tenkou vrstvou trusu (obsahu střeva) na podložní sklíčko.
- Sklo s nátěrem fixovat pomocí metanolu plamenem.
- Obarvit roztokem methyl-violetí; doba barvení 30 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 2 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Dobarvit nátěr v roztoku tartrazinu po dobu 4 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Nechat uschnout při laboratorní teplotě. Prohlížet mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

4.5 Morfometrická analýza oocyst

Velikost oocyst *Cryptosporidium* sp. byla měřena z mikroskopických preparátů obarvených barvicí metodou dle Miláčka a Vítovce (1985) pomocí digitální analýzy obrazu (software M.I.C. Quick Photo Pro v 2.0 software, Olympus Camedia C-5060 WIDEZOOM, 5.1 megapixels digitální kamera; mikroskop Olympus IX70; za použití imerzního objektivu - zvětšení 1000×). Byla měřena délka a šířka oocyst a byl vypočítán index tvaru.

4.6 Izolace DNA

Materiál

200 mg trusu, PSP spin stool DNA kit (Invitex)

- Proteinase K lyofylizát: rozpustit přidáním 1,5 ml deionizované PCR vody. Po rozpuštění skladovat při -20 °C.
- Elution Buffer D: odpipetovat do 1,5 ml mikroskopické zkumavky a inkubovat při 70 °C.

Postup

- Materiál dát do Safe-Lock-Tube, přidat skleněné kuličky o průměru 0,5 mm a 1 ml Lysis Buffer P a rozbít 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s užitím homogenizátoru Fast Prep 24 INSTRUMENT (MP BIOMEDICALS, USA).
- Inkubovat 10 minut při 95 °C v termobloku.
- Centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Přenést veškerý supernatant do InviAdsorb-Tube, 15 s vortexovat, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat 3 minuty při 14 000 g.
- Supernatant přepipetovat do čistých 1,5 ml mikroskopických zkumavek, centrifugovat 3 minuty při 14 000 g.
- Do čistých 1,5 ml mikroskopických zkumavek napipetovat 25 µl Proteinase K a přidat 400 µl supernatantu, vortexovat.
- Inkubovat 10 minut při 70 °C.
- Připipetovat 400 µl Binding Buffer P, vortexovat.
- Přepipetovat veškerý objem do Spin Filter-Tube, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Vylít odpad z mikroskopických zkumavek, napipetovat 500 µl Wash I, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Vylít odpad z mikroskopických zkumavek, napipetovat 800 µl Wash II, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Vylít odpad z mikroskopických zkumavek a opět centrifugovat 3 minuty při 14 000 g.
- Kolonu dát na čistou mikroskopickou zkumavku, na kolonu napipetovat 200 µl Elution Buffer D (předehřátého), inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.

4.7 PCR - polymerázová řetězová reakce

Z vyizolované DNA byla provedena amplifikace části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA; cca. 830 bp; Jiang et al. 2005) a části genu

kódujícího aktin (cca. 1066 bp; Sulaiman et al. 2002) za použití setu specifických primerů.

PCR - SSU

DNA byla amplifikována v termocykleru pomocí následujícího programu.

- Počáteční denaturace po dobu 3 min při 94 °C.
- 35 cyklů zahrnujících denaturaci 45 s při 94 °C.
- Nasedací teploty primerů - 45 s při 55 °C u primární i sekundární reakce.
- Extenze 60 s při 72 °C.
- Finální extenze 7 min při 72 °C.

K amplifikaci sekundárního PCR produktu bylo využito 2 µl primárního produktu PCR. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek obsahující DNA *C. suis*. Set použitých specifických primerů je uveden v tabulce 4. Protokol pro reakční směs PCR - SSU je uveden v tabulce 5.

Tabulka 4. Sety primerů pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku.

| SSU | |
|--------------------------|------------------------------------|
| Primární reakce | |
| F1 | TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG |
| R1 | CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA |
| Sekundární reakce | |
| F2 | GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG |
| R2 | CTC ATA AGG TGC TGA AGC AGT A |

Tabulka 5. Reakční směs pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku.

| Primární reakce | | | Sekundární reakce | | |
|-------------------------|-------------|------------|-------------------------|-------------|------------|
| | Koncentrace | Objem (µl) | | Koncentrace | Objem (µl) |
| H₂O | ----- | 12,30 | H₂O | ----- | 13,10 |
| MgCl₂ | 25 mM | 1,20 | MgCl₂ | 25 mM | 1,20 |
| 10X buffer | 1X | 2,00 | 10X buffer | 1X | 2,00 |
| dNTP | 10 mM | 0,40 | dNTP | 10 mM | 0,40 |
| Forward primer | 10 µM | 0,40 | Forward primer | 10 µM | 0,40 |
| Reverse primer | 10 µM | 0,40 | Reverse primer | 10 µM | 0,40 |
| BSA | 10 mg/ml | 0,80 | BSA | ----- | ----- |
| Taq polymerase | 1U/1µl | 0,50 | Taq polymerase | 1U/1µl | 0,50 |
| DNA | ----- | 2,00 | DNA | ----- | 2,00 |
| Suma | | 20,00 | Suma | | 20,00 |

PCR - AKTIN

Amplifikace části genu kódujícího aktin byla provedena u všech vzorků pozitivních

na SSU. DNA byla amplifikována v termocykleru dle následujícího protokolu.

- Počáteční denaturace po dobu 3 min při 94 °C.
- 35 cyklů zahrnujících denaturaci 45 s při 94 °C.
- Nasedací teploty primerů – 50 °C u primární reakce a 45 °C u sekundární reakce.
- Extenze 60 s při 72 °C.
- Finální extenze 7 min při 72 °C.

K amplifikaci sekundárního PCR produktu bylo využito 2,5 µl primárního produktu PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *C. andersoni*. Set použitých specifických primerů je uveden v tabulce 6. Protokol pro reakční směs PCR - AKTIN je uveden v tabulce 7.

Tabulka 6. Sety primerů pro amplifikaci genu kódujícího aktin.

| AKTIN | |
|--------------------------|-----------------------------------|
| Primární reakce | |
| F1 | ATG CCV GGW RTW ATG GTD GGT ATG |
| R1 | GGD GCA ACR ACY TTR ATC TTC |
| Sekundární reakce | |
| F2 | GAY GAR GCH CAR TCV AAR AGR GTA T |
| R2 | TTD ATY TTC ATD GTH GAH GGW GC |

Tabulka 7. Reakční směs PCR pro amplifikaci genu kódujícího aktin.

| Primární reakce | | | Sekundární reakce | | |
|-------------------------|-------------|------------|--------------------------|-------------|------------|
| | Koncentrace | Objem (µl) | | Koncentrace | Objem (µl) |
| H₂O | ----- | 11,20 | H₂O | ----- | 12,10 |
| MgCl₂ | 25 mM | 1,20 | MgCl₂ | 25 mM | 1,20 |
| 10X buffer | 1X | 2,00 | 10X buffer | 1X | 2,00 |
| dNTP | 10 mM | 0,40 | dNTP | 10 mM | 0,40 |
| Forward primer | 10 µM | 0,40 | Forward primer | 10 µM | 0,40 |
| Reverse primer | 10 µM | 0,40 | Reverse primer | 10 µM | 0,40 |
| BSA | 10 mg/ml | 0,40 | BSA | ----- | ----- |
| Taq polymerase | 1U/1µl | 1,00 | Taq polymerase | 1U/1µl | 1,0 |
| DNA | ----- | 3,00 | DNA | ----- | 2,50 |
| Suma | | 20,00 | Suma | | 20,00 |

4.8 Elektroforéza

U výsledných produktů ze sekundární reakce PCR byla provedena separace pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu s přidavkem 5 μ l ethidium-bromidu.

Chemikálie

- TAE pufr (242 g tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,00).
- Agaróza
- Ethidium-bromid
- Ladder

Postup

- TAE pufr smíchat s agarózou (120 ml TAE pufru + 1,2 g agarózy).
- Nechat rozpustit v mikrovlnné troubě a následně zchladit pod tekoucí vodou na teplotu přibližně 50 °C.
- Přidat ethidium-bromid a promíchat.
- Gel nalít do formy, vložit hřebeny, nechat cca 20 minut tuhnout.
- Po ztuhnutí vyjmout hřebeny a gel vložit do vany na elektroforézu s TAE puftrem.
- Do první jamky napipetovat ladder, do ostatních jamek napipetovat 20 μ l produktu sekundární PCR.
- Spustit elektroforézu - napětí 85 V po dobu potřebnou k separaci fragmentů DNA.

4.9 Izolace z gelu

- Pozitivní fragmenty DNA vyříznout z gelu a vložit do 1,5 ml mikrozkušavky.
- Poté DNA izolovat pomocí QIAquick Gel Extraction kitu (QIAGEN) dle doporučení výrobce.

4.10 Vyhodnocení intenzity infekce

U mikroskopicky pozitivních vzorků byla odhadnuta intenzita infekce kryptosporidií dle Kváč et al. (2007).

4.11 Sekvence

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátor ABI3130 za použití sekundárních primerů. Získané nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí programu Chromas Pro v 1.32 (www.technilysium.com.au/chromas.html) a poté pomocí programů ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) a BioEdit porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank.

4.12 Fylogenetická analýza

Fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií byly vypočteny metodou Neighbor-Joining (Saitou et Nei 1987). Byl použit dvou-parametrový distanční model dle Kimury (Kimura 1980). Bootstrapový konsenzus výsledných stromů byl získán na základě 1000 opakování. Ke konstrukci fylogenetických stromů byl použit program TREECON.

4.13 Statistická analýza

Vztahy mezi výskytem kryptosporidiových infekcí a druhem, věkem a pohlavím hostitele a konzistencí trusu byly analyzovány pomocí programu Epi Info (TM) 7.1.1.14 (Centers for Disease Control and Prevention, USA). Byl použit chí-kvadrát test pro vyhodnocení jednotlivých proměnných a byl vypočten rizikový faktor (OR).

5. Výsledky

V průběhu července a srpna roku 2012 bylo odchyceno 207 kusů volně žijících myšic rodu *Apodemus*. Z toho 182 kusů myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) a 25 kusů myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*). Odchyty probíhaly celkem na 10 lokalitách - 7 lokalit na Českobudějovicku, 2 lokality na Táborsku a 1 lokalita na Pelhřimovsku. Podrobnější rozdělení odchycených jedinců je uvedeno v tabulce 8.

5.1 Výskyt a prevalence kryptosporidií na základě mikroskopického vyšetření

Z celkového počtu 207 vzorků, 182 kusů myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) a 25 kusů myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*), bylo pomocí mikroskopického vyšetření detekováno 25 (12,1 %) pozitivních vzorků na přítomnost oocyst rodu *Cryptosporidium*.

V rámci druhu *Apodemus flavicollis* bylo celkem detekováno 24 (13,2 %) pozitivních vzorků, zatímco u *Apodemus sylvaticus* byl pozitivní pouze 1 (4,0 %) jedinec.

Výskyt kryptosporidiových infekcí na jednotlivých lokalitách se pohyboval v rozmezí od 0 do 33,3 %. Nejvyšší četnost výskytu pozitivních jedinců byla zjištěna na lokalitě Pole (33,3 %), dále následovaly lokality Les - Opatovice B (12,2 %), Les - Opatovice (11,2 %) a lokalita Zahrada (10 %). Výskyt pozitivních jedinců na ostatních lokalitách nebyl prokázán (tabulka 8).

Tabulka 8. Počet odchycených a infikovaných jedinců myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) a myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) na jednotlivých lokalitách.

| Lokalita | Počet chycených zvířat/ pozitivních | | |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| | Celkem | <i>A. sylvaticus</i> | <i>A. flavicollis</i> |
| Pole | 6 | 3/1 | 3/1 |
| Pole - remízek | 8 | 0/0 | 8/2 |
| Les - Opatovice | 89 | 14/0 | 75/10 |
| Les - Opatovice B | 82 | 2/0 | 80/10 |
| Kaplička | 2 | 1/0 | 1/0 |
| Zahrada | 10 | 0/0 | 10/1 |
| Les - Slavošovice | 1 | 0/0 | 1/0 |
| Brandlín - pole | 2 | 0/0 | 2/0 |
| Košice | 3 | 1/0 | 2/0 |
| Pacov | 4 | 4/0 | 0/0 |
| Celkem | 207 | 25/1 | 182/24 |

Intenzita infekce u mikroskopicky pozitivních vzorků se pohybovala v rozmezí 2000–87500 oocyst na 1g trusu (OPG). Intenzitu infekce kryptosporidií v mikroskopicky pozitivních preparátech znázorňuje tabulka 9.

Tabulka 9. Intenzita infekce kryptosporidií v mikroskopicky pozitivních vzorcích.

| Vzorek | Intenzita infekce (počet oocyst v 1g trusu) | Vzorek | Intenzita infekce (počet oocyst v 1g trusu) |
|--------|--|--------|--|
| 1. | 13000 | 14. | 13000 |
| 2. | 36000 | 15. | 25500 |
| 3. | 11000 | 16. | 4500 |
| 4. | 13000 | 17. | 25500 |
| 5. | 2000 | 18. | 40500 |
| 6. | 4500 | 19. | 2000 |
| 7. | 8500 | 20. | 38500 |
| 8. | 8500 | 21. | 6500 |
| 9. | 4500 | 22. | 87500 |
| 10. | 4500 | 23. | 15000 |
| 11. | 8500 | 24. | 53500 |
| 12. | 87500 | 25. | 2000 |
| 13. | 8500 | | |

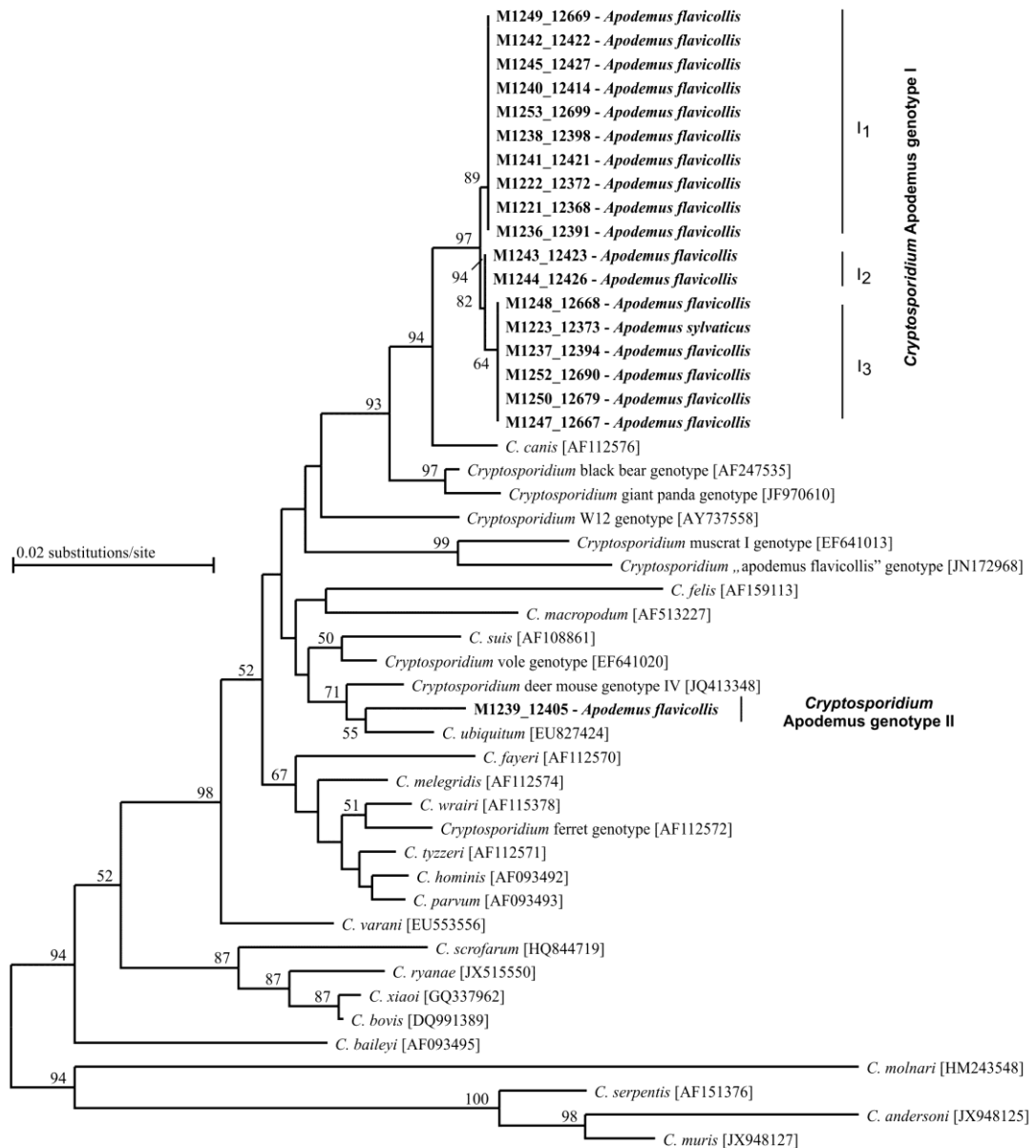
5.2 Genotypizace

Molekulární analýzy prokázaly přítomnost *Cryptosporidium* sp. ve všech mikroskopicky pozitivních vzorcích. Žádný mikroskopicky negativní vzorek nebyl

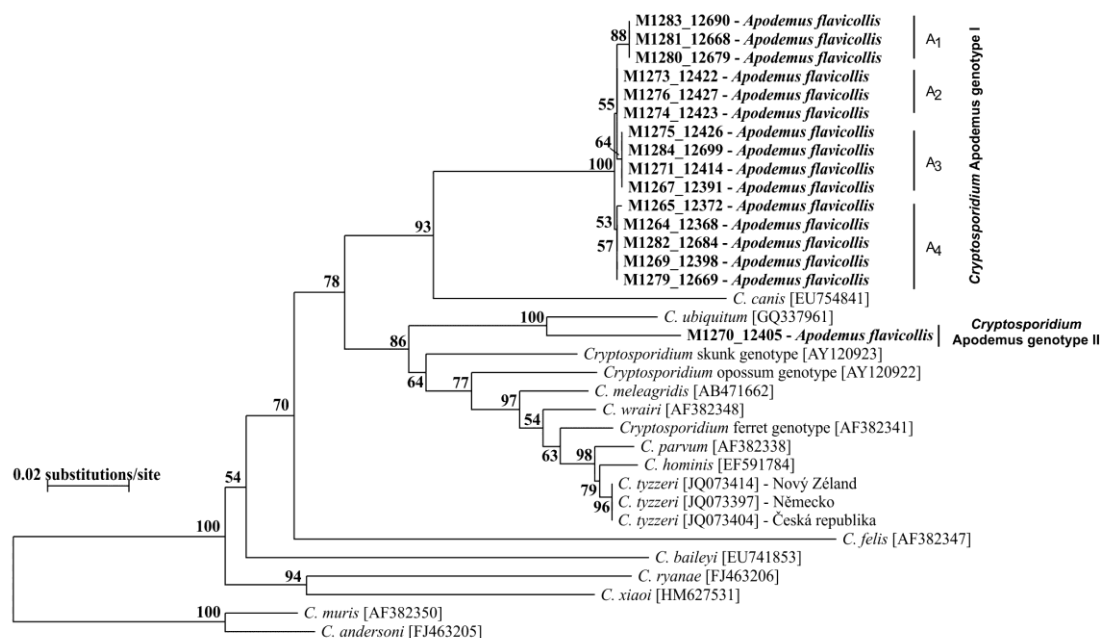
PCR pozitivní. Z celkového počtu 25 pozitivních vzorků se podařilo získat 19 sekvencí části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA). Na základě analýzy sekvencí SSU byla prokázána přítomnost dvou dosud nepopsaných genotypů, které jsme pracovníě označili jako *Cryptosporidium* Apodemus genotype I (18 vzorků) a *Cryptosporidium* Apodemus genotype II (1 vzorek; obrázek 2). *Cryptosporidium* Apodemus genotype I je fylogeneticky příbuzný s druhem *C. canis* [AF112576] (94% podobnost). V rámci *Cryptosporidium* Apodemus genotype I byly nalezeny 3 varianty genu kódujícího SSU. Odlišnost jednotlivých variant *Cryptosporidium* Apodemus genotype I₁, I₂ a I₃, se pohybovala od 99,7 do 100 % (obrázek 2). *Cryptosporidium* Apodemus genotype II byl zastoupený jedním vzorkem pocházejícím z *Apodemus flavicollis* a byl fylogeneticky nejpříbuznější druhu *C. ubiquitum* [EU827424] s 95,5% identitou sekvence SSU.

Následné analýzy sekvencí genu kódujícího aktin také prokázaly přítomnost dvou odlišných genotypů (obrázek 3). V rámci *Cryptosporidium* Apodemus genotype I byla prokázána vnitro-genotypová variabilita a přítomnost 4 různých variant genu – A₁, A₂, A₃ a A₄, nicméně aminokyselinová sekvence proteinu nebyla v důsledku substitucí změněna (data nejsou ukázána). Fylogenetické pozice *Cryptosporidium* Apodemus genotype I a II byly potvrzeny.

Obrázek 2. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných v této práci (vyznačeny tučně) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU) vytvořený metodou Neighbor-Joining v programu Treecon; 1000× bootstrap; znázorněny hodnoty podpory větví více než 50 %. Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny.



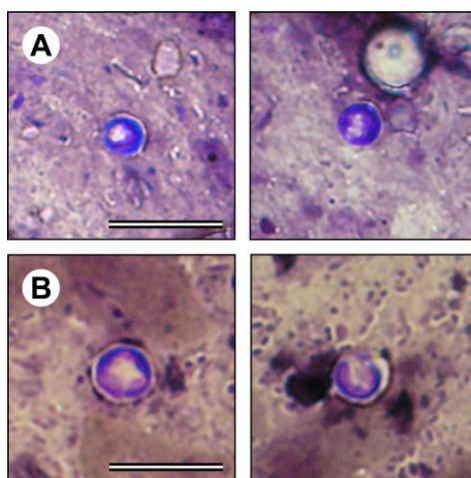
Obrázek 3. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných v této práci (vyznačeny tučně) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího aktin vytvořený metodou Neighbor-Joining v programu Treecon; 1000× bootstrap; znázorněny hodnoty podpory větví více než 50 %. Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny.



5.3 Morfologie oocyst

Oocysty *Cryptosporidium* Apodemus genotype I (obrázek 4A) jsou velké 4,38 (4,0–5,0) × 3,96 (3,4–4,8) μm s indexem tvaru 1,09 (1,04–1,20) (n = 15). *Cryptosporidium* Apodemus genotype II (obrázek 4B) má větší oocysty o velikosti 5,6 (5,1–5,9) × 5,2 (4,7–5,5) μm s indexem tvaru 1,07 (1,05–1,09) (n = 5).

Obrázek 4. A) Oocysty *Cryptosporidium* Apodemus genotype I a B) *Cryptosporidium* Apodemus genotype II barveny metodou dle Miláčka a Vítovce (1985). Měřítka = 10 μ m.



5.4 Vliv věku na výskyt a prevalenci kryptosporidií u myšic

Ze všech odchycených jedinců bylo 25 kusů mláďat, 21 mláďat *Apodemus flavicollis* a 4 *Apodemus sylvaticus*. Výskyt parazitů rodu *Cryptosporidium* byl prokázán pouze u 5 mláďat *Apodemus flavicollis*. Celková prevalence byla tedy 23,8 % u mláďat *Apodemus flavicollis*, u mláďat *Apodemus sylvaticus* nebyla detekována žádná kryptosporidiová infekce.

U dospělých jedinců *Apodemus flavicollis* byla detekována nižší prevalence infekce než u mláďat tohoto druhu a to 11,8 % (19/161). Naopak u myšice křovinné byla prevalence dospělých jedinců vyšší a to 4,8 % (1/21). Statistická analýza neprokázala vliv věku na výskyt kryptosporidiových infekcí ($p=0,34$).

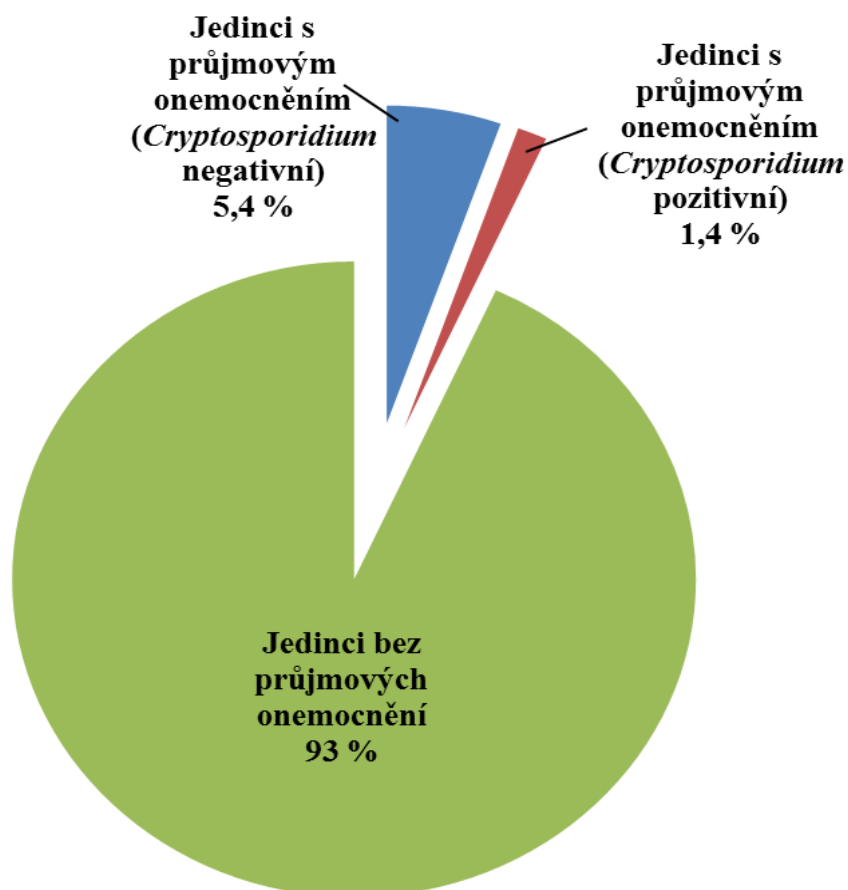
5.5 Vliv pohlaví na výskyt a prevalenci kryptosporidií u myšic

Z 82 odchycených samic *Apodemus flavicollis* a 6 *Apodemus sylvaticus* bylo 9 (10,9 %), respektive 1 (16,7 %) samice pozitivní na výskyt kryptosporidiové infekce. Opačného pohlaví bylo odchyceno celkem 119 kusů, z toho 100 samců *Apodemus flavicollis* a 19 *Apodemus sylvaticus*. Kryptosporidiové infekce byly detekovány pouze u 15 samců *Apodemus flavicollis* (15 %). Statistická analýza neprokázala rozdíl výskytu kryptosporidiových infekcí mezi jednotlivými pohlavími celkem ($p=0,95$; OR=1,1), ani v rámci jednotlivých druhů ($p=0,53-0,56$).

5.6 Vliv průjmu na výskyt a prevalenci kryptosporidií u myšic

Ze všech odchycených 207 jedinců byly příznaky průjmového onemocnění zjištěny u 14 jedinců (6,8 %). Pozitivní jedinci na *Cryptosporidium* byli nalezeni jak mezi kusy s průjmem tak převážně mezi kusy bez průjmu. Jeden pozitivní kus *Apodemus sylvaticus* nevykazoval příznaky průjmového onemocnění. U dalších 24 *Cryptosporidium* pozitivních jedinců *Apodemus flavicollis* byl nalezen průjem u 3 kusů, zbylých 21 kusů tohoto druhu příznaky průjmového onemocnění nevykazovalo. Prevalence průjmových onemocnění u všech odchycených jedinců je znázorněna v grafu 1. Nebyl prokázán vztah mezi výskytem průjmových příznaků a kryptosporidiovou infekcí ($p=0,49$; OR=1,89).

Graf 1. Prevalence průjmových onemocnění u všech odchycených jedinců rodu *Apodemus*.



6. Diskuze

Přestože druhová diverzita hlodavců je velmi rozmanitá a lze na základě dnešních poznatků předpokládat, že minimálně zástupci každé čeledi jsou hostitelé alespoň jednoho druhu nebo genotypu kryptosporidií, byla v minulosti epidemiologii kryptosporidií hlodavců věnována jen velmi omezená pozornost. Do současné doby byly popsány kryptosporidiové infekce u *Apodemus sylvaticus* ve Velké Británii (39 %; Chalmers et al. 1997), u *Apodemus sylvaticus* ve Španělsku (30 %; Torres et al. 2000) a u *Apodemus flavicollis* v Polsku (22 %; Bednarska et al. 2003). Obecně můžeme konstatovat, že se promoření populace druhu *Apodemus flavicollis* pohybuje v rozmezí 15–44 % a u druhu *Apodemus sylvaticus* v rozmezí 18–48 % (Feng 2010). Oproti tomu námi zjištěné výsledky prevalence byly pouze 4 % u *Apodemus sylvaticus* a 13,2 % u *Apodemus flavicollis*. Prevalence kryptosporidií se u divoce žijících jedinců rodu *Apodemus* liší u jednotlivých druhů a v jednotlivých státech, tyto rozdíly v prevalencích mohou být způsobeny různou hustotou populací, použitými diagnostickými metodami či geografickými rozdíly.

V této studii jsme detekovali přítomnost dvou fylogeneticky odlišných genotypů kryptosporidií. Získané sekvence nebyly identické a ani podobné žádným jiným sekvencím získaným v minulosti z hlodavčích hostitelů. Studie zaměřené na kryptosporidiózu myšic byly založeny pouze na morfologické diferenciaci oocyst, tudíž nelze srovnat námi dosaženými výsledky. V roce 2012 byla uveřejněna sekvence SSU získaná z trusu přirozeně infikované myšice *Apodemus flavicollis* ze Švédska. Tento genotyp klastruje s *Cryptosporidium* muskrat genotype I, zatímco námi získané izoláty jsou příbuzné k *C. canis* a *C. ubiquitum*.

Námi dosažené výsledky mikroskopických a molekulárních analýz se značně liší od výsledků analýz jiných autorů. Kváč et al. (2013a) poukazuje na nižší spolehlivost mikroskopické detekce kryptosporidií, která je způsobena nejčastěji nízkou intenzitou infekce. V případě této studie byla odhadnuta poměrně vysoká intenzita infekce a to až 87500 oocyst na 1g trusu (OPG).

Obecně lze oocysty kryptosporidií rozdělit do dvou morfotypů, většina střevních kryptosporidií má malé, kulaté oocysty, zatímco žaludeční druhy a genotypy jsou typické většími, oválnými oocystami. Na základě tvaru oocyst lze námi detekované genotypy zařadit mezi střevní kryptosporidie. Oocysty *Cryptosporidium* *Apodemus* genotype I byly výrazně menší než oocysty *Cryptosporidium* *Apodemus* genotype II.

Obdobná morfologická diference ve velikosti oocyst různých druhů infikujících jednoho hostitele byla pozorována u prasat (Kváč et al. 2013a; Vítovec et al. 2006). Jak morfometrické znaky, tak i molekulární odlišnosti obou detekovaných genotypů kryptosporidií ukazují na přítomnost dvou odlišných „druhů“.

Při této studii se nepodařilo prokázat významný vliv věku hostitele na prevalenci kryptosporidií. K nakažení jedinců rodu *Apodemus* kryptosporidiemi pravděpodobně dochází již v mladém věku, tak jako tomu bývá například u *C. tyzzeri* nebo *C. suis* na rozdíl od *C. ryanae* a *C. bovis*, u kterých byla popsána infekce častěji u dospělých jedinců (Fayer et al. 2005; 2008; Ren et al. 2012). Nicméně Miyaji et al. (1989) ve své studii popsal souvislost mezi věkem a náchylností *Rattus rattus* ke kryptosporidiovým infekcím.

Z této studie také vyplývá, že kryptosporidiové infekce volně žijících hlodavců na rozdíl od kryptosporidiových infekcí u mnoha dalších hostitelů - zejména u člověka a hospodářských zvířat, které mohou být spojeny s výraznými průjmovými příznaky - *C. viatorum*, *C. parvum* nebo *C. tyzzeri*, probíhají asymptomaticky a nejsou spojeny s žádnými klinickými příznaky, což potvrzují i výsledky jiných studií (Bajer et al. 2001; Chalmers et al. 1997). Němejc et al. (2012) a Kváč et al. (2013b) ukázali, že druhy a genotypy kryptosporidií, které koevoluovaly spolu s hostitelem, jsou manifestovány nízkými intenzitami infekcí, chronickým průběhem a velmi nízkou patogenitou. Krom toho nejsou spojovány s výskytem průjmových onemocnění.

Vzhledem k těmto faktům námi získané výsledky naznačují, že detekované genotypy jsou pravděpodobně hostitelsky specifické. Nicméně je nutné tuto skutečnost ověřit dalšími studiemi.

Do současné doby nebyl žádný z námi detekovaných vzorků popsán jako příčinné agens lidských infekcí.

7. Závěry

- U hlodavců rodu *Apodemus* byla prokázána 12,1 % prevalence kryptosporidií.
- Nebyl zjištěn vztah mezi věkem, pohlavím či výskytem průjmových onemocnění a kryptosporidiovými infekcemi.
- Věková nespecifita a nízké intenzity infekcí ukazují na možnou toleranci hostitelů k infekci.
- Byly detekovány dva nové genotypy kryptosporidií - *Cryptosporidium Apodemus* genotype I a II.
- Nebyl prokázán zoonotický charakter detekovaných kryptosporidií.

8. Seznam literatury

- Anderson B.C. (1987).** Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.*, 24: 235–238.
- Anděra M., Horáček I. (2005).** Poznáváme naše savce. 2. vydání. Jihlava, Sobotáles, 328 s., ISBN 80–86817–08–3.
- Aydin Y., Özkul I.A. (1996).** Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Vet. Parasitol.*, 66: 257–262.
- Bajer A. (2008).** Between-year variation and spatial dynamics of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infections in naturally infected rodent populations. *Parasitology*, 135: 1629–1649.
- Bajer A., Bednarska M., Siński E. (2001).** The ecology of *Cryptosporidium parvum* infection in small rodent populations. *Wiad. Parazytol.*, 47: 747–753.
- Bednarska M., Bejer A., Kulis K., Siński E. (2003).** Biological characterisation of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 10: 163–169.
- Bednarska M., Bejer A., Siński E., Giourard A.S., Tamang L., Graczyk T.K. (2007).** Fluorescent in situ hybridization as a tool to retrospectively identify *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in samples from terrestrial mammalian wildlife. *Parasitol. Res.*, 100: 455–460.
- Caccio S., Pinter E., Fantini R., Mezzaroma I., Pozio E. (2002).** Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literatura review. *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 579–584.
- Carreno R.A., Martin D.S., Barta J.R. (1999).** *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analyses of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.*, 85: 899–904.
- Current W.L., Garcia L.S. (1991).** Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4: 325–358.
- Current W.L., Upton S.J., Haynes T.B. (1986).** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool.*, 33: 289–296.

- Ditrich O., Palkovic L., Šterba J., Prokopič J., Loudová J., Giboda M. (1991).** The first finding of *Cryptosporidium* in man. *Parasitol. Res.*, 77: 44–47.
- Dubey J.P., Markovits J.E., Killary K.A. (2002).** *Cryptosporidium* muris-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet. Pathol.*, 39: 363–371.
- Fayer R. (2004).** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.*, 126: 37–56.
- Fayer R., Morgan U., Upton S.J. (2000).** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. *Int. J. Parasitol.*, 30: 1305–1322.
- Fayer R., Santín M., Macarisin D. (2010).** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. In animals and humans. *Vet. Parasitol.*, 172: 23–32.
- Fayer R., Santín M., Trout J.M. (2008).** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.*, 156: 191–198.
- Fayer R., Santín M., Xiao L. (2005).** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.*, 91: 624–629.
- Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P. (1997).** The general biology of *Cryptosporidium*. In: R. Fayer (Ed.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC press, Boca Raton., 1–42.
- Feng Y. (2008).** *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp. Parasitol.*, 124: 128–137.
- Feng Y., Alderisio K.A., Yang W., Blancero L.A., Kuhne W.G., Nadareski C.A., Reid, M. Xiao L. (2007).** *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 6475–6483.
- Feng Y., Lal A.A., Li N., Xiao L. (2010).** Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.*, 127: 238–242.
- Foo C., Farrell J., Boxell A., Robertson I., Ryan U.M. (2007).** Novel *Cryptosporidium* genotype in wild Australian mice (*Mus domesticus*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 7693–7696.
- Guk S.M., Yong T.S., Park S.J., Park J.H., Chai J.Y. (2004).** Genotype and animal infectivity of human isolate of *Cryptosporidium parvum* in the Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.*, 42: 85–89.
- Guyot K., Follet-Dumoulin A., Lelievre E., Sarfati C., Rabodonirina M., Nevez G., Cailliez J.C., Camus D., Deicas E. (2001).** Molecular characterization

- of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3472–3480.
- Hijjawi N.S., Meloni B.P., Morgyn U.M., Thompson R.C.A. (2001).** Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Int. J. Parasitol.*, 31: 1048–1055.
- Hijjawi N.S., Meloni B.P., Ng'anzo M., Ryan U.M., Olson M.E., Cox P.T., Monis P.T., Thompson R.C.A. (2004).** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int. J. Parasitol.*, 34: 769–777.
- Hijjawi N.S., Meloni B.P., Ryan U.M., Olson M.E., Thompson R.C.A. (2002).** Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.*, 32: 1719–1726.
- Hikosaka K., Nakai Y. (2005).** A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*, *Parasitol. Res.*, 97: 373–379.
- Hůrková L., Hajdušek O., Modrý D. (2003).** Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. *J. Wildl. Dis.*, 39: 441–444.
- Chalmers R.M., Sturdee A.P., Bull S.A., Miller A., Wright S.E. (1997).** The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol. Res.*, 83: 478–482.
- Chalmers R.M., Sturdee A.P., Casemore D.P., Curry A., Miller A., Parker N.D., Richmond T.M. (1994).** *Cryptosporidium muris* in wild house mice (*Mus musculus*) First report in the UK. *Eur. J. Protistol.*, 30: 151–155.
- Iseki M. (1986).** Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Parasitol.*, 35: 521–526.
- 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: 446–454.
- Kimura A., Edagawa A., Okada K., Takimoto A., Yonesho S., Karanis P. (2007).** Detection and genotyping of *Cryptosporidium* from brown rats (*Rattus norvegicus*) captured in an urban area of Japan. *Parasitol. Res.*, 100: 1417–1420.

- 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.
- Klesius P.H., Haynes T.B., Malo L.K. (1986).** Infectivity of *Cryptosporidium* sp. isolated from wild mice for calves and mice. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 189: 192–193.
- 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., 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*). *Vet. Parasitol.*, 31: 218–227.
- Kváč M., McEvoy J., Loudová M., Stenger B., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Rašková V., Moriarty E., Rost M., Macholán M., Piálek J. (2013b).** Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *Int. J. Parasitol.*, v tisku.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. (2007).** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.*, 143: 229–233.
- Kváč M., Vítovec J. (2003).** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med.*, 5: 451–457.
- Liu Ch., Wang L., Lancto Ch.A., Abrahamsen M.S. (2009).** Characterization of a *Cryptosporidium parvum* protein that binds single-stranded G-strand telomeric DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 165: 132–141.
- Matsubayashi M., Kimata I., Iseki M., Hajiri T., Tani H., Sasai K., Baba E. (2005).** Infectivity of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. *Vet. Parasitol.*, 129: 165–168.
- Meisel J.L., Perera D.R., Meligro C., Rubin C.E. (1976).** Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70: 1156–1160.
- Meutin D.J., Van Kruiningen H.J., Kein D.H. (1974).** Cryptosporidiosis in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 165: 914–917.

- Miláček P., Vítovec J. (1985).** Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.*, 50.
- Miyaji S., Tanikawa T., Shikata J. (1989).** Prevalence of *Cryptosporidium* in *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus* in Japan. *Jpn. J. Parasitol.*, 38: 368–372.
- 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*. *Vet. Parasitol.*, v tisku.
- Němejc K., Sak B., Květoňová D., Hanzal V., Jeníková M., Kváč M. (2012).** The first report on *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) (Czech Republic). *Vet. Parasitol.*, 23: 122–125.
- 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. *Infect. Genet. Evol.*, v tisku.
- Nime F.A., Burek J.D., Page D.L., Holscher M.A., Yardley J.H. (1976).** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70: 592–598.
- Özkul I.A., Aydın Y. (1994).** Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Vet. Parasitol.*, 55: 129–132.
- Pancieri R.J., Thomassen R.W., Garner F.M. (1971).** Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.*, 8: 479–484.
- Pedraza-Diaz S., Amar C., Iversen A.M., Stanley P.J., McLauchlin J. (2001).** Unusual *cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* „dog type“ from patients in England. *J. Med. Microbiol.*, 50: 293–296.
- Pedraza-Diaz S., Amar C., McLauchlin J. (2000).** The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 189: 189–194.
- Perz J.F., Le Blancq S.M. (2001).** *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1154–1162.
- Rašková V., Květoňová D., Sak B., McEvoy J., Edwinson A., Stenger B., Kváč M. (2013).** Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri*

- and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *J. Clin. Parasitol.*, 51: 360–632.
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning CH., Jian F., Wang R., Lv Ch., Wang Q., Arrowood M.J., Xiao L. (2012).** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.*, 130: 274–281.
- Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A.A., Pavlásek I. (2003).** Identification of Novel *Cryptosporidium* Genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4302–4307.
- Saitou N., Nei M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406–425.
- Siński E., Bednarska M., Bajer A. (1998).** The role of wild rodents in ecology of Cryptosporidiosis in Poland. *Folia Parasitol.*, 45: 173–174.
- Siński E., Hlebowicz E., Bednarska M. (1993).** Occurrence of *Cryptosporidium parvum* infection in wild small mammals in District of Mazury Lake (Poland). *Acta Parasitol.*, 38: 59–61.
- Slavin D. (1955).** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.*, 65: 262–270.
- Sulaiman I.M., Lal A.A., Xiao L. (2002).** Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the action locus. *J. Parasitol.*, 88: 388–394.
- Sundberg J.P., Hill D., Ryan M.J. (1982).** Cryptosporidiosis in a gray squirrel. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 181: 1420.
- Sunnotel O., Lowery C.J., Moore J.E., Dooley J.S.G., Xiao L., Millar B.C., Rooney P.J., Snelling W.J. (2006).** UNDER THE MICROSCOPE: *Cryptosporidium*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43: 7–16.
- Torres J., Gracenea M., Gomez M.S., Arrizabalaga A., Gonzalez-Moreno O. (2000).** The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Vet. Parasitol.*, 92: 253–260.
- Tyzzer E.E (1907).** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Doc. Exp. Biol. Med.*, 5: 12–13.
- Tyzzer E.E. (1912).** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.*, 26: 394–412.

- Vítovec J., Hamadejová K., Landová L., Kváč M., Květoňová D., Sak B. (2006).** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.*, 53: 239–243.
- Wang R., Wang J., Sun M., Dang H., Feng Y., Ning C., Jian F., Zhang L., Xiao L. (2008).** Molecular characterization of the *Cryptosporidium* cervine genotype from a sika deer (*Cervus nippon Temminck*) in Zhengzhou, China and literature review. *Parasitol. Res.*, 103: 865–869.
- Webster J.P., MacDonald D.W. (1995).** Cryptosporidiosis reservoir in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) in the UK. *Epidemiol. Infect.*, 115: 207–209.
- Xiao L., Bern C., Limor J., Sulaiman I., Roberts J., Checkley W., Cabrera L., Gilman R.H., Lal A.A. (2001).** Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.*, 7: 492–497.
- 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. *Vet. Parasitol.*, 147: 166–170.
- Yamura H., Shirasaka R., Asahi H., Koyama T., Motoki M., Ito H. (1990).** Prevalence of *Cryptosporidium* infection among house rats, *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, in Tokyo, Japan and experimental cryptosporidiosis in roof rats. *Jpn. J. Parasitol.*, 39: 439–444.
- Zambriski J.A., Nydam D.V., Bowman D.D., Bellosa M.L., Burton A.J., Linden, T.C., Liotta J.L., Ollivett T.L., Tondello-Martins L., Mohammed H.O. (2013).** Description of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally challenged dairy calves. *Parasitol. Res.*, 112: 1247–1254.
- Ziegler P.E., Wade S.E., Schaaf S.L., Stern D.A., Nadareski Ch.A., Mohammed H.O. (2007).** Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Vet. Parasitol.*, 147: 176–184.