

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH**

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

**Diverzita, fylogeneze a biologie kryptosporidií infikujících hlodavce
rodu *Apodemus***

Diversity, phylogeny and biology of *Cryptosporidium* spp. infecting
rodents of genus *Apodemus*

DISERTAČNÍ PRÁCE

Ing. Šárka Čondlová

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

České Budějovice 2018

Disertční práce

Čondlová Š. 2018: Diverzita, fylogeneze a biologie kryptosporidií infikujících hlodavce rodu *Apodemus*. [Diversity, phylogeny and biology of *Cryptosporidium* spp. infecting rodents of genus *Apodemus*]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 140 s.

Prohlášení

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě disertační práci zpracovanou na závěr doktorského studia na Zemědělské fakultě 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 Zemědělskou fakultou 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 vědecká práce je založena na výsledcích řady vědeckých publikací, které vznikly za spoluúčasti dalších spoluautorů.

Na tomto místě prohlašuji, že jsem v rámci studia diverzity, fylogeneze a biologie kryptosporidií parazitujících u hlodavců rodu *Apodemus* provedla většinu původního výzkumu a tato práce je založena na vědeckých výsledcích, jichž jsem hlavní autorkou.

V Českých Budějovicích dne

.....

Ing. Čondlová Šárka

Seznam impaktovaných publikací

Disertační práce vychází z těchto publikací:

I. Čondlová Š., Horčíčková M., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R., Stanko M., McEvoy J., Kváč M. 2018. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. Eur. J. Protistol. 63: 1-12.

II. Horčíčková M., Čondlová Š., Holubová N., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R., Sedláček F., Clark M., Giddings C., McEvoy J., Kváč M. 2018. Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). Parasitology. 17: v tisku.

Prohlášení spoluautorů

Všichni níže uvedení spoluautoři prohlásili, že se Ing. Šárka Čondlová podstatným způsobem podílela na publikacích přiložených k této disertační práci. Souhlas jednotlivých spoluautorů byl zaslán školiteli doktorandky prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., a byl ověřen předsedou OR DSP Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích prof. Ing. Janem Trávníčkem, CSc.

prof. Mark Clark, Ph.D.

Catherine Giddings

Ing. Lenka Hlásková

Ing. Nikola Holubová

Ing. Michaela Horčíčková

Ing. Roman Konečný, Ph.D.

prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

RNDr. Dana Květoňová

prof. John McEvoy, Ph.D.

RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

prof. RNDr. František Sedláček, CSc.

doc. RNDr. Michal Stanko, CSc.

V zastoupení všech spoluautorů:

.....
prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
školitel

Ověřil:

.....
prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.
předseda OR DSP

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

Kotková M., Němejc K., Sak B., Hanzal V., Květoňová D., Hlásková L., Čondlová Š., McEvoy J., Kváč M. 2016. *Cryptosporidium ubiquitum*, *C. muris* and *Cryptosporidium* deer genotype in wild cervids and caprids in the Czech Republic, *Folia Parasitol.* 63: 003.

Stenger B. L. S., Horčíčková M., Clark M., Kváč M., Čondlová Š., Khan E., Widmer G., Xiao L., Giddings C., Pennil C., Stanko M., Sak B., McEvoy J. 2018. *Cryptosporidium* infecting wild cricetid rodents from the subfamilies Arvicolinae and Neotominae. *Parasitology.* 145: 326-334.

Práce vznikla za podpory následujících grantů

GAJU 098/2016/Z – Diversity and biology of *Cryptosporidium* infecting rodents from genus *Apodemus* and family Arvicolinae. Grant agency of the University of South Bohemia (2016; řešitel: Ing. Michaela Horčíčková, **spoluřešitel: Ing. Šárka Čondlová**).

GAJU 002/2016/Z – Genetika, zdraví zvířat a kvalita produktů jako základ konkurenceschopnosti (2016–2018; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

GAČR 15-01090S – Revealing *Cryptosporidium* diversity: Linking genetic variation to parasite biology (2015–2017; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

GAJU 11/2013/Z – Zdraví hospodářských zvířat a zdravotní bezpečnost potravin – genetické, parazitární a nutriční aspekty (2013–2015; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

MŠMT KONTAKT LH 11061 – Diversity, biology and phylogeny of *Cryptosporidium* spp. parasiting in rodents. (2011–2014; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala celému týmu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za pomoc a vstřícnost, jmenovitě svému školiteli, prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za odborné vedení a získané zkušenosti. Velké poděkování patří i všem, kteří mi byli nápomocní při získávání materiálu k mojí práci, jmenovitě Ing. Nikole Havrdové, Ing. Ivaně Hájkové a Ing. Michaelle Horčíčkové. V neposlední řadě patří poděkování celé mé rodině a přátelům za podporu po celou dobu mého studia.

Anotace

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou parazitíční protisté patřící do kmene Apicomplexa, převážně infikující buňky gastrointestinální soustavy celé řady obratlovců (ryb, obojživelníků, plazů, ptáků a savců včetně lidí). Zatímco o kryptosporidiových onemocněních lidí a hospodářských zvířat bylo provedeno velké množství studií, výzkum kryptosporidiových infekcí malých savců včetně hlodavců zaostává. Tato práce je zaměřena na studium diverzity a biologických vlastností parazitů rodu *Cryptosporidium* infikujících hlodavce rodu *Apodemus*. Dosavadní znalosti o biologických vlastnostech jednotlivých druhů a genotypů vyskytujících se u hlodavců rodu *Apodemus* jsou většinou velmi malé nebo vůbec žádné. Tato práce by měla utřídit a doplnit chybějící data a tím napomoci k lepšímu porozumění této problematice.

Klíčová slova:

Apodemus; *Cryptosporidium* spp.; molekulární analýzy; multilokusová genotypizace; experimentální infekce; morfologie oocyst; hostitelská specifita; patogenita; prevalence

Annotation

Members of the genus *Cryptosporidium* are parasitic protist belonging to the phylum Apicomplexa, which predominantly infects epithelia of the gastrointestinal tract of a wide range of vertebrates (fish, amphibians, reptiles, birds and mammals including humans). Although there are number of studies about *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis within human population and in the livestock, research on cryptosporidiosis of small mammals, including rodents, has lagged. This study is focused on the prevalence, diversity and biological characteristics of *Cryptosporidium* in rodents of genus *Apodemus*. Our current knowledge about the biological characteristics of individual species and genotypes detected in the mice of the genus *Apodemus* is very superficial or even non-existent. This study should sort and complete data and thus help to better understand this problematic.

Key words:

Apodemus; *Cryptosporidium* spp.; molecular tools; multilocus genotyping; experimental infections; oocyst morphology; host specificity; pathogenicity; prevalence

Souhrn

Tato disertační práce se zabývá prevalencí, diverzitou a biologií kryptosporidií infikujících hlodavce rodu *Apodemus*. V letech 2013–2018 bylo mikroskopickými a molekulárními metodami na přítomnost kryptosporidií vyšetřeno 946 vzorků trusu od myšic – myšice lesní (*Apodemus flavicollis*), myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) a myšice temnopásé (*Apodemus agrarius*) ze 116 lokalit na území 16 států (Belgie, Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Česká republika, Finsko, Francie, Litva, Lotyšsko, Maďarsko, Německo, Nizozemí, Polsko, Rakousko, Rumunsko, Slovensko a Srbsko). Genotypizace byla provedena na základě částečných sekvencí genů kódujících malou ribozomální podjednotku rRNA, aktin, COWP a GP60 amplifikovaných pomocí nested PCR. Specifická DNA kryptosporidií byla detekována u 130 vzorků (celková prevalence v rámci rodu *Apodemus* – 13,7 %). Prevalence v rámci jednotlivých druhů byla u *A. agrarius* 16,8 %, *A. flavicollis* 13,4 %, *A. sylvaticus* 9,4 % a u ostatních jedinců bez určení druhu – *Apodemus* spp. 19,0 %. Fylogenetická analýza prokázala přítomnost dvou nových druhů kryptosporidií (*C. apodemi* a *C. ditrichi*) a dvou nových genotypů (*Cryptosporidium* apodemus genotyp I a *Cryptosporidium* apodemus genotyp II) specifických pro hlodavce rodu *Apodemus* a několika druhů kryptosporidií specifických pro jiné hostitele (*C. andersoni*, *C. hominis*, *C. microti*, *C. muris*, *C. parvum* a *C. tyzzeri*). Nebyly zjištěny žádné rozdíly v intenzitě přirozených infekcí mezi samci a samicemi, ani mezi juvenilními a adultními jedinci. Žádné z přirozeně a ani experimentálně infikovaných zvířat nevykazovalo klinické příznaky kryptosporidiózy. U izolátů *C. apodemi*, *C. ditrichi*, *C. microti* a *C. parvum* byla ověřena hostitelská specifita a stanovena lokalizace vývojových stádií v trávicím traktu pomocí experimentálních infekcí. Molekulární analýzy a histopatologická vyšetření experimentálně infikovaných myšic prokázaly přítomnost specifické DNA ve střevě – u *C. apodemi* v jejunu, ileu, caecu a colonu, v případě *C. ditrichi* a *C. parvum* v jejunu a ileu. Oocysty *C. apodemi* o velikosti 3,9–4,7 $\mu\text{m} \times 3,8$ –4,4 μm (poměr mezi délkou a šířkou je 1,00–1,06) jsou menší než oocysty *C. ditrichi*, které měří 4,5–5,2 $\mu\text{m} \times 4,0$ –4,6 μm (poměr mezi délkou a šířkou je 1,00–1,20). Druhem *C. microti* specifickým pro hraboše se nepodařilo experimentálně nainfikovat hlodavce rodu *Apodemus*, ačkoliv byl tento druh detekován u volně žijících jedinců *A. flavicollis*. V případě *C. parvum* lze na základě výsledků

experimentální infekce konstatovat, že hlodavci rodu *Apodemus* nejsou primárními hostiteli tohoto druhu, nicméně mohou být za určitých podmínek k infekci tímto druhem vnímaví.

Summary

This study deals with the prevalence, diversity and biology of *Cryptosporidium* parasitizing in the rodents of genus *Apodemus*. Faecal samples from mice of the genus *Apodemus*, collected in the 116 localities of 16 states (Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Czech Republic, Finland, France, Lithuania, Latvia, Hungary, Germany, the Netherlands, Poland, Austria, Romania, Slovakia and Serbia) during years 2013–2018, were screened for *Cryptosporidium* by microscopy and PCR/sequencing. Isolates were characterized by sequencing and phylogenetical analyses of the small subunit of ribosomal RNA, actin, *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein and 60 kDa glykoprotein genes. Specific DNA of *Cryptosporidium* was detected in 130 samples (total prevalence of the genus *Apodemus* – 13.7 %). The prevalence among species was 16.8 % for *A. agrarius*, 13.4 % for *A. flavicollis*, 9.4 % for *A. sylvaticus*, and for other individuals unidentified species – *Apodemus* spp. was 19.0 %. Phylogenetical analysis revealed the presence of two new species (*C. apodemi* and *C. ditrichi*) and two novel genotypes (*Cryptosporidium* apodemus genotype I and *Cryptosporidium* apodemus genotype II) specific for the genus *Apodemus* and several species of *Cryptosporidium* specific for other hosts (*C. andersoni*, *C. hominis*, *C. microti*, *C. muris*, *C. parvum* and *C. tyzzeri*). None of the animals that were naturely or experimentally infected with *Cryptosporidium* had clinical signs of cryptosporidiosis. Host specificity and localization of the developmental stages in the digestive tract of *C. apodemi*, *C. ditrichi*, *C. microti* and *C. parvum* was examined experimentally. Molecular analyses and histopathological examinations of experimentally infected mice showed the presence of specific DNA *C. Apodemi* in the intestine – jejunum, ileum, caecum and colon, in the case of *C. ditrichi* and *C. parvum* in jejunum and ileum. *Cryptosporidium apodemi* oocysts size are 3.9–4.7 $\mu\text{m} \times 3.8$ –4.4 μm (with length and width ratio 1.00–1.06). They are smaller than oocysts *C. ditrichi* with size 4.5–5.2 $\mu\text{m} \times 4.0$ –4.6 μm (with length and width ratio 1.00–1.20). Experimental infection by *C. microti* has been found to be specific for the voles and has failed to experimentally infect mice of the genus *Apodemus*, although this species was detected in wild individuals *A. flavicollis*. According to these results, it was found that *C. microti* is host specific for voles but not for rodents of genus *Apodemus* that are random hosts. Based on the results of the experimental infection with *C. parvum*, it can be stated that rodents of

the genus *Apodemus* are not primary hosts of this *Cryptosporidium*, however may under certain conditions be susceptible to infection by this species.

OBSAH

1. ÚVOD	18
2. CÍL PRÁCE	21
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	22
3.1. Historie	22
3.1.1. Taxonomie	23
3.1.2. Vývojový cyklus kryptosporidií	24
3.1.3. Přenos infekce	26
3.1.4. Klinické příznaky kryptosporidové infekce	27
3.1.5. Terapie	27
3.1.6. Hostitelská specifita a zoonotický potenciál	29
3.2. Kryptosporidie a kryptosporidióza hlodavců rodu <i>Apodemus</i>	29
3.2.1. Klinické příznaky kryptosporidiózy u rodu <i>Apodemus</i>	31
3.2.2. Vývojový cyklus a lokalizace kryptosporidií u rodu <i>Apodemus</i>	31
3.2.3. Prevalence kryptosporidií u rodu <i>Apodemus</i>	31
3.3. Fylogeneze a rozšíření rodu <i>Apodemus</i>	33
3.3.1. Fylogenetický vývoj rodu <i>Apodemus</i>	33
3.3.2. Fylogeografie jednotlivých druhů rodu <i>Apodemus</i> žijících v Evropě	35
3.3.2.1. Fylogeografie druhu <i>Apodemus flavicollis</i>	36
3.3.2.2. Fylogeografie druhu <i>Apodemus sylvaticus</i>	37
3.3.2.3. Fylogeografie druhu <i>Apodemus agrarius</i>	39
3.3.2.4. Fylogeografie druhu <i>Apodemus uralensis</i>	40
3.3.2.5. Fylogeografie druhu <i>Apodemus mystacinus</i>	40
4. MATERIÁL A METODIKA	42
4.1. Materiál	42
4.2. Metodika	42

4.2.1. Mikroskopická diagnostika oocyst kryptosporidií	42
4.2.1.1. Barvení dle Miláčka a Vítovce (1985)	42
4.2.1.2. Barvení dle Ziehl-Nielsenova v modifikaci podle Henriksena a Pohlenze (1981)	43
4.2.1.3. Koncentrace oocyst pomocí cukerného roztoku o hustotě 1,33 kg/m ³	44
4.2.1.4. Detekce pomocí specifických protilátek	45
4.2.1.5. Zhotovení nativního preparátu	45
4.2.2. Molekulární diagnostika oocyst kryptosporidií.....	46
4.2.2.1. Izolace DNA.....	46
4.2.2.1.1. Izolace DNA ze vzorku trusu.....	46
4.2.2.1.2. Izolace DNA z tkání.....	47
4.2.2.2. Genotypizace	48
4.2.2.3. Gelová elektroforéza	48
4.2.2.4. Izolace z gelu.....	49
4.2.2.5. Sekvenování	50
4.2.3. Fylogenetická analýza	50
4.2.4. Experimentální infekce	50
4.2.4.1. Experimentální zvířata	50
4.2.4.2. Příprava infekční dávky k experimentální infekci	51
4.2.4.2.1. Sacharózový gradient, Arrowood a Sterling (1987).....	51
4.2.4.2.2. Cesium chloridový gradient	52
4.2.4.2.3. Zjištění koncentrace oocyst	53
4.2.4.3. Infekce experimentálních zvířat	53
4.2.5. Histopatologické vyšetření.....	53
4.2.6. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	55
5. VÝSLEDKY.....	56
5.1. Výskyt a prevalence kryptosporidiových infekcí u rodu <i>Apodemus</i>	56

5.2. Genetická diverzita kryptosporidií	57
5.3. Biologické vlastnosti kryptosporidií parazitujících u rodu <i>Apodemus</i> a popis nových druhů	64
5.3.1 Experimentální infekce	64
5.3.1.1. Experimentální infekce způsobené druhem <i>C. apodemi</i>	64
5.3.1.2. Experimentální infekce způsobené druhem <i>C. ditrichi</i>	65
5.3.1.3. Experimentální infekce způsobené druhem <i>C. microti</i>	67
5.3.1.4. Experimentální infekce způsobené druhem <i>C. parvum</i>	68
5.3.2. Morfometrie oocyst	69
5.4. <i>Cryptosporidium apodemi</i> sp. n. a <i>Cryptosporidium ditrichi</i> sp. n.....	70
6. DISKUZE.....	71
6.1. Výskyt a prevalence	71
6.2. Genetická diverzita kryptosporidií	72
6.3. Hostitelská, věková a pohlavní specifita	77
6.4. Průběh infekce a lokalizace vývojových stádií	78
6.5. Morfologie a morfometrie	80
6.6. Zoonotický potenciál.....	80
7. ZÁVĚRY	83
8. PUBLIKACE, Z NICHŽ VYCHÁZÍ TATO PRÁCE	85
8.1. Publikace I.....	85
8.2. Publikace II	98
9. REFERENCE	113

1. ÚVOD

Hlodavci představují v mnoha ekosystémech jeden z hlavních zdrojů potravy pro predátory, rychle se množí a mohou fungovat i jako vektor mnoha chorob. Jejich všudypřítomnost ve volné přírodě a synantropní způsob života představuje významný zdroj infekčních agens jak pro hospodářská zvířata, tak především pro člověka. Mezi choroby s celosvětovým dopadem na zdraví zvířat a lidí patří mimo jiné i kryptosporidie. K popsání prvních druhů kryptosporidií došlo již na počátku 20. století, ale až na konci tohoto století byly kryptosporidie uznány jako významné patogeny nejen zvířat, ale i člověka. Zástupci tohoto rodu jsou jednobuněční, obligátní parazitičtí prvoci s epiplazmatickou lokalizací endogenních vývojových stádií, kteří převážně 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). V současné době je známo 39 druhů kryptosporidií a velké množství genotypů (Čondlová et al. 2018; Holubová et al. 2016; Horčíčková et al. 2018; Ježková et al. 2016; Kváč et al. 2013a, 2016; Li et al. 2015; Ryan et al. 2015), jež se mezi sebou kromě jiného liší svou hostitelskou specifitou. Přestože je člověk hostitelem pouze jednoho lidského, hostitelsky specifického druhu kryptosporidie – *Cryptosporidium hominis* (Morgan-Ryan et al. 2002), je vnímavý k několika dalším druhům a genotypům, jmenovitě k *C. andersoni*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ditrichi*, *C. erinacei*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. wrairi*, *Cryptosporidium* chipmunk genotypu I, *Cryptosporidium* horse genotypu, *Cryptosporidium* monkey genotypu a *Cryptosporidium* skunk genotypu (Čondlová et al. 2018; Elwin et al. 2012; Feng et al. 2010; Chalmers et Davies 2010; Koehler et al. 2014; Kváč 2009, 2013a, 2014; Muthusamy et al. 2006; Rašková et al. 2013; Robinson et al. 2008; Waldron et al. 2010; Xiao et al. 2009). U více než 1/2 z výše uvedených zoonotických kryptosporidií jsou přirozenými hostiteli volně žijící zvířata a u 1/3 hlodavci.

Kryptosporidióza, onemocnění způsobené parazity rodu *Cryptosporidium*, je průjmové onemocnění, které může být doprovázeno bolestmi břicha, nechutenstvím, zvracením, horečkou a dýchacími problémy. U imunokompetentních jedinců mohou chronické infekce přetrvávat řadu měsíců až let. Patologické procesy ve tkáních hostitele způsobují vodnatý průjem, u pacientů se sníženou imunitou mohou

způsobovat dehydratující chronické průjmy až celkový kolaps organismu (Guk et al. 2004; Sunnotel et al. 2006). Smrt jedince nebývá výjimkou.

I přes často letální průběh kryptosporidiózy není v současné době k dispozici žádný 100% účinný lék. Mezi první klinicky testovaná léčiva byla zahrnuta antibiotika (aminoglykosidová a makrolidová antibiotika včetně jejich kombinací) (Denkinger et al. 2008; Healey et al. 1995; Palmieri et al. 2005; Sprinz et al. 1998; Tali et al. 2011; Tzipori et al. 1995), ačkoliv některá významně zkracují dobu trvání průjmů a snižují množství vylučovaných oocyst, neposkytují komplexní terapeutický efekt a zároveň mají i negativní vliv na organismus, toxický účinek nebo zanechávají rezidua v živočišných produktech (Delafosse et al. 2015; Silverlas et al. 2009). K potlačení klinických příznaků kryptosporidiózy je u lidí používán paromomycin, nitazoxanid a azithromycin (Farthing 2006; Gargala 2008), ale terapie doposud zůstává zaměřena na rehydrataci a iontovou rovnováhu organismu (Fayer et al. 1997).

Co se týká znalostí kryptosporidií a kryptosporidiózy hlodavců, byla na konci dvacátého a počátku jednadvacátého století provedena řada studií zabývajících se kryptosporidiózou hlodavců patřících do čeledi Muridae, například u myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) (Bajer et al. 2001, 2003; Danišová et al. 2017; Hajdušek et al. 2014; Kuliš-Małkowska 2007; Li et al. 2014; Percec-Matysiak et al. 2015; Torres et al. 2000), myšice východní (*Apodemus speciosus*) (Hikosaka et Nakai 2005; Murakoshi et al. 2013; Song et al. 2015), normika rudého (*Clethrionomys glareolus*) (Bajer et al. 2002; Horčíčková et al. 2018; Chalmers et al. 1997; Laakkonen et al. 1994; Sinski et al. 1993, 1998; Stenger et al. 2018; Torres et al. 2000), hraboše polního (*Microtus arvalis*) (Bajer et al. 2002; Bull et al. 1998; Feng et al. 2007; Horčíčková et al. 2018; Sinski et al. 1998; Stenger et al. 2018; Ziegler et al. 2007), myši domácí západoevropské (*Mus musculus domesticus*) (Kváč et al. 2013b; Chalmers et al. 1994, 1995, 1997; Klesius et al. 1986), ondatry pižmové (*Ondatra zibethicus*) (Feng et al. 2007; Perz et Le Blancq 2001; Xiao et al. 2002; Zhou et al. 2004b) a potkana obecného (Iseki 1986; Miyaji et al. 1989; Webster et Macdonald 1995; Yamura et al. 1990).

Řada prací zabývajících se přirozenými infekcemi u rodu *Apodemus* byla zpočátku založena pouze na mikroskopické detekci a morfologických odlišnostech

exogenních vývojových stádií (Bajer 2008; Bajer et al. 2001; Bednarska et al. 2007; Siński et al. 1998), a to z pohledu dnešních znalostí o rozmanitosti rodu nelze pokládat za dostatečné. Jedinými molekulárně potvrzenými kryptosporidiovými infekcemi tak do nedávna byly nálezy *C. muris* u myšice lesní (*Apodemus flavicollis*), myšice východní (*Apodemus speciosus*), myšice temnopásé (*Apodemus agrarius*) a myšice rolní (*Apodemus chejuensis*), *C. parvum* u *Apodemus flavicollis* a *Apodemus agrarius*, *C. ubiquitum* u *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius* a *Apodemus speciosus* a *C. tyzzeri* u *Apodemus flavicollis* (Bajer et al. 2003; Hikosaka et Nakai 2005; Li et al. 2014; Murakoshi et al. 2013; Perec-Matyasiak et al. 2015; Song et al. 2015). Čondlová (2013) ve své práci prokázala, že hlodavci rodu *Apodemus* jsou hostiteli minimálně dvou genotypů kryptosporidií, u nichž není jasná hostitelská a věková specifita nebo průběh infekce a lokalizace parazita v hostiteli.

Z výše uvedeného je zřejmé, že není možné bez molekulárních analýz na úrovni genotypů a subtypů kryptosporidií porozumět jejich diverzitě, epidemiologii a zoonotickému potenciálu (Xiao et Fayer 2008). Taktéž bez dostatečného množství epidemiologických výzkumů nebo bez experimentálních infekcí nelze posoudit hostitelskou specifitu hostitelsky specifických druhů kryptosporidií parazitujících u zástupců rodu *Apodemus*. Cílem předložené práce je vyplnit některé mezery ve studované oblasti.

2. CÍL PRÁCE

Cílem disertační práce bylo popsat diverzitu a biologii kryptosporidií infikujících hlodavce rodu *Apodemus*.

Následující dílčí cíle představují jednotlivé kroky výzkumu nezbytné pro dosažení hlavního cíle:

- Zdokumentovat výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikujících hlodavce rodu *Apodemus*.
- Pomocí molekulárních nástrojů popsat jednotlivé druhy a genotypy kryptosporidií.
- Vyhodnotit diverzitu a prevalenci kryptosporidií v závislosti na druhu hostitele.
- Popsat lokalizaci infekce v gastrointestinálním traktu přirozeně a experimentálně infikovaných hostitelů včetně morfologie vývojových stádií a popisu vývojových cyklů jednotlivých genotypů kryptosporidií.
- Ověřit hostitelskou specificitu jednotlivých genotypů pro další potenciální hostitele.
- Charakterizovat průběh infekce.
- Vyhodnotit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů.
- Na základě získaných výsledků případně popsat nalezené genotypy jako samostatné druhy.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Historie

První druh kryptosporidií byl nalezen v roce 1907 Ernestem Edwardem Tyzzerem ve sliznici žaludku laboratorní myši a pojmenován *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). V roce 1910 byla popsána morfologie vývojových stádií tohoto parazita a kryptosporidie byly uznány jako samostatný rod *Cryptosporidium* (Tyzzer 1910). O dva roky později našel stejný autor další druh s vývojovým cyklem v tenkém střevě myši pojmenovaný jako *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). Dalším popsáným druhem, tentokrát u krůt, bylo *C. meleagridis* v roce 1955 (Slavin 1955). Dlouhou dobu nebyla parazitům rodu *Cryptosporidium* z lékařského ani veterinárního hlediska věnována větší pozornost, až do prvního nálezu tohoto parazita jako původce průjmových onemocnění skotu v roce 1970 a u imunokompromitovaných lidí v roce 1976 (Meisel et al. 1976; Meuten et al. 1974; Nime et al. 1976; Panciera et al. 1971). Další významné pozornosti se kryptosporidiím dostalo v rámci epidemie v Milwaukee (Wisconsin, USA) způsobené kontaminací vodního zdroje druhem *C. hominis* (popsán jako samostatný druh až v roce 2002; Morgan-Ryan et al. 2002). Celkem bylo postiženo přes 400 000 osob, z nichž u více než 600 byla laboratorními metodami prokázána kryptosporidiová infekce. Postižené osoby trpěly těžkými průjmy, inapetencí, úbytkem váhy, horečkou a zvracením (Mac Kenzie et al. 1994). V následujících letech vzrostl počet kryptosporidiových onemocnění způsobených kontaminacemi zdrojů pitné a rekreační vody, ale i přes to se celkový počet osob postižených kryptosporidiózou nepřiblížil k počtům během epidemie v Milwaukee. V rozmezí let 2000–2010 bylo hlášeno více než 200 ohnisek kryptosporidiózy způsobené kontaminacemi zdrojů pitných a rekreačních vod v USA, Velké Británii, Austrálii, na Novém Zélandu, Německu, Švédsku, Japonsku, Španělsku, Norsku, Dánsku, Francii a Irsku (Baldursson et Karanis 2011; Beach 2008; Glaberman et al. 2002; Hlavsa et al. 2011; Chalmers 2012; Karanis et al. 2007; Yorder et al. 2010, 2012).

3.1.1. Taxonomie

Kryptosporidie se v současné době řadí do čeledi Cryptosporidiidae v rámci kmene Apicomplexa. Dříve byly na základě vývojového cyklu v gastrointestinálním traktu nesprávně řazeny mezi kokcidie (Fayer et al. 1997). Pozdější molekulární analýzy však odhalily bližší příbuznost s gregarinami než s kokcidiemi (Carreno et al. 1999). Podobnost s gregarinami lze pozorovat např. ve stavbě organel sloužících k přichycení k hostitelské buňce (Valigurová et al. 2007). Kromě toho, *Cryptosporidium*, ztratilo mnoho *de novo* biosyntetických drah, jako je například schopnost syntetizovat aminokyseliny a nukleotidy. Také nedávný průzkum celogenomové sekvence gregariny (*Ascogregarina taiwanensis*) potvrzuje blízký fylogenetický vztah mezi rody *Ascogregarina* a *Cryptosporidium* (Templeton et al. 2010). Fylogenetický vztah s kokcidiemi a skutečnost, že *Cryptosporidium* bylo nesprávně řazeno, potvrzuje i další výzkum (Cavalier-Smith 2014).

Dle Cavalier-Smith (2014) jsou kryptosporidie taxonomicky řazeny:

nadříše: Eukaryota

říše: Chromista

podříše: Harosa

nadkmen: Alveolata

kmen: Myzozoa

podkmen: Apicomplexa

nadtřída: Apicomonada – Sporozoa

třída: Gregarino-morphea

podtřída: Cryptogregarina

řád: Cryptogregarida

čeleď: Cryptosporidiidae

rod: *Cryptosporidium*

V současné době je známo 39 platných druhů kryptosporidií (viz tabulka 1) a velký počet genotypů.

Tabulka 1: Přehled platných druhů rodu *Cryptosporidium*.

DRUH	HOSTITEL	LOKALIZACE	REFERENCE
<i>C. alticolis</i>	hraboši	tenké střevo	Horčíčková et al. 2018
<i>C. andersoni</i>	skot	slez	Lindsay et al. 2000
<i>C. apodemi</i>*	myšice	střevo	Čondlová et al. 2018
<i>C. avium</i>	ptáci	střevo, vzdušné vaky, ledviny	Holubová et al. 2016
<i>C. baileyi</i>	drůbež	bursa <i>Fabricii</i>	Current et al. 1986
<i>C. bovis</i>	skot	tenké střevo	Fayer et al. 2005
<i>C. canis</i>	psi	tenké střevo	Fayer et al. 2001
<i>C. cuniculus</i>	králíci	střevo	Robinson et al. 2010
<i>C. ditrichi</i>*	myšice	tenké střevo	Čondlová et al. 2018
<i>C. ducismarci</i>	želvy	střevo	Traversa 2010
<i>C. erinacei</i>	ježci	střevo	Kváč et al. 2014
<i>C. fayeri</i>	klokani	střevo	Ryan et al. 2008
<i>C. felis</i>	kočky	tenké střevo	Iseki 1979
<i>C. fragile</i>	žáby	žaludek	Jirků et al. 2008
<i>C. galli</i>	ptáci	žláznatý žaludek	Ryan et al. 2003
<i>C. homai</i>	morčata	střevo	Zahedi et al. 2017
<i>C. hominis</i>	lidé	střevo	Morgan-Ryan et al. 2002
<i>C. huwi</i>	ryby	žaludek, tenké střevo	Ryan et al. 2015
<i>C. macropodum</i>	klokani	střevo	Power et Ryan 2008
<i>C. meleagridis</i>	ptáci	tenké střevo	Slavin 1955
<i>C. microti</i>	hraboši	tlusté střevo	Horčíčková et al. 2018
<i>C. molnari</i>	ryby	žaludek, tenké střevo	Alvarez-Pellitero et Sitjá-Bobadilla 2002
<i>C. muris</i>	hlodavci	žaludek	Tyzzer 1910
<i>C. occultus</i>	potkani	tlusté střevo	Kváč et al. 2018
<i>C. parvum</i>	savci	tenké střevo	Tyzzer 1912
<i>C. proliferans</i>	hlodavci	žaludek	Kváč et al. 2016
<i>C. rubeyi</i>	veverky	střevo	Li et al. 2015
<i>C. ryanae</i>	skot	střevo	Fayer et al. 2008
<i>C. scophthalmi</i>	platýzi	střevo	Alvarez-Pellitero et al. 2004
<i>C. scrofarum</i>	prasata	střevo	Kváč et al. 2013a
<i>C. serpentis</i>	plazi	žaludek	Levine 1980
<i>C. suis</i>	prasata	žaludek, tenké střevo	Ryan et al. 2004
<i>C. testudinis</i>	želvy	žaludek	Ježková et al. 2016
<i>C. tyzzeri</i>	myši	tenké střevo	Ren et al. 2012
<i>C. ubiquitousum</i>	ovce, kozy	střevo	Li et al. 2014
<i>C. varanii</i>	plazi	střevo	Pavlásek et Ryan 2008
<i>C. viatorum</i>	lidé	střevo	Elwin et al. 2012
<i>C. wrairi</i>	morčata	tenké střevo	Vetterling et al. 1971
<i>C. xiaoi</i>	ovce	střevo	Fayer et Santín 2009

*Nové druhy kryptosporidií popsané na základě této práce.

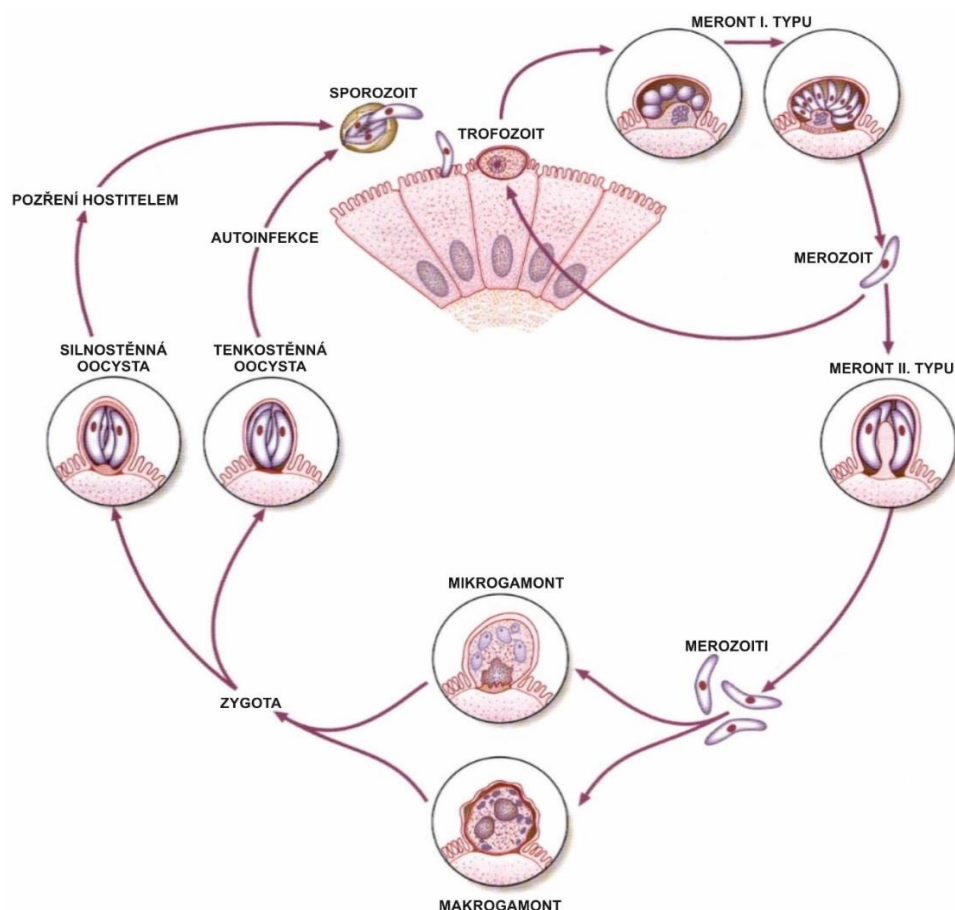
3.1.2. Vývojový cyklus kryptosporidií

Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní a probíhá v epitelálních buňkách zaživacího traktu (Current et Blagburn 1990). Dle lokalizace excystace dělíme

kryptosporidie na žaludeční a střevní druhy. Žaludeční druhy kryptosporidií excystují výhradně ve žláznatém žaludku, sporozoiti těchto druhů jsou přizpůsobeni kyselému prostředí, které by u střevních kryptosporidií způsobilo inaktivaci (Widmer et al. 2007). Excystace střevních druhů kryptosporidií probíhá v duodenu pomocí enzymů slinivky břišní a žluči, ale mechanismus vedoucí k uvolňování sporozoitů není plně objasněn. Dle výsledků experimentálních studií může oocystám k excystaci postačit i vyšší teplota vodního prostředí a změna pH (Smith et al. 2005). Za těchto podmínek dochází k infekcím respiračního traktu (Fayer et al. 1990).

Vývojový cyklus začíná požitím životaschopných oocyst vnímavým jedincem. Tyto oocysty se dostávají do gastrointestinálního (dýchacího – *C. baileyi*) traktu, kde dochází k jejich excystaci a uvolnění sporozoitů aktivně napadajících buňky epitelu (Hijjawi et al. 2002). Dále dochází k merogonii (asexuální množení) za vzniku dvou typů merontů (Hijjawi et al. 2004). Meronti I. typu obsahují 6–8 merozoitů, přičemž merogonie se opakuje. Následuje merogonie II. typu, při níž jsou produkováni jen čtyři merozoiti a nastává sexuální fáze vývojového cyklu – gametogonie (Sunotel et al. 2006). Při gametogonii vznikají gamonti (mikrogamonti a makrogamonti), z nichž dochází ke vzniku mikro a makrogamet a po následném oplození se formuje zygota (Sunotel et al. 2006). Zygota prochází sporogonií (meiosa) při které v ní vznikají čtyři sporozoiti a výsledkem je zralá oocysta sporulující *in situ* (Liu et al. 2009).

U druhu *C. parvum* byla popsána produkce dvou druhů oocyst, tenkostěnných způsobujících autoinfekce hostitele, dochází k excystaci v hostiteli a uvolnění sporozoiti napadají epitelální buňky (Current et Reese 1986), a silnostěnných oocyst (zhruba 80 %) uvolňovaných do vnějšího prostředí se stolicí (případně s jinými tekutinami u extraintestinální lokalizace) (Sunotel et al. 2006). U ostatních kryptosporidií nebyla prokázána přítomnost tenkostěnných oocyst. Životní cyklus je znázorněn na obrázku 1.



Obrázek 1: Vývojový cyklus parazita rodu *Cryptosporidium* (upraveno dle Chiodini et al. 2001).

3.1.3. Přenos infekce

K přenosu infekce dochází nejčastěji požitím oocyst kontaminovanou pitnou nebo rekreační vodou, kde jsou si oocysty schopny za vhodných klimatických podmínek zachovat svoji infekčnost až po několik měsíců (Bednarska et al. 2003; Fayer 2004) a odolávají i běžným dezinfekčním přípravkům používaným při úpravě vody včetně chlorování (Dolejš 2004; Domenéch-Sánchez et al. 2008; Yorder et Beach 2007). Druhá možnost přenosu je kontaminovanou potravou, zejména špatně omytou zeleninou nebo ovocem, konzumovanou v syrovém stavu (Monge et Arias 1996; Robertson et Gjerde 2001; Rzesutka et al. 2010). Mezi další méně časté přenosy infekce patří i přenos ze zvířete na člověka (Pohjola et al. 1986; Preiser et al. 2003; Rašková et al. 2013; Stefanogiannis et al. 2001) a z člověka na člověka, respektive ze zvířete na zvíře (García-Preseido et al. 2013; Gong et al. 2017; Hannah et Riordan 1988; Heijbel et al. 1987; Lee et Greig 2010). Ačkoliv jsou oocysty velmi

odolné, lze je spolehlivě zničit pomocí vysokých teplot např. 65 °C po dobu 20 minut, vroucí vodou po dobu 1 minuty (Fayer 2004) nebo pomocí nízkých teplot -70 °C minimálně po dobu jedné hodiny (Fayer et al. 1996, 1998). Dalším spolehlivým fyzikálním faktorem je UV záření (Clancy et al. 1998) a gama záření (Yu et Park 2003).

3.1.4. Klinické příznaky kryptosporidové infekce

Onemocnění způsobené zástupci rodu *Cryptosporidium* nazýváme kryptosporidióza. Rizikovou skupinou jsou imunodeficientní jedinci, malé děti a imunokompetentní jedinci (Bushen et al. 2006; Chen et al. 2002; Kosek et al. 2001). Tento parazit může způsobovat mírný až vyčerpávající dehydratující průjem. Mezi další příznaky patří bolesti břicha, nechutenství, malátnost, zvracení, únava, horečka, ztráta hmotnosti a dýchací problémy (Fayer 2003; Rašková et al. 2013; Thompson et al. 2005). Klinické příznaky a délka inkubační doby je závislá na imunitním stavu a věku jedince, konkrétním druhu a lokalizaci parazita (Okhuysen et al. 1999, 2002; Pereira et al. 2002). Symptomy typické pro kryptosporidiózu jedinec mít nemusí, pokud je místem infekce tlusté střevo (Vítovec et al. 2006). Bez typických příznaků probíhá také onemocnění způsobené žaludečnými kryptosporidiiemi, kdy jen v několika málo případech byla popsána kachexie (Anderson 1987; Kváč et al. 2016; Pospischil et al. 1987). U zdravého imunokompetentního jedince dojde k nastolení tolerantního vztahu mezi hostilem a parazitem, při kterém je hostitel dlouhodobě, někdy celoživotně parazitován, přičemž infekce probíhá subklinicky s nízkou mírou patogenity (Enemark et al. 2003; Higgins 1999; Ježková et al. 2016; Kváč et al. 2013a, 2014). Průměrná doba nemoci u imunokompetentního člověka je nejčastěji 12 dní a příznaky nemoci může jedinec vykazovat po dobu 2–26 dní.

3.1.5. Terapie

Intenzivní úsilí o nalezení účinného léku, trvá od prvního výskytu kryptosporidiózy u lidí, tedy více než 40 let (Nime et al. 1976). Během této doby bylo vyzkoušeno velké množství chemoterapeutik, ale adekvátní terapie stále chybí. Mezi první klinicky testovaná léčiva byla zahrnuta antibiotika. Spiramycin

(makrolidové antibiotikum) se zpočátku zdál účinný, ale později byla prokázána jeho vysoká toxicita (Portnoy et al. 1984; Saez-Llorens et al. 1989; Wittenberg et al. 1989). Léčba dalším makrolidovým antibiotikem – azithromycinem byla hodnocena se smíšenými výsledky. U imunosuprimovaných dětí a pacientů s chronickou kryptosporidiózou byla popsána symptomatická úleva (Russell et al. 1998; Vargas et al. 1993). Podávání léčebné dávky 500 mg denně u pacientů s AIDS bylo však označováno jako účinné (Kadappu et al. 2002), ale i neúčinné (Blanshard et al. 1997). Obdobné výsledky byly dosaženy i při léčbě dalšími makrolidovými antibiotiky včetně jejich kombinací (Denkinger et al. 2008; Palmieri et al. 2005; Sprinz et al. 1998; Tali et al. 2011). Na zvířecích modelech se vysoké koncentrace paromomycinu (aminoglykosidové antibiotikum) ukázaly jako účinné při léčbě střevních kryptosporidióz (Healey et al. 1995; Tzipori et al. 1995) a jako profylaxe u novorozených telat, jehňat a koz (Fayer et Ellis 1993; Johnson et al. 2000; Mancassola et al. 1995; Viu et al. 2000). U lidí byly hlášeny pozitivní odezvy (snížení frekvence defekace) při perorální léčbě tímto antibiotikem v dávkách od 1500 do 2000 mg / den (Flanigan et Soave 1993), ale také i opětovný relaps infekce. Ačkoliv další klinické studie a statistické analýzy neprokázaly léčivé účinky (Abubakar et al. 2007) paromomycin je běžně využíván jako terapeutické činidlo ve studiích na zvířatech a *in vitro* (Benítez et al. 2007; Graczyk et al. 2011; Klein et al. 2008; Umejiego et al. 2008). Nitazoxanid, lék s širokým antiparazitárním účinkem, byl účinný v buněčných kulturách, u novorozených myší a gnotobiotických selat (Blagburn et al. 1998; Gargala et al. 2000; Theodos et al. 1998). Později však bylo zjištěno, že způsobuje toxicitu v závislosti na podané dávce (Gargala et al. 2000; Giacometti et al. 1999; Theodos et al. 1998). Ačkoliv některá léčiva významně zkracují dobu trvání průjmů a snižují množství vylučovaných oocyst, neposkytují komplexní terapeutický efekt a zároveň mají i negativní vliv na organismus, toxický účinek nebo zanechávají rezidua v živočišných produktech (Delafosse et al. 2015; Silverlas et al. 2009). V současné době je k potlačení klinických příznaků kryptosporidiózy u lidí používán paromomycin, nitazoxanid a azithromycin (Farthing 2006; Gargala 2008), ale terapie doposud zůstává zaměřena na rehydrataci a iontovou rovnováhu organismu.

3.1.6. Hostitelská specifita a zoonotický potenciál

Většina druhů kryptosporidií je považována za méně hostitelsky specifické např. *C. parvum* a *C. ubiquitum* patří mezi druhy, kterými byla jak přirozeně, tak experimentálně infikována řada hostitelů včetně člověka (DuPont et al. 1995; Fayer 2004; Fayer et al. 2010; Li et al. 2014; Rašková et al. 2013). Naopak za hostitelsky úzce specifické považujeme druhy *C. canis*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. suis* nebo *C. wrairi* (Kváč et al. 2013a; Morgan-Ryan et al. 2002). Z výše uvedeného vyplývá, že i hostitelsky úzce specifický druh může vzácně najít vhodné podmínky v nespecifickém hostiteli.

Zoonotický potenciál byl doposud potvrzen u několika druhů/genotypů kryptosporidií (*C. andersoni*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ditrichi*, *C. erinacei*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. wrairi*, *Cryptosporidium* chipmunk genotypu I, *Cryptosporidium* horse genotypu, *Cryptosporidium* monkey genotypu a *Cryptosporidium* skunk genotypu) (Čondlová et al. 2018; Elwin et al. 2012; Feng et al. 2010; Chalmers et Davies 2010; Koehler et al. 2014; Kváč 2009, 2013a, 2014; Muthusamy et al. 2006; Rašková et al. 2013; Robinson et al. 2008; Waldron et al. 2010; Xiao et al. 2009).

3.2. Kryptosporidie a kryptosporidióza hlodavců rodu *Apodemus*

Ačkoliv bylo *Cryptosporidium* detekováno jako první u laboratorních myší (*Mus musculus*), o kryptosporidiových infekcích divokých myší a hlavně myší rodu *Apodemus* je doposud známo velmi málo informací a to zejména o prevalenci, konkrétních druzích a genotypech kryptosporidií infikujících tento rod, jejich zoonotickém potenciálu, vývojovém cyklu, patogenitě a klinických příznacích.

Velký počet studií zabývajících se kryptosporidiózou u hlodavců rodu *Apodemus* byl prováděn pouze na základě mikroskopické detekce a morfologických odlišnostech exogenních vývojových stádií (Bajer 2008; Bajer et al. 2001; Bednarska et al. 2007; Chalmers et al. 1997; Siński et al. 1998; Torres et al. 2000). Chalmers et al. (1997) se jako první zmiňují o přítomnosti *C. parvum* u *A. sylvaticus* ve Velké Británii. Stejný druh byl popsán i u *A. flavicollis* v Polsku (Bednarska et al. 2007) a později byl mikroskopickými analýzami nalezen i u *A. sylvaticus* a *A. flavicollis* ve Španělsku

(Torres et al. 2000). Druhým popsáným druhem u *A. sylvaticus* bylo *C. muris* ve Velké Británii (Chalmers et al. 1997) a Španělsku (Torres et al. 2000). Velmi nízké specifitě a senzitivitě těchto metod odpovídají i výsledná data rozdělující nalezené druhy dle velikosti pouze na střevní a žaludeční kryptosporidie.

S nástupem molekulárních metod byla naplno potvrzena domněnka o nepřesnosti předešlých výsledků. Hajdušek et al. (2004) při výzkumu v České republice popsal nález nového genotypu kryptosporidií u *A. sylvaticus* (AY282699), který byl fylogeneticky nejbližší izolátu nalezenému v praseti (popsaném jako *C. parvum*) (Xiao et al. 2000). I další výzkum z České republiky poukázal na to, že hlodavci rodu *Apodemus* jsou hostiteli dalších dvou nových genotypů kryptosporidií: *Cryptosporidium apodemus* genotyp I u *A. sylvaticus* i *A. flavicollis* a *Cryptosporidium apodemus* genotyp II u *A. flavicollis* (Čondlová 2013).

Na území Slovenska byl popsán výskyt *C. ubiquitum* u *A. flavicollis* a *A. agrarius* (Li et al. 2014), *C. parvum* u *A. flavicollis* (alelická rodina III subtyp A10 a alelická rodina IIa subtyp A18G3R1) a *A. agrarius* (alelická rodina IIi subtyp A10, alelická rodina IIc subtyp A5G3a a alelická rodina IIa subtyp A18G3R1), *C. scrofarum* u *A. flavicollis* i *A. agrarius*, *C. suis* u *A. flavicollis* a *C. hominis* a *Cryptosporidium muscrat* genotyp II u *A. agrarius* (Danišová et al. 2017).

Obdobné výsledky ukázaly i studie na území Polska potvrzující výskyt *C. tyzzeri* u *A. flavicollis* (Bajer et al. 2003), *C. ubiquitum* u *A. flavicollis*, *C. parvum* u *A. agrarius* (Perec-Matysiak et al. 2015) a *C. parvum* u *A. flavicollis* (Kuliś-Malkowska 2007).

V Japonsku Hikosaka a Nakai (2005) popsali nový genotyp *C. muris* Japanese field mouse genotyp u *A. speciosus* a Murakoshi et al. (2013) ve své studii poukázali na nález *C. ubiquitum*, *C. muris* a nového genotypu *Cryptosporidium* Naruko genotypu taktéž u *A. speciosus*. Kryptosporidiózou *A. agrarius* a *A. chejuensis* se zabývali i Song et al. (2015) v Koreji, kde jejich výzkum odhalil přítomnost *C. ubiquitum* (popsáno jako cervine genotyp I), *Cryptosporidium* bear genotypu a *C. muris* u obou zmíněných druhů a *Cryptosporidium* chipmunk genotypu I vyskytujícího se pouze u *A. agrarius*.

3.2.1. Klinické příznaky kryptosporidiózy u rodu *Apodemus*

Do současné doby nebyly provedeny téměř žádné experimentální infekce hlodavců rodu *Apodemus*, taktéž nejsou žádné zmínky o výskytu těchto parazitů v chovech. Ani u dospělých jedinců ani mláďat nebyly doposud prokázány žádné klinické příznaky kryptosporidiových infekcí.

3.2.2. Vývojový cyklus a lokalizace kryptosporidií u rodu *Apodemus*

O vývojovém cyklu a lokalizaci jednotlivých druhů kryptosporidií, které byly u hlodavců rodu *Apodemus* nalezeny, bylo doposud popsáno velmi málo.

U infekce druhem *C. parvum* se z důvodu široké hostitelské specifity předpokládá, že vývojový cyklus bude u všech hostitelů stejný a je tedy vázán na tenké střevo. Nicméně v pracích, které popisují výskyt *C. parvum* u myšic je zásadním nedostatkem absence molekulárních analýz, a tedy nelze s určitostí říci, zda se jednalo skutečně o *C. parvum* nebo nějaký, dosud nepopsaný druh/genotyp kryptosporidie.

Lokalizace vývojových stádií při experimentální infekci druhem *C. tyzzeri* u *A. flavicollis* nebyla popsána. Prepatentní perioda trvala méně než 7 DPI a patentní perioda trvala déle než 56 dní (Bednarska et al. 2003).

Stejně tak nejsou předpokládány odlišnosti ve vývojovém cyklu *C. muris* myši a myšic. Lokalizace vývojových stádií *C. muris* Japanese field mouse genotypu byla popsána ve žláznaté části žaludku *A. speciosus*, v žádném z dalších orgánů (srdce, plíce, ledviny, játra, slinivka břišní, tlusté a tenké střevo) nebyla detekována vývojová stádía tohoto druhu (Hikosaka et Nakai 2005). Prepatentní perioda byla 17 dní u dospělých jedinců a 19 dní u mláďat starých dva týdny. Stejných poznatků bylo dosaženo i při experimentální infekci tímto genotypem u SCID myši s prepatentní periodou 11 dní (Hikosaka et Nakai 2005).

3.2.3. Prevalence kryptosporidií u rodu *Apodemus*

Prevalence kryptosporidií se u volně žijících myšic liší v rámci jednotlivých druhů a států. Tyto odlišnosti mohou být způsobené různou hustotou populace a stářím vyšetřených jedinců, velkou roli hrají i použité diagnostické metody

(mikroskopie/molekulární analýzy) a geografické odlišnosti. Promoření populace *A. flavicollis* se pohybuje v rozmezí 8–68 %, u *A. sylvaticus* je to 4–26 % a u *A. agrarius* 33–61 % (Bajer 2008; Bajer et al. 2001; Bajer et al. 2003; Bednarska et al. 2007; Čondlová 2013; Danišová et al. 2017; Hajdušek et al. 2004; Chalmers et al. 1997; Kuliš-Małkowska 2007; Li et al. 2014; Perec-Matysiak et al. 2015; Sinski et al. 1998; Torres et al. 2000). Obdobná prevalence byla zjištěna také u dalších druhů vyskytujících se v Asii (u *A. agrarius* 33 %, *A. speciosus* 8–26 % a u *A. chejuensis* okolo 32 %) (Hikosaka et Nakai 2005; Murakoshi et al. 2013; Song et al. 2015). Prevalence v jednotlivých státech u konkrétních druhů myšic jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Prevalence v jednotlivých státech u konkrétních druhů myšic.

Stát	Druh hostitele	Počet pozitivních/vyšetřených zvířat	Prevalence (%)	Reference
Anglie	<i>A. sylvaticus</i>	60/230	26	Chalmers et al. 1997
Španělsko	<i>A. sylvaticus</i>	27/278	9,7	Torres et al. 2000
	<i>A. flavicollis</i>	1/2	50	Torres et al. 2000
Česká Republika	<i>A. sylvaticus</i>	1/25	4	Čondlová 2013
	<i>A. flavicollis</i>	24/182	13,2	Čondlová 2013
	<i>A. flavicollis</i>	2/*	–	Hajdušek et al. 2004
Slovensko	<i>A. flavicollis</i>	2/*	–	Li et al. 2014
	<i>A. agrarius</i>	2/*	–	Li et al. 2014
	<i>A. flavicollis</i>	15/73	20,5	Danišová et al. 2017
	<i>A. agrarius</i>	34/107	31,8	Danišová et al. 2017
Polsko	<i>A. flavicollis</i>	–	27,8	Bajer et al. 2001
	<i>A. flavicollis</i>	8/9	88,9	Bajer et al. 2003
	<i>A. flavicollis</i>	178/638	27,8	Bajer 2008
	<i>A. flavicollis</i>	4/9	44,4	Bednarska et al. 2007
	<i>A. flavicollis</i>	*/302	–	Kuliš-Małkowska 2007
	<i>A. flavicollis</i>	56/82	68,3	Perec-Matysiak et al. 2015
	<i>A. agrarius</i>	71/115	61,7	Perec-Matysiak et al. 2015
	<i>Apodemus</i> sp.	–	24	Sinski et al. 1998
Japonsko	<i>A. speciosus</i>	2/25	8	Hikosaka et Nakai 2005
	<i>A. speciosus</i>	4/15	26,7	Murakoshi et al. 2013
Korea	<i>A. agrarius</i>	56/169	33,1	Song et al. 2015
	<i>A. chejuensis</i>	6/19	31,6	Song et al. 2015

*Počet vyšetřených zvířat neuveden.

3.3. Fylogeneze a rozšíření rodu *Apodemus*

Rod *Apodemus* (řád: Hlodavci; čeleď: Muridae) zahrnuje 20–22 existujících druhů (Musser et al. 1993), které obývají Palearktické a Indomalajské oblasti. Rod je dělen do 4 velkých skupin (*Apodemus* – podskupiny *Agrarius* a *Draco*, *Sylvaemus*, *Karstomys* a skupina *Argenteus/Gurkha*) na základě fylogenetického vývoje (tabulka 3 – není zahrnut druh *A. avicennicus* vyskytující se ve velmi malých počtech) (Filippucci et al. 2002; Liu et al. 2014; Liu et al. 2012; Michaux et al. 2002; Nemirov et al. 2002; Reutter et al. 2003; Wójcik et al. 2004).

Tabulka 3: Rozdělení jednotlivých druhů rodu *Apodemus* do skupin dle fylogenetického vývoje.

Podskupina	Druh
<i>Karstomys</i>	<i>A. epimelas</i>
	<i>A. mystacinus</i>
<i>Sylvaemus</i>	<i>A. alpicola</i>
	<i>A. flavicollis</i> (s poddruhem <i>A. ponticus</i>)
	<i>A. fulvipectus/witherbyi</i>
	<i>A. hermonensis</i>
	<i>A. hyrcanicus</i>
	<i>A. pallipes/wardi</i>
	<i>A. sylvaticus</i>
	<i>A. uralensis</i>
<i>Apodemus</i>	<i>A. agrarius</i>
	<i>A. draco</i>
	<i>A. chevreri</i>
	<i>A. ilex</i>
	<i>A. latronum</i>
	<i>A. orestes</i>
	<i>A. peninsulae</i>
	<i>A. semotus</i>
	<i>A. speciosus</i>
<i>Argenteus/Gurkha</i>	<i>A. argenteus</i>
	<i>A. gurkha</i>

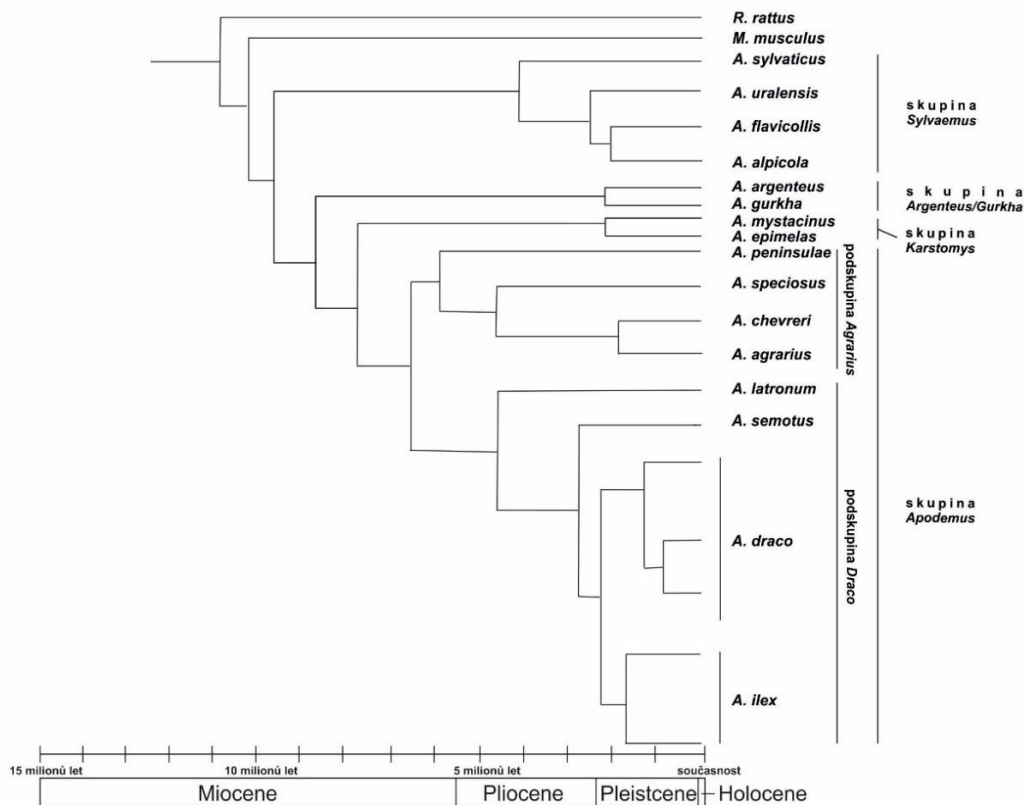
3.3.1. Fylogenetický vývoj rodu *Apodemus*

Oddělení rodu *Apodemus* v rámci hlodavců je datováno před 10,84 miliony lety v rámci Neogénu, epocha Miocén (vrchní Miocén), věk Torón (Liu et al. 2012). Zhruba před 9,63 miliony let došlo k rozdělení rodu do dvou stěžejních skupin *Sylvaemus* a *Apodemus*, které se od této doby vyvíjejí zcela samostatně (Liu et al. 2004; Liu et al. 2012). V následujícím období došlo k rozčlenění skupiny *Apodemus*

na *Apodemus* a *Argenteus/Ghurka* skupinu (přesné časové vymezení není známo) a poté dále na *Apodemus* a *Karstomys* před zhruba 8,35 miliony let (tedy na druhy *A. mystacinus* a *A. epimelas* – přesné datování oddělení těchto dvou druhů od sebe není známo) (Filippucci et al. 2002; Liu et al. 2004; Liu et al. 2012; Michaux et al. 2002). Skupina *Apodemus* prodělala další významné změny zhruba před 7,06 miliony let, kdy se rozdělila na podskupiny *Agrarius* a *Draco* (Liu et al. 2004; Liu et al. 2012). Během Neogénu, epocha Miocén (vrchní Miocén), věk Mesin, zhruba před 6,12 miliony let se v rámci podskupiny *Agrarius* vyčlenil další samostatný druh *A. peninsulae* (Liu et al. 2012). Toto vyčlenění se stává poslední změnou v rámci epochy Miocén, která trvala před 23,00–5,30 miliony let.

V rámci Neogénu, epocha Pliocén (trvajícím před 5,30–2,50 miliony let), věk Zanccl před 5,13 miliony let došlo k vyčlenění druhu *A. speciosus* v rámci podskupiny *Agrarius* (Liu et al. 2004; Liu et al. 2012). Vývoj prodělala i skupina *Sylvaemus* v rámci níž se vyčlenily druhy *A. sylvaticus* (před 3,97 miliony let), *A. uralensis* (před 2,87 miliony let, již ve věku Piacenz) (Liu et al. 2012; Michaux et al. 2002). Ke změnám došlo i v rámci podskupiny *Draco*, v níž vznikly druhy *A. latronum* (před 4,74 miliony lety) a *A. semotus* (před 2,67 miliony let, ve druhém věku Pliocénu zvaném Piacenz) (Liu et al. 2004; Liu et al. 2012).

K dalším změnám a oddělování druhů v rámci jednotlivých skupin a podskupin došlo v rámci Kvartéru, epocha Pleistocén (trvajícím před 2,50–0,02 miliony let), kdy se ve věku Gelas před 2,25 miliony let od sebe oddělily druhy *A. draco* a *A. ilex* patřící do skupiny *Apodemus* a podskupiny *Draco*, a také *A. flavicollis* a *A. alpicola* (před 2,20 miliony let) patřící do skupiny *Sylvaemus* (Liu et al. 2004; Liu et al. 2012; Michaux et al. 2002). Za nejmladší druhy vzniklé před 1,56 milionem let ve věku Kalábru jsou považovány druhy *A. chevreri* a *A. agrarius* (Liu et al. 2004; Liu et al. 2012). V době zhruba před 1,15 milionem let došlo v rámci jednotlivých druhů k dalšímu odlišování v rámci haplotypů (Liu et al. 2012). Na obrázku 2 je uvedeno postupné vyčleňování jednotlivých druhů.



Obrázek 2: Chronogram rodu *Apodemus* sestavený na základě sekvencí mtDNA cytochromu-b. Délky větví znázorňují čas (upraveno dle Liu et al. 2004; Liu et al. 2012).

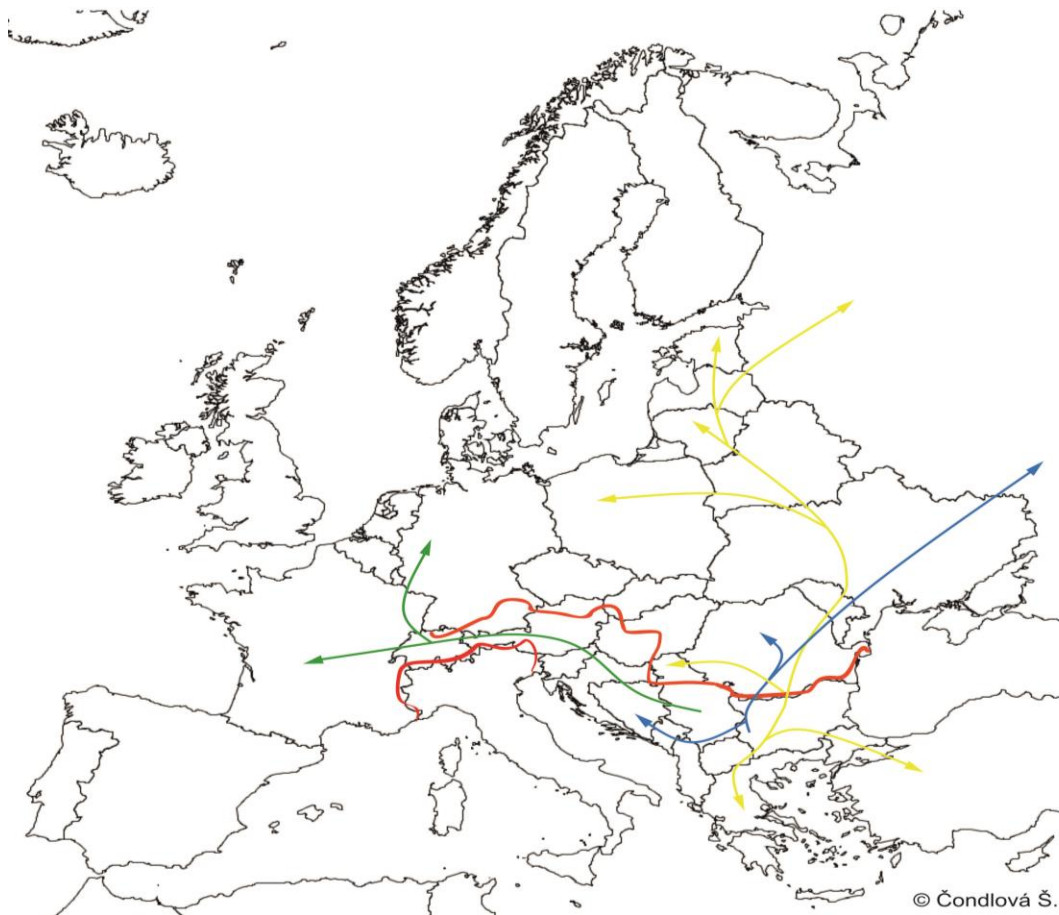
3.3.2. Fylogeografie jednotlivých druhů hlodavců rodu *Apodemus* žijících v Evropě

Území Evropy svým výskytem překrývá osm druhů – myšice lesní (*Apodemus flavicollis*), myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*), myšice temnopásá (*Apodemus agrarius*), myšice malooká (*Apodemus uralensis* – dříve *A. microps*), myšice krasová (*Apodemus mystacinus*), myšice krasová – západní (*Apodemus epimelas*), myšice alpská (*Apodemus alpicola*) a myšice stepní (*Apodemus fulvipectus/witherbyi*), přičemž nejhojnějšími druhy na tomto území jsou myšice lesní, křovinná, temnopásá a malooká, které se zároveň vyskytují i na území České republiky. Během posledních zhruba 2,40 milionů let podstoupily některé živočišné druhy několik změn v rámci populací (zmenšení a zvětšení) způsobených klimatickými změnami (Michaux et al. 2003). Na základě těchto změn populací se pomocí několika studií založených na odlišnostech sekvencí mitochondriální DNA (mtDNA cytochromu-b) podařilo postupně získat přesná fylogeografická data o některých druzích myšic (Chelomina

et Atopkin 2010; Koh et al. 2014; Michaux et al. 2003, 2004, 2005). U druhů *A. alpicola*, *A. epimelas* a *A. fulvipectus/witherbyi* nejsou tyto informace o fylogeografii v rámci jednotlivých druhů dostupné, což je nejčastěji způsobeno jejich výskytem pouze na omezeném území nebo velmi malou početností populace (Reutter et al. 1999).

3.3.2.1. Fylogeografie druhu *Apodemus flavicollis*

Rekolonizace tímto druhem je datována v epoše Holocén třemi odlišnými liniemi, které na různých lokalitách v italsko-balkánské oblasti přežily poslední dobu ledovou (Michaux et al. 2005). Tyto linie se následně rozšířily do západní Palearktické oblasti, Ruska, Rumunska, bývalé Jugoslávie, Estonska, Litvy, Běloruska a části Balkánského poloostrova (Řecko, Rumunsko a evropská část Turecka) a až poté následovalo další rozšiřování do oblastí známých v dnešní době (Michaux et al. 2005). Přítomnost topografických překážek, jako jsou hory, pohoří, řeky, jezera a další zpomalila nebo úplně zabránila expanzi druhu, což bylo prokázáno mimo jiné i u populace v Srbsku, kdy na jih od Dunaje došlo k rozšíření jedinců první linie (rozšiřujících se do západní Palearktické oblasti), zatímco populace severně od Dunaje spadá do třetí linie (rozšiřující se do severní Evropy, Ruska, Estonska, Litvy, Běloruska, části Balkánu a evropské části Turecka) (Bugarski-Stanojevic et al. 2008; Michaux et al. 2004, 2005a). Obrázek 3 znázorňuje jednotlivé linie a jejich postupné rozšiřování.

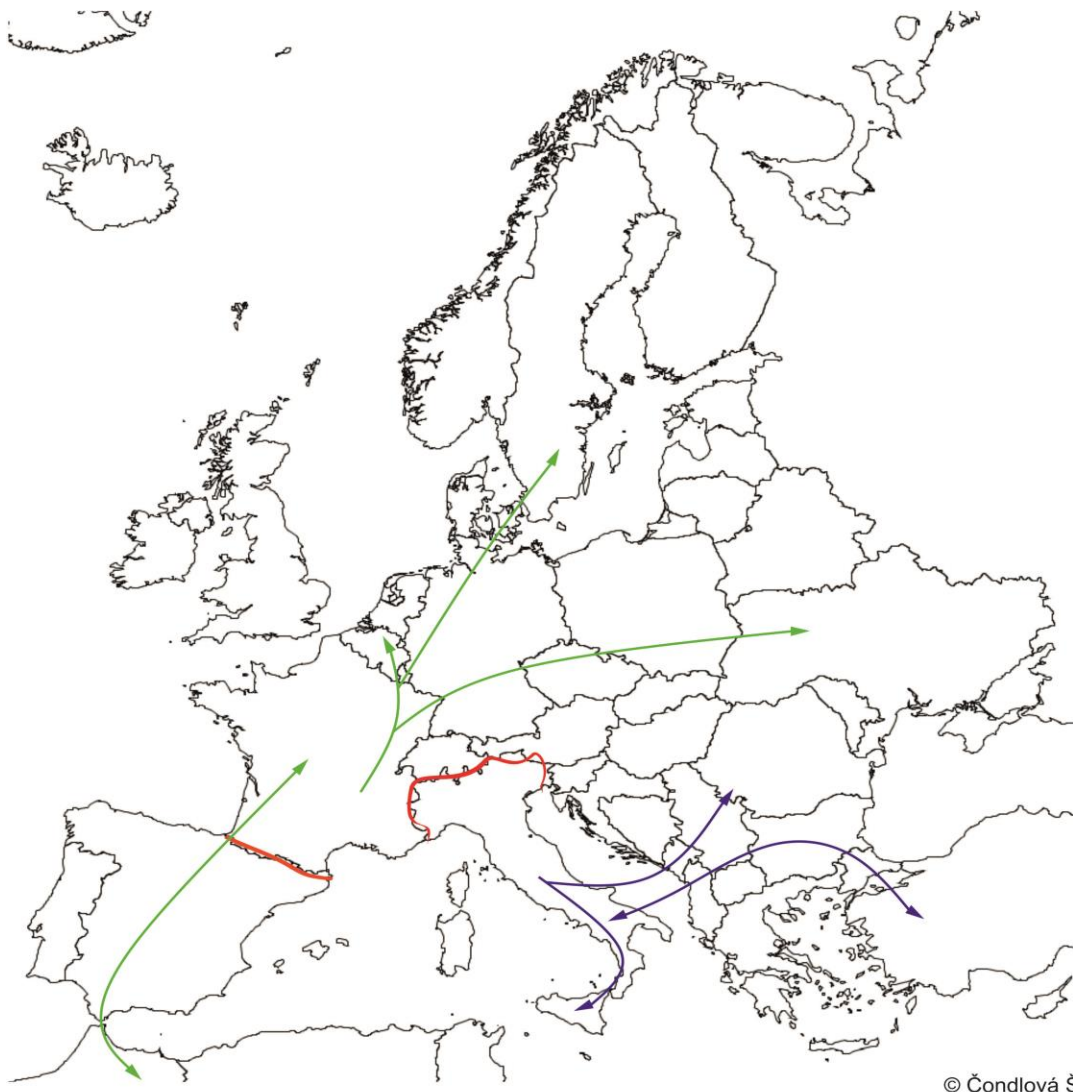


Obrázek 3: Fylogeografie druhu *Apodemus flavicollis*. Zeleně je znázorněna linie kolonizující západní Palearktické oblasti, modře linie jižního Ruska, Rumunska, bývalé Jugoslávie a žlutě linie severní Evropy, části Balkánu a evropské části Turecka. Červenou barvou jsou znázorněny nejvýznamnější topografické překážky (Dunaj a Alpy).

3.3.2.2. Fylogeografie druhu *Apodemus sylvaticus*

U druhu *A. sylvaticus* jsou známy dvě linie podílející se na rekolonizaci území po poslední době ledové, a to linie v jihozápadní Evropě (Pyrenejský poloostrov a jižní Francie) a italsko-balkánská linie (Gemmeke et al. 1987; Libois et al. 2001; Michaux et al. 2005a). Linie žijící v jihozápadní Evropě (Pyrenejský poloostrov a jižní Francie) rekolonizovala celé hlavní části západní Palearktické oblasti (severní a střední Evropu). Pyreneje působící jako efektivní bariéra, částečně omezily a zpomalily expanzi na sever (Michaux et al. 1998). Tato linie dále invadovala do severní Afriky, pravděpodobně přes Gibraltarskou úžinu (Libois et al. 2001; Michaux et al. 2003). Distribuce druhu *A. sylvaticus* v západní Evropě a severní Africe je pravděpodobně spojena s jeho menšími ekologickými nároky oproti *A. flavicollis*, které mu umožňují kolonizovat různorodé regiony (např. středomořské

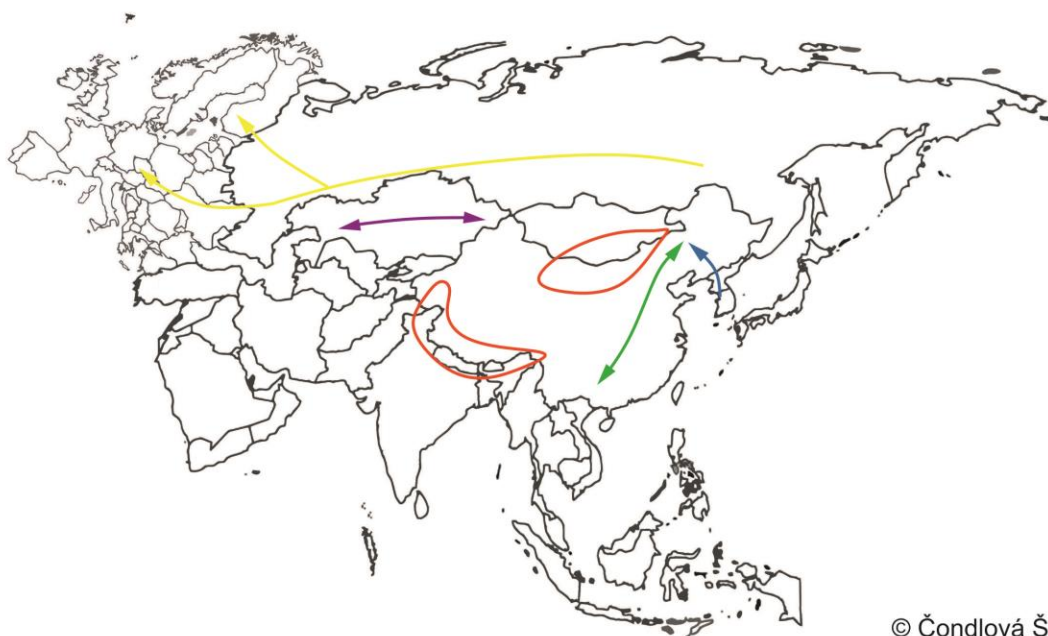
křoviny a otevřená pole s malými háji). Druhé italsko-balkánské linii v postglaciální expanzi do severní a západní Evropy zcela zabránily Alpy, které jsou považovány za jednu z nejvýznamnějších topografických překážek v Evropě (Michaux et al. 2005a). Rozšiřování této linie tudíž pokračovalo směrem na jih do Sicílie, která byla úkrytem stabilní populace oddělené od italské populace před 0,90–0,80 miliony let, a směrem na jihovýchod (Michaux et al. 2003). Časté poklesy hladiny Jadranského moře během kvartérních dob ledových (Strahler et Strahler 1989) pravděpodobně dovolily italské a balkánské linii *A. sylvaticus* zůstat v kontaktu. Také nepřítomnost Marmarského moře usnadnila kolonizaci západní části Turecka (Michaux 2003). Obrázek 4 znázorňuje jednotlivé linie a jejich postupné rozšiřování.



Obrázek 4: Fylogeografie druhu *Apodemus sylvaticus*. Zeleně je znázorněna linie jihozápadní Evropy a modře italsko-balkánská linie. Červenou barvou jsou znázorněny nejvýznamnější topografické překážky (Pyreneje a Alpy).

3.3.2.3. Fylogeografie druhu *Apodemus agrarius*

K rozšíření druhu *A. agrarius* v Indomalajské a Palearktické oblasti došlo v Holocénu během klimatického optima (před 0,20–0,10 milionem let) směrem od východu na západ. Na kolonizaci území se tedy podílely dvě větve evropsko-sibiřsko-kazachstánská a dálně východní-čínská, které se štěpí na čtyři linie: čínskou, korejskou, ruského dálného východu a střední Asie. Nejvíce polymorfní, a tedy i nejstarší je větev ruského dálného východu (Atopkin et al. 2007; Sakka et al. 2010). Rozšiřování probíhající od východu se o několik let později zkomplikovalo následnou disjunkcí areálu způsobenou chladnějším klimatem a zvětšením pouště Gobi, což vedlo k oddělení linie ruského dálného východu (Harrison et al. 2001; Zhang et al. 2008; Zhou et al. 2004a). Tato linie dále kolonizovala centrální a západní Palearktickou oblast, k čemuž došlo poměrně nedávno (Sakka et al. 2010). Další významnou topografickou překážkou v tomto případě jsou i Himaláje, které spolu s pouští Gobi úplně zabránily západní kolonizaci čínskou linií. Ačkoliv se touto problematikou zabývalo několik studií, doposud nebyla fylogeografie tohoto druhu dopodrobna zcela odhalena (Hildebrand et al. 2013; Koh et al. 2014; Sakka et al. 2010). Obrázek 5 znázorňuje jednotlivé linie a jejich postupné rozšiřování.



Obrázek 5: Fylogeografie druhu *Apodemus agrarius*. Zeleně je znázorněna čínská linie, modře korejská linie, fialově linie střední Asie a žlutě linie ruského dálného východu. Červenou barvou jsou znázorněny nejvýznamnější topografické překážky (poušť Gobi a Himaláje).

3.3.2.4. Fylogeografie druhu *Apodemus uralensis*

Dvě linie druhu *A. uralensis* podílející se na rozšiřování do jednotlivých lokalit známých v dnešní době se od sebe oddělily přibližně před 1,50 milionem let (Chelomina et Atopkin 2010). Západní linie se rozšířila do Evropy směrem od Sibíře přes severní část Uralského pohoří a dále směrem k severnímu Kavkazu odkud došlo k dalšímu rozšiřování do Turecka a států ve střední Evropě. Východní linie tohoto druhu kolonizovala Asii směrem od Turkmenistánu přes Uzbekistán až do Číny (Karamysheva et al. 2010). V rozšiřování tohoto druhu nehrály topografické překážky žádný podstatný vliv (Chelomina et Atopkin 2010; Karamysheva et al. 2010). Obrázek 6 znázorňuje jednotlivé linie a jejich postupné rozšiřování.

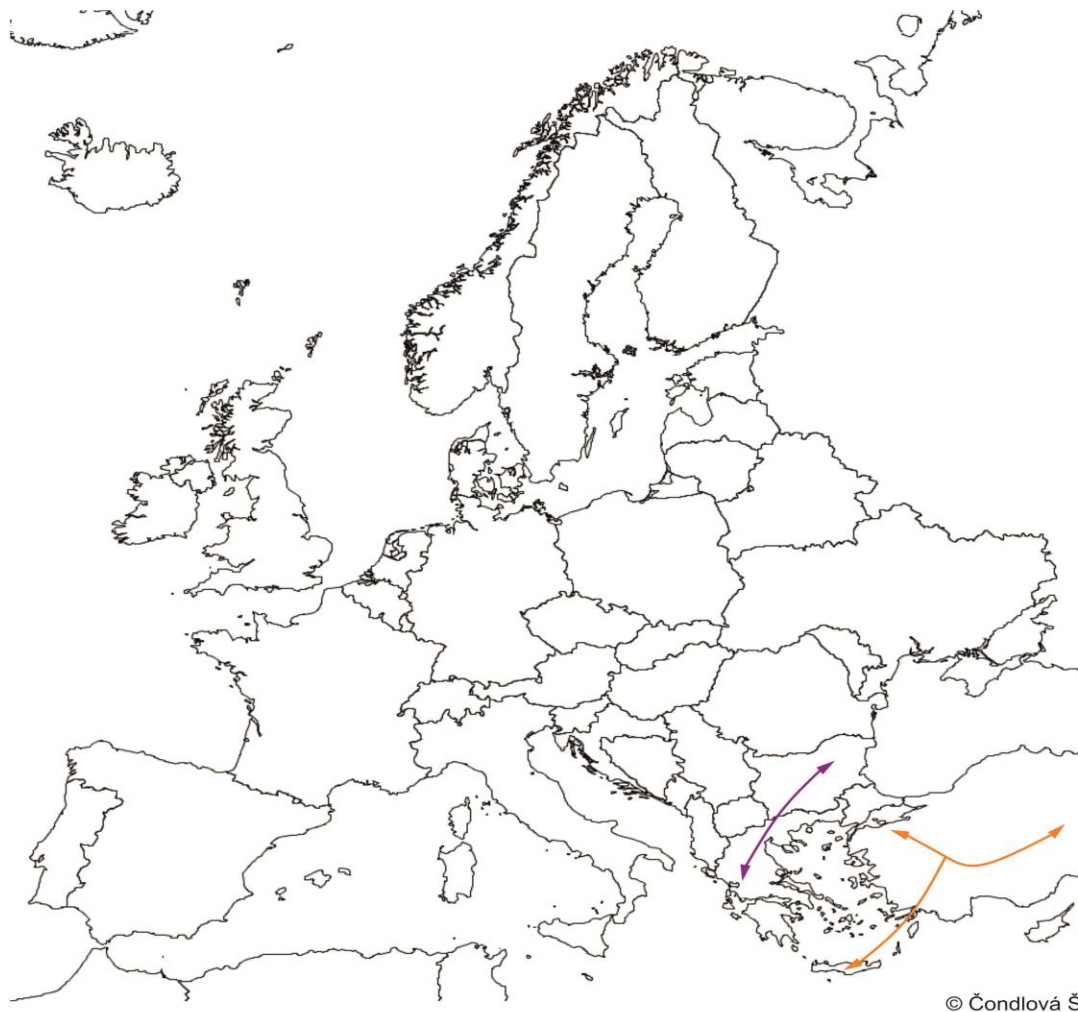


Obrázek 6: Fylogeografie druhu *Apodemus uralensis*. Žlutě je označena západní linie rozšiřující se do Evropy směrem od Sibíře přes severní část Uralského pohoří a dále směrem k severnímu Kavkazu, do Turecka a států ve střední Evropě a zeleně východní linie rozšiřující se do Asie směrem od Turkmenistánu přes Uzbekistán až do Číny.

3.3.2.5. Fylogeografie druhu *Apodemus mystacinus*

Na rozšíření tohoto druhu se podílely dvě základní větve – balkánská a větev středního a blízkého východu, které se od sebe oddělily během středního Pliocénu před 5,10–4,20 miliony let (Michaux et al. 2005b). Ačkoliv Marmerské moře bylo během kvartérních klimatických změn často pouze souší, nebylo prokázáno

vzájemné narušení teritorií způsobené migracemi těchto dvou větví (Vohralík et al. 2002). Větev středního a blízkého východu se přibližně před 1,00–0,90 miliony let rozdělila na linii Kréty a jihozápadního Turecka a linii středního východu (Sýrie, Gruzie, severozápad a východ Turecka) (Michaux et al. 2005b). Ke kolonizaci Kréty z turecké linie pravděpodobně došlo přes ostrovy Rhodos a Karpathos během jedné kvartérní doby ledové, kdy se hladina moře snížila. Když se hladina znovu zvýšila, jedinci zůstali izolováni na ostrově po určitou dobu, což vedlo ke vzniku odlišné linie (Michaux et al. 2005b). Později během dalšího poklesu hladiny moře nebo pomocí antropogenního zavlečení se tato linie opět dostala do jihozápadního Turecka z Kréty, Rhodosu a Karpathosu, což vysvětluje přítomnost dvou geneticky diferencovaných linií mtDNA v kontinentálním Turecku (Michaux et al. 2005b). Obrázek 7 znázorňuje jednotlivé větve a linie.



Obrázek 7: Fylogeografie druhu *Apodemus mystacinus*. Fialově je označena balkánská větev a oranžově větev středního a blízkého východu rozpadající se na linii Kréty a jihozápadního Turecka a linii středního východu.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Materiál

Odchyty zvířat probíhaly v letech 2013–2018, vždy v období duben–září (s ohledem na klimatické podmínky). Výběr lokalit vycházel ze souhrnu poznatků o bionomii hlodavců rodu *Apodemus* a dále z vlastních zkušeností. Odchyty byly prováděny pomocí dřevěných sklapovacích pastí způsobujících okamžitou smrt jedince přetnutím vazů, které se osvědčily jako nejúčinnější. Pasti byly rozmístěny nelineárně v různých vzdálenostech s ohledem na okolní terén. Kontrola pastí byla prováděna nejdéle po 12 hodinách, aby se předešlo ztrátám způsobeným predátory. U každého jedince byl pomocí pitvy odebrán obsah z koncové části tlustého střeva čistými pitevními nástroji, vložen do sterilní mikrozkušavky, konzervován dichromanem draselným a uchováván v chladu (4 °C).

4.2. Metodika

4.2.1. Mikroskopická diagnostika oocyst kryptosporidií

4.2.1.1. Barvení dle Miláčka a Vítovce (1985)

Odebrané vzorky trusu byly mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost oocyst kryptosporidií pomocí barvení anilin-karbol-methyl-violetí dle Miláčka a Vítovce (1985).

Zásobní roztoky

- Roztok anilin-karbol-methyl-violeti
 - 0,6 g methyl violeti
 - 1 ml anilinu
 - 1 g fenolu
 - 30 ml 96% alkoholu
 - 70 ml deionizované vody
- Roztok tartrazinu – 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové
- 2% kyselina sírová

Pracovní postup

- Sklo s nátěrem fixovat methanolem v plameni.
- Obarvit roztokem anilin-karbol-methyl-violeti, doba barvení 30 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Diferencovat v 2% kyselině sírové po dobu 2 minut.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Nechat uschnout při laboratorní teplotě. Prohlížet mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

4.2.1.2. Barvení dle Ziehl-Nielsenova v modifikaci podle Henriksena a Pohlenze (1981)

Zásobní roztoky

- Roztok karbolfuchsinu
2,5 ml rozpuštěných fenolových krystalů
5 ml 100% ethanolu
0,5 g práškového basického fuchsinu
50 ml deionizované vody
Před použitím přefiltrovat!
- 1% kyselý alkohol
1 ml koncentrované kyseliny solné (HCl)
100 ml 70% ethanolu
- 0,8% fast green (zeleň)
0,8 g prášku light green (světlá zeleň)
100 ml deionizované vody

Pracovní postup

- Sklo s nátěrem fixovat v 95–100% methanolu po dobu 10 minut.
- Obarvit roztokem karbolfuchsinu, doba barvení 2–3 hodiny.

- Odbarvit v 1% kyselém alkoholu tak, že při odbarvování již neodtéká roztok červené barvy.
- Omýt pod tekoucí vodou, doba 1 minuta.
- Dobarvit světlou zelení po dobu 1 minuty.
- Omýt pod tekoucí vodou.
- Nechat uschnout při laboratorní teplotě. Mikroskopovat při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

4.2.1.3. Koncentrace oocyst pomocí cukerného roztoku o hustotě 1,33 kg/m³

Zásobní roztok

- Roztok cukru o hustotě 1,33 kg/m³
164 g cukru
100 ml deionizované vody
Rozpouštět na elektromagnetické míchačce bez zahřívání!

Pracovní postup

- Navážit 0,04–0,05 g trusu.
- Rozmíchat špejlí v safe lock mikrozkuhavce (2 ml) s 0,9 ml deionizované vody.
- Promíchat na vortexu.
- Přidat 0,9 ml roztoku cukru o hustotě 1,33 kg/m³.
- Promíchat na vortexu.
- Centrifugovat 5–6 minut při 1000 g.
- Odpipetovat vrchní vrstvičku z roztoku a dát znovu do čisté mikrozkuhavky.
- Přidat 1–2 ml vody a centrifugovat 1–2 minuty při 10 000 g.
- Odpipetovat supernatant, oocysty rozmíchat v cca 80 µl destilované vody (využít pro zhotovení nativního preparátu nebo detekci pomocí specifických protilátek).

4.2.1.4. Detekce pomocí specifických protilátek

Součásti kitu: Crypto Cel Reagent, Positive Control Slide, Mounting Fluid.

Pracovní postup

- Na podložní sklo nanést 20 μl vzorku koncentrovaného na cukru o hustotě 1,33 kg/m^3 (viz. kapitola 4.2.1.3.).
- Vzorek nechat oschnout při laboratorní teplotě.
- Fixovat po dobu 5 minut v metanolu a nechat oschnout při laboratorní teplotě.
- Přidat 25 μl Crypto Cel Reagent k fixaci vzorku a Positive Control Slide dát do vlhké komůrky a inkubovat při 37 °C po dobu 30 minut.
- Vzorek opatrně opláchnut v destilované vodě.
- Nechat oschnout.
- Těsně před mikroskopováním přidat kapku Mounting Fluid na vzorek, přikrýt krycím sklem a odstranit bubliny.
- Mikroskopovat mikroskopem s UV lampou a filtrem 520 nm při zvětšení 1000 \times za použití imerzního oleje (vzorek je možné uchovávat při 2–8 °C ve tmě po dobu 24 hodin).

4.2.1.5. Zhotovení nativního preparátu

Nejprve byla provedena koncentrace oocyst viz. kapitola 4.2.1.3.

Pracovní postup

- Na podložní sklo nanést 5 μl vzorku koncentrovaného pomocí cukerného roztoku.
- Zakrýt krycím sklem a odstranit bubliny.
- Okraje krycího skla zalakovat lakem na nehty (zabránění rychlému vysychání a „plavání“ preparátu).
- Mikroskopovat při zvětšení 1000 \times za použití imerzního oleje.

4.2.2. Molekulární diagnostika oocyst kryptosporidií

4.2.2.1. Izolace DNA

4.2.2.1.1. Izolace DNA ze vzorku trusu

Genomová DNA byla izolována ze všech získaných vzorků pomocí komerčního ExgeneTM stool DNA mini kitu – GeneAll®; Korea.

Součásti kitu: FL pufr, EB pufr, PB pufr, NW pufr a sady kolon EzPass column (bílá kolona) a Mini spin column (zelená kolona).

Pracovní postup

- 200 mg trusu dát do safe loock zkumavky, přidat skleněné a zirkonové kuličky.
- Připipetovat 1000 µl FL pufru, homogenizovat vortexováním a rozbít pomocí FastPrep® 24 (M. P. Biomedicals, CA, USA) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
- Inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Centrifugovat 5 minut při 14 000 g.
- Přepipetovat veškerý supernatant na EzPass column (bílá kolona).
- Centrifugovat 1 minutu při 14 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Na kolonu napipetovat 100 µl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
- Vyhodit bílou kolonu a připipetovat 500 µl PB pufru do sběrné zkumavky, promíchat pipetováním.
- Všechn obsah sběrné zkumavky přenést na Mini spin column (zelená kolona).
- Centrifugovat 1 minutu při 14 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Napipetovat 500 µl NW pufru na střed kolony.
- Centrifugovat 1 minutu při 14 000 g. Přenést kolonu na čistou eppendorfku.
- Napipetovat 200 µl EB pufru na kolonu, inkubovat 1 minutu a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.

4.2.2.1.2. Izolace DNA z tkání

Extrakce DNA z tkání byla provedena pomocí komerčního kitu QIAamp® DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), který je určen pro izolaci DNA ze vzorků živočišných tkání a buněk.

Součásti kitu: ATL Buffer, proteinase K, 96% EtOH, AL Buffer, AW1 Buffer, AW2 Buffer, AE Buffer.

Pracovní postup

- Do mikrozkušavky dát vzorek 100 mg tkáně, přidat skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm a 2–3 zirkoniové kuličky o velikosti 2 mm.
- Připipetovat 180 µl ATL Bufferu (Tissue Lysis Buffer; QIAGEN) a rozbít pomocí FastPrep® 24 (M. P. Biomedicals, CA, USA) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
- Centrifugovat vzorek 10 s při 14 000 g.
- Připipetovat 20 µl proteinase K a inkubovat v termobloku po dobu 60 minut při teplotě 56 °C a pravidelném promíchávání.
- Po 60 minutách připipetovat 200 µl AL Bufferu a vortexovat.
- Přidat 200 µl 96% EtOH a vortexovat.
- Centrifugovat 45 s při 13 400 g.
- Vzniklý supernatant přenést do mini spin column, centrifugovat 1 minutu při 8000 g a vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Přidat AW1 buffer o objemu 500 µl, opět centrifugovat 1 minutu při 8000 g a vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetovat 500 µl AW2 Buffer, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g a vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Kolonu přendat na čistou mikrozkušavku, přidat 200 µl AE buffru přímo na střed kolony a inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě.
- Centrifugovat 1 minutu při 8000 g. Získanou DNA uchovávat při -20 °C.

4.2.2.2. Genotypizace

Kryptosporidie byly genotypovány na genech kódujících malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA; Jiang et al. 2005), actin (Sulaiman et al. 2000), 60 kDa glykoprotein (GP60; Alves 2003; Li et al. 2014) a *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP; Pedraza et al. 2001; Spano et al. 1997). Pro tyto analýzy byla použita vyizolovaná DNA. Samotné reakce byly uskutečněny v PCR mikrozkmavkách (Amp ONE HS-Taq premix GeneAll) o objemu reakce 20 μ l a byla provedena nested PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *C. ubiquitum* popř. *C. muris* a *C. parvum* a jako negativní kontrola PCR H₂O. Primární reakce byla provedena ve 20 μ l dle složení komerčně prodáváného kitu Amp ONE HS-Taq premix GeneAll za použití 2 μ l genomové DNA pro amplifikaci SSU, COWP, GP60 a 3 μ l genomové DNA pro actin. Sekundární reakce byla shodná s předpisem primární reakce a jako templát byly použity 2 μ l primární reakce u SSU, COWP a GP60 genů a 2,5 μ l pro actin gen. Primární a sekundární PCR reakce probíhaly ve 35 cyklech (denaturace DNA při 95 °C po dobu 45 sekund, annealing při specifické teplotě primeru pro každou reakci po dobu 45 sekund, prodlužování řetězce (extension) při 72 °C po dobu 1 minuty. Prvnímu cyklu předcházela počáteční denaturace při teplotě 95 °C po dobu 5 minut a poslední cyklus byl následován finální extenzí při 72 °C po dobu 10 minut. Pro amplifikaci každého genu byly použity specifické primery.

4.2.2.3. Gelová elektroforéza

PCR produkt ze sekundární reakce byl analyzován na 1% agarózovém gelu. K detekci byl použit EtBr, vizualizace byla provedena pomocí UV záření transiluminátorem (Ultra-Lum Inc, USA) a dokumentace pomocí (Gel Logic 112, program Carestream 1-877-747-HELP, USA).

Chemikálie

- 50 \times TAE puf (242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA o pH 8,00)
- Agarosa (Serva Electrophoresis, Německo)
- Ethidium bromid (10 mg/ml. Sigma Aldrich, USA)

- DNA Ladder – 100 bp (Fermentas International Inc., Kanada)

Pracovní postup

- TAE pufr smíchat s agarózou (1,2 g agarózy + 120 ml TAE pufru).
- Pufr s agarózou rozpustit v mikrovlnné troubě a poté ochladit pod tekoucí vodou.
- Do roztoku připipetovat EtBr a roztok opatrně promíchat.
- Gel nalít do předem připravené formy s hřebeny a nechat ztuhnout.
- Po ztuhnutí hřebeny vyndat a gel vložit do elektroforetické vany s TAE pufrém.
- Do první jamky napipetovat Ladder a do dalších jamek produkty sekundární PCR.
- Elektroforézu nechat probíhat při napětí 90 V po dobu potřebnou k separaci jednotlivých fragmentů DNA.
- Výsledek elektroforézy vizualizovat pomocí UV transiluminátoru.

4.2.2.4. Izolace z gelu

Produkty z gelové elektroforézy vhodné k osekvenování byly vyizolovány pomocí SIGMA-ALDRICH GenElute™ Gel Extraction kitu podle doporučení od výrobce.

Součásti kitu: Gel sublyzation solution, Column preparation solution, isopropanol, Wash solution G pufr a sada kolonek Binding column G.

Pracovní postup

- Vyřízni fragment DNA z gelu čistým skalpelem a dej do připravené mikrozkušavky.
- Do mikrozkušavky s fragmentem gelu připipetuj 500 µl gel sublyzation solution.
- Inkubuj 10 minut při 50 °C, kontroluj rozpouštění a promíchej každé 2–3 minuty během rozpouštění.
- Dej inkubovat vodu na eluci na 65 °C.
- Sestav Binding Column G, napipetuj 500 µl Column Preparation Solution a centrifuguj 1 minutu při 13 000 g.

- Připipetuj ke vzorku 150 μ l isopropanolu a promíchej.
- Přepipetuj veškerý objem na kolonu a centrifuguj 1 minutu při 13 000 g (kolona pojme 700 μ l, vzorky s větším objemem nanášej postupně a postupně centrifuguj).
- Vylej odpad ze sběrné zkumavky a opět ji použij s kolonou.
- Připipetuj 700 ml Wash solution G pufru a centrifuguj 1 minutu při 13 000 g.
- Vylej odpad ze sběrné zkumavky a opět ji použij s kolonou.
- Centrifuguj 1 minutu při 13 000 g bez přidání jakýchkoli roztoků.
- Otoč zkumavku o 180° a centrifuguj znovu 3 minuty při 13 000 g.
- Kolonu dej do nové 1,5 ml mikrozkušavky a proved' eluci napipetováním 30 μ l PCR vody přehřáté na 65 °C přímo na střed kolony. Inkubuj 1 minutu a poté centrifuguj 1 minutu při 13 000 g.

4.2.2.5. Sekvenování

Sekvenování PCR produktů bylo provedeno pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů. Nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí programu Chromas Pro v 1.32 (www.technilysium.com.au/chromas.html) a BioEdit porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank.

4.2.3. Fylogenetická analýza

Ke zjištění fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií byly využity metody Neighbor-Joining na Maximum Likelihood v programu MEGA 6. Bootstrapová analýza byla použita pro vyhodnocení statistické podpory získaných topologií (1000 opakování).

4.2.4. Experimentální infekce

4.2.4.1. Experimentální zvířata

Pro zjištění průběhu infekce vyvolané vybranými druhy kryptosporidií bylo využito dospělých jedinců různých pohlaví *Apodemus flavicollis*, BALB/c myši

z komerčních chovů a *Microtus arvalis*. Před začátkem pokusu byli jedinci opakovaně vyšetřeni na přítomnost kryptosporidií. Jako kontrolní zvířata byly vybrány BALB/c myši. Všechna pokusná zvířata byla chována v individuálních chovných nádobách za standardních podmínek, krmena sterilní komerční směsí (TOP - VELAZ Praha) a napájena vodou *ad libitum* ve zvěřinci BC AVČR, v.v.i. v Českých Budějovicích.

4.2.4.2. Příprava infekční dávky k experimentální infekci

Molekulárně pozitivní vzorky shodného druhu/genotypu byly zhomogenizovány ve třecí misce a zbaveny příměsí přes sítko, mikrosítka a rozděleny do 4 zkumavek o stejném množství. Následovalo přečištění pomocí sacharózového gradientu a dočištění na cesium chloridovém gradientu.

4.2.4.2.1. Sacharózový gradient, Arrowood a Sterling (1987)

Zásobní roztoky

- Sheaterův cukerný roztok

259 ml deionizované vody

405 g cukru

7,29 g fenolu

- 1% PBS Tween - 1% Tween 20 v PBS: 1 l deionizované vody, 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 2,4 g KH₂PO₄
- Pracovní Sheaterovy roztoky
 - roztok 1: 1 + 2 (1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly 1% PBS Tween)
 - roztok 2: 1 + 4 (1 díl Sheaterova roztoku + 4 díly 1% PBS Tween)

Pracovní postup

- Trus zhomogenizovat ve třecí misce a vzniklou suspenzi přecedit přes čajové sítko. Do silnostěnných centrifugačních skleněných zkumavek (objem 100 ml)

navrstvit gradient (1. vrstva 30 ml Sheaterův roztok 1; 2. vrstva 30 ml Sheaterův roztok 2).

- 15 ml suspenze oocyst v PBS navrstvit na sacharózový gradient.
- Centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C.
- Odsát horní vrstvu na rozhraní vody a Sheaterova roztoku 1+4 a zbylý supernatant přenést do čisté zkumavky a doplnit PBS.
- Centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C a opět centrifugovat.
- 1/2 objemu odsát, opět doplnit PBS a centrifugovat 20 minut při 1370 g a 4 °C.
- Pelet s oocystami uchovávat při 4-8 °C v PBS.

4.2.4.2.2. Cesium chloridový gradient

Chemikálie

Roztok cesium chloridu

21,07 g CsCl (> 99% čistota)

100 ml deionizované vody

PBS - pH 7,2

Pracovní postup

- Oocysty po přečištění na sacharózovém gradientu (viz. kapitola 4.2.4.2.1.) centrifugovat 10 minut při 1450 g a 4 °C.
- Odebrat supernatant a sediment obsahující oocysty resuspendovat v PBS.
- Do čisté mikrozkušavky napipetovat 1 ml CsCl a navrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
- Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C.
- Oocysty kryptosporidií se nacházejí na rozhraní CsCl a PBS.
- Odebrat prstenec s oocystami a naředit v nadbytku PBS.

- Centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C.
- Znovu dvakrát centrifugovat 3 minuty při 16 000 g a 20 °C.
- Odsát supernatant.
- Pelet s oocystami uchovávat při 4 °C v destilované vodě.

4.2.4.2.3. Zjištění koncentrace oocyst

Koncentrace oocyst byla zjištěna pomocí Bürkerovy komůrky. Čistá suspence oocyst byla napipetována do Bürkerovy komůrky. Pomocí mikroskopu bylo při zvětšení 400× spočítáno celkové množství oocyst ve 25 středních čtvercích dle návodu přiloženém k Bürkerově komůrce. Zjištěný počet oocyst byl vynásoben koeficientem 104 a tím byla vypočtena koncentrace oocyst v 1 ml roztoku.

4.2.4.3. Infekce experimentálních zvířat

Experimentální zvířata byla infikována jícnovou sondou vybranými izoláty v dávce 5×10^4 oocyst/zvíře v 0,2ml destilované vody a denně odebírána ve stejný čas po dobu 30 dní po infekci. Denní vzorky byly vyšetřeny mikroskopicky pomocí barvicí metody dle Miláčka a Vítovce (1985), z každého vzorku byla vyizolována DNA a provedena amplifikace části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA; Jiang et al. 2005). V průběhu experimentu byla vybraná zvířata (v den nejvyššího vylučování oocyst) humaně usmrcena za účelem odběru vzorků různých částí trávicího traktu (žláznatý žaludek, duodenum, jejunum, ileum, caecum a colon). Aby bylo zabráněno kontaminaci vzorků, byla na každý orgán zvlášť použita jedna sada pitevních nástrojů, předem vysterilněna autoklávováním při 125 °C a následně UV světlem o vlnové délce 254 nm (Uvilink CL 508, UVITEC, UK).

4.2.5. Histopatologické vyšetření

Vzorky byly připraveny pomocí pitvy z výše uvedených částí trávicího traktu a byly fixovány ve 4 % formaldehydu.

Barvení hematoxylin-eosinem

Před samotným barvením byly vzorky odvodněny ve vzestupné alkoholové řadě, po odvodnění byl alkohol nahrazen xylenem. Dále byly vzorky přeneseny do tekutého parafinu, ze kterého byly zhotovené bločky mikrotomem nakrájeny na 4–6 µm tenké histologické řezy. Tyto řezy byly přeneseny na podložní sklíčka, před barvením odparafinováno v xylenu a sestupnou alkoholovou řadou převedeny do vody. Připravené řezy byly barveny pomocí hematoxylin-eosinu.

Barvivo hematoxylin barví jaderný chromatin a ribosomy, eosin barví cytoplasmu a kolagenní vlákna. Jádra a bazofilní struktury jsou po obarvení modré a ostatní části preparátu odstínovaně červené.

Chemikálie

- Eosin
 - 0,5 g eosinu
 - 250 ml deionizované H₂O
 - 10 ml kyseliny octové
- Hematoxylin
 - 0,5 g hematoxylinu
 - 500 ml deionizované H₂O
 - 25 g síranu hlinito-amonného
 - 0,1 g jodičnanu sodného
 - 20 ml kyseliny octové.

Pracovní postup

- Odparafinované řezy na podložních sklech ponořit do hematoxylinu po dobu 10 minut.
- Opláchnout pod tekoucí vodou (10 minut) a následně dobarvit v eosinu (5 minut).
- Opláchnout vodou a odvodnit pomocí vzestupné alkoholové řady: 70% ethanol; 80% ethanol; 96% ethanol; karboxylen-xylene-xylene-xylene.
- Zakápnout kanadským balzámem a překrýt krycím sklíčkem.

- Vzorky prohlížet světelným mikroskopem při zvětšení 1000× s využitím imerzního oleje.

4.2.6. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Vzorky výše uvedených částí trávicího traktu byly fixovány v glutaraldehydu.

Chemikálie

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

Pracovní postup

- Vzorky fixovat přes noc při 4 °C v glutaraldehydu v kakodylátovém pufru.
- Vzorky promýt v kakodylátovém pufru třikrát po sobě po dobu 15 minut.
- Fixovat vzorky v oxidu osmičelém v kakodylátovém pufru po dobu dvou hodin při laboratorní teplotě.
- Vzorky promýt třikrát po dobu 15 minut v kakodylátovém pufru.
- Po dehydrataci vzestupnou acetonovou řadou vzorky vysušit metodou kritického bodu (CPD) v tlakové komoře pomocí kapalného CO₂.
- Vysušené vzorky nalepit pomocí oboustranné lepicí pásky na hliníkový terčík.
- Hliníkové terčíky s preparáty pozlatit a prohlížet pomocí elektronového mikroskopu JOEL JSM-7401F-FE SEM.

5. VÝSLEDKY

5.1. Výskyt a prevalence kryptosporidiových infekcí u hlodavců rodu *Apodemus*

Mezi roky 2013–2018 bylo v rámci této práce na výskyt kryptosporidiových infekcí vyšetřeno celkem 946 vzorků trusu z odchycených volně žijících hlodavců rodu *Apodemus*. Z tohoto počtu bylo 759 myší rodu *Apodemus* (*A. agrarius*, *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*) různých věkových kategorií odchyceno na území České republiky (46 lokalit) a Slovenska (21 lokalit). Dále bylo získáno 187 vzorků myšic (*A. agrarius*, *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*) různých věkových kategorií z dalších evropských států (Belgie, Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Finsko, Francie, Litva, Lotyšsko, Maďarsko, Německo, Nizozemí, Polsko, Rakousko, Rumunsko a Srbsko) pro porovnání výskytu kryptosporidiových infekcí v rámci Evropy. Počty konkrétních druhů myšic odchycených v jednotlivých státech jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Počty konkrétních druhů myší rodu *Apodemus* odchycených v jednotlivých státech.

Stát	Počet lokalit	Odchycené druhy myšic			Bez určení druhu*
		<i>A. agrarius</i>	<i>A. flavicollis</i>	<i>A. sylvaticus</i>	
Belgie	1	–	–	–	2
Bosna a Hercegovina	1	–	1	–	–
Bulharsko	4	5	2	2	1
Česká republika	46	–	301	36	33
Finsko	2	–	2	–	–
Francie	9	–	15	4	1
Litva	1	3	–	–	–
Lotyšsko	2	11	–	–	–
Maďarsko	2	2	–	–	2
Německo	7	–	–	–	10
Nizozemí	3	–	–	–	6
Polsko	7	2	83	–	–
Rakousko	4	–	2	3	3
Rumunsko	2	2	1	1	–
Slovensko	21	132	253	4	–
Srbsko	4	4	14	3	–
Celkem	116	161	674	53	58

* Juvenilní jedinci, u kterých se nepodařilo určit příslušný druh.

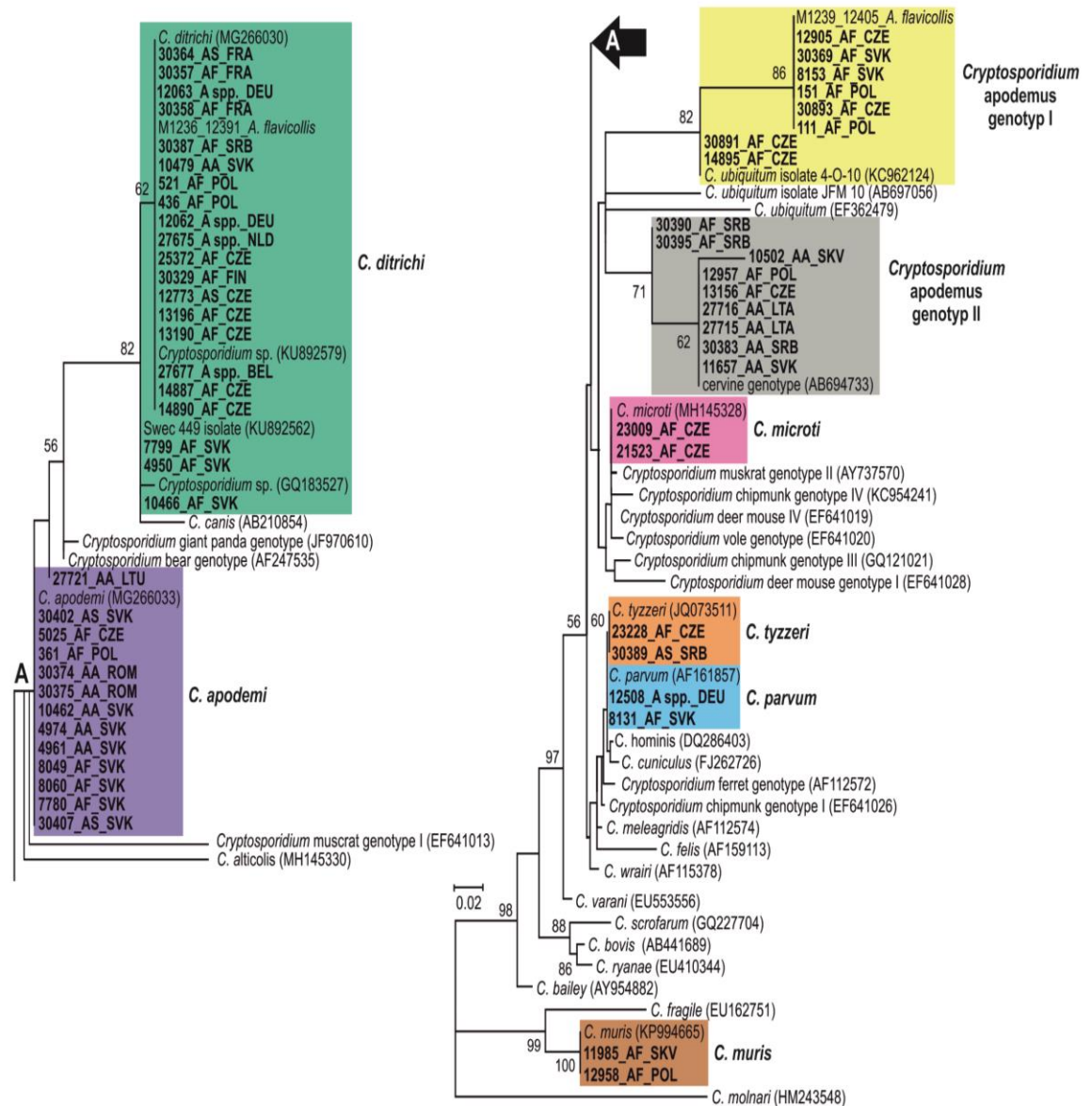
Z celkového počtu 946 odchycených jedinců bylo 130 (13,7 %) vzorků pozitivních na kryptosporidie. V České republice byla celková prevalence 16,2 % (v rámci konkrétních druhů myšic to bylo u *A. flavicollis* 16,6 %, *A. sylvaticus* 2,8 % a *Apodemus* spp. 27,3 %).

Na Slovensku byla zjištěna celková prevalence o něco nižší 11,3 %, odlišné byly i prevalence v rámci jednotlivých druhů myšic, a to u *A. agrarius* 15,2 %, *A. flavicollis* 8,7 % a *A. sylvaticus* 50 %. V dalších státech Evropy jsou jednotlivá data o prevalenci zkrácena malými a nevyrovnanými počty odchycených jedinců, a proto nejsou uváděna.

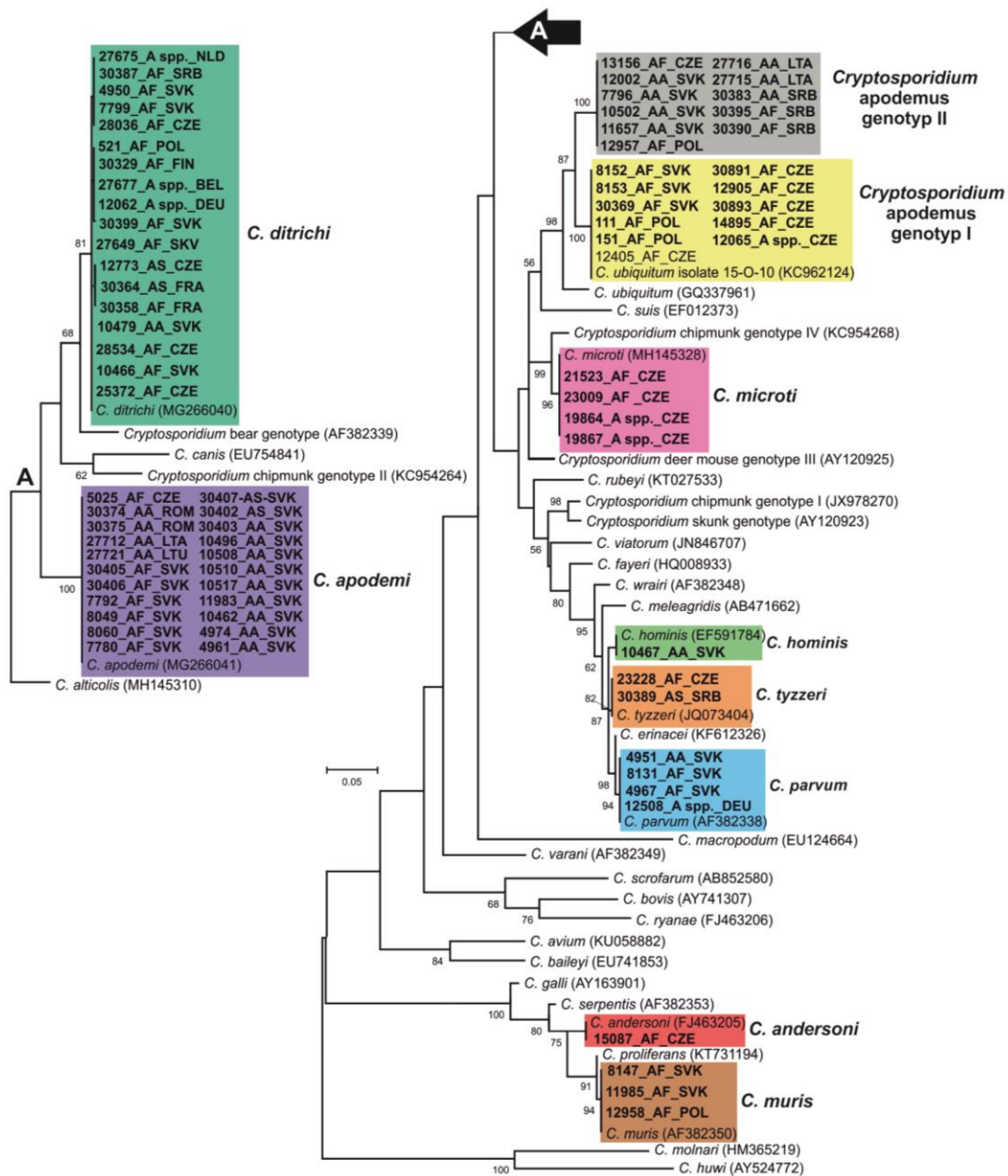
Prevalence kryptosporidií v závislosti na konkrétním druhu myšic bez ohledu na místo/stát odchyty byla u *A. agrarius* 16,8 %, *A. flavicollis* 13,4 %, *A. sylvaticus* 9,4 % a u ostatních jedinců bez určení druhu – *Apodemus* spp. 19,0 %.

5.2. Genetická diverzita kryptosporidií

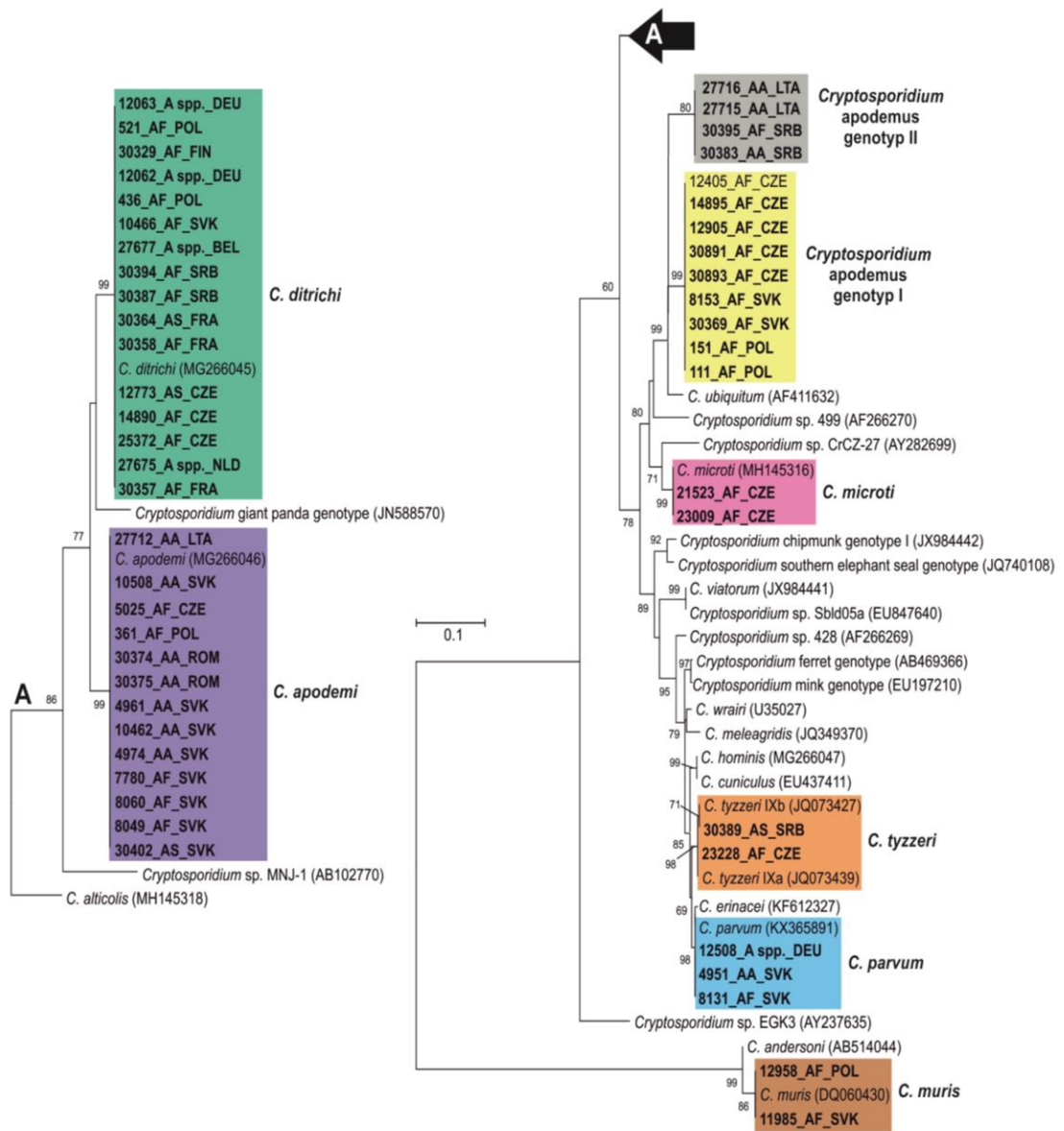
Provedením multilokusových analýz (SSU, actin, COWP a GP60) byla prokázána přítomnost *Cryptosporidium* spp., konkrétně byla detekována přítomnost *C. andersoni*, *C. apodemi*, *C. ditrichi*, *C. hominis*, *C. microti*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. tyzzeri* a *Cryptosporidium* apodemus genotypu I a II. Výsledky jednotlivých fylogenetických analýz jsou uvedeny v obrázcích 8–11 (SSU – obrázek 8, actin – obrázek 9, COWP – obrázek 10 a GP60 – obrázek 11).



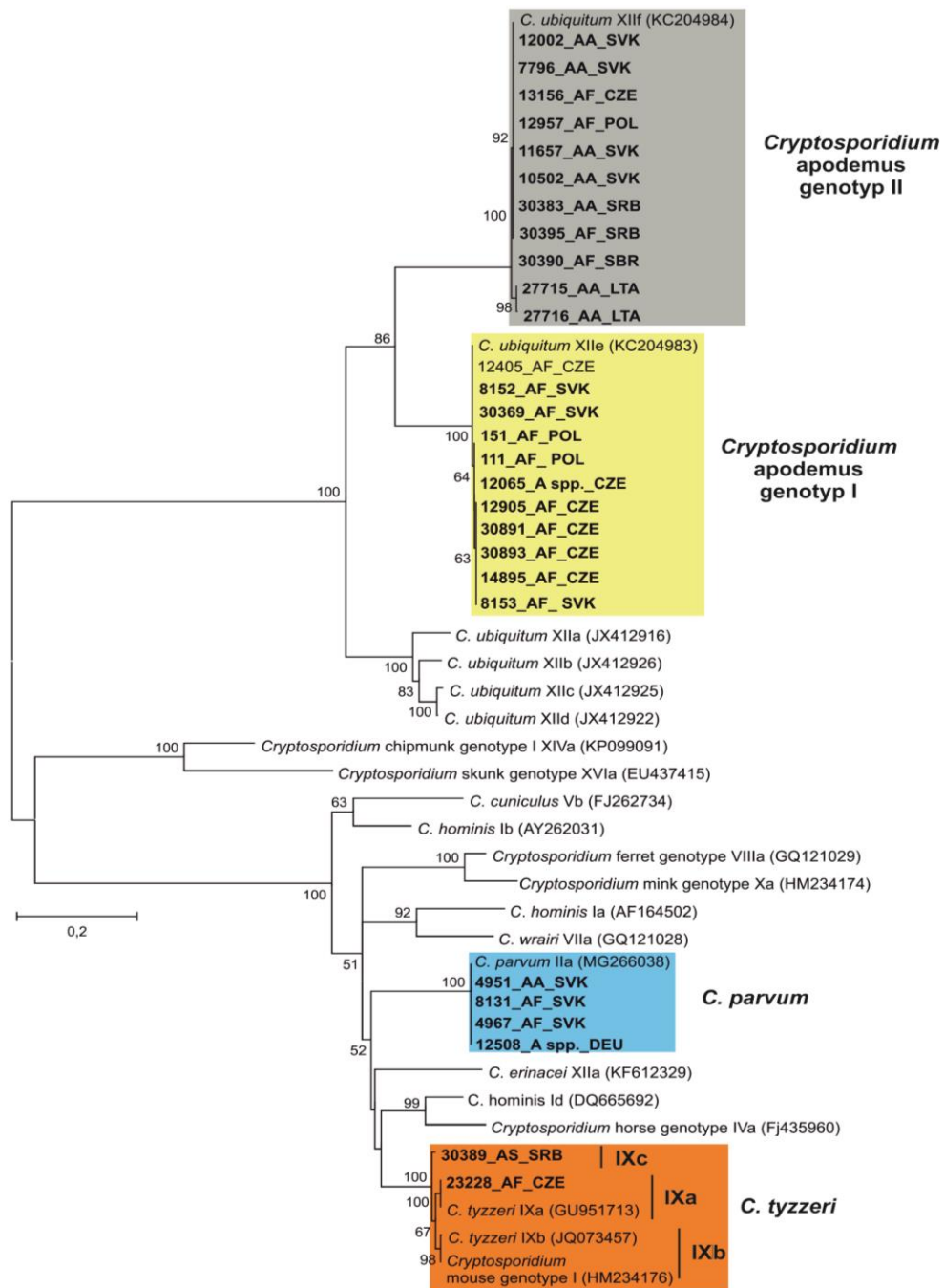
Obrázek 8: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií detekovaných v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě sekvencí genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU) vytvořený metodou Maximum likelihood a modelem Tamura 3 Γ +I. Číselné hodnoty v uzlech představují procentuální hodnoty bootstrapů s podporou více než 50 %, bootstrap 1000×. Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny, za číselným označením je uvedena zkratka konkrétního druhu myšice (pro *A. flavicollis* **AF**, *A. agrarius* **AA**, pro *A. sylvaticus* **AS** a pro juvenilní jedince bez určení druhu **A spp.**), za ní je uvedena zkratka státu, kde byl příslušný izolát získán (Belgie (**BEL**), Česká republika (**CZE**), Francie (**FRA**), Finsko (**FIN**), Litva (**LTU**), Lotyšsko (**LTA**), Německo (**DEU**), Nizozemí (**NLD**), Polsko (**POL**), Rumunsko (**ROM**), Slovensko (**SVK**) a Srbsko (**SRB**)).



Obrázek 9: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií detekovaných v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě sekvencí genu pro actin vytvořený metodou Maximum likelihood a modelem General Time Reversible $\Gamma+I$. Číselné hodnoty v uzlech představují procentuální hodnoty bootstrapů s podporou více než 50 %, bootstrap 1000×. Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny, za číselným označením je uvedena zkratka konkrétního druhu myšice (pro *A. flavicollis* AF, *A. agrarius* AA, pro *A. sylvaticus* AS a pro juvenilní jedince bez určení druhu A spp.), za ní je uvedena zkratka státu, kde byl příslušný izolát získán (Belgie (BEL), Česká republika (CZE), Francie (FRA), Finsko (FIN), Litva (LTU), Lotyšsko (LTA), Německo (DEU), Nizozemí (NLD), Polsko (POL), Rumunsko (ROM), Slovensko (SVK) a Srbsko (SRB)).



Obrázek 10: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií detekovaných v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě sekvencí genu pro *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) vytvořený metodou Maximum likelihood a modelem Tamura 3 Γ . Číselné hodnoty v uzlech představují procentuální hodnoty bootstrapů s podporou více než 50 %, bootstrap 1000 \times . Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny, za číselným označením je uvedena zkratka konkrétního druhu myšice (pro *A. flavicollis* **AF**, *A. agrarius* **AA**, pro *A. sylvaticus* **AS** a pro juvenilní jedince bez určení druhu **A spp.**), za ní je uvedena zkratka státu, kde byl příslušný izolát získán (Belgie (**BEL**), Česká republika (**CZE**), Francie (**FRA**), Finsko (**FIN**), Lotyšsko (**LTA**), Německo (**DEU**), Nizozemí (**NLD**), Polsko (**POL**), Rumunsko (**ROM**), Slovensko (**SVK**) a Srbsko (**SRB**)).



Obrázek 11: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií detekovaných v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě sekvencí genu GP 60 vytvořený metodou Maximum likelihood a modelem Tamura 3 Γ +I. Číselné hodnoty v uzlech představují procentuální hodnoty bootstrapů s podporou více než 50 %, bootstrap 1000 \times . Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny, za číselným označením je uvedena zkratka konkrétního druhu myšice (pro *A. flavicollis* **AF**, *A. agrarius* **AA**, pro *A. sylvaticus* **AS** a pro juvenilní jedince bez určení druhu **A spp.**), za ní je uvedena zkratka státu, kde byl příslušný izolát získán (Česká republika (**CZE**), Lotyšsko (**LTA**), Německo (**DEU**), Polsko (**POL**), Slovensko (**SVK**) a Srbsko (**SRB**)).

Nejčteněji detekovaným druhem kryptosporidií v rámci této práce bylo *C. ditrichi* (53,0 %), které se přirozeně vyskytovalo u několika druhů v rámci rodu *Apodemus* (*A. agrarius*, *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*) na různých lokalitách v 9 z 16 států (Belgie, Česká republika, Finsko, Francie, Německo, Nizozemí, Polsko, Slovensko a Srbsko). Dále bylo detekováno v menším počtu *C. apodemi* (17,7 %) u tří druhů myšic (*A. agrarius*, *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*) na území České republiky, Litvy, Lotyšska, Polska, Rumunska a Slovenska.

Mimo již výše zmíněné druhy bylo detekováno několik dalších druhů kryptosporidií – *C. andersoni* (0,8 %), *C. hominis* (0,8 %), *C. microti* (3,0 %), *C. muris* (2,3 %), *C. parvum* (4,6 %) a *C. tyzzeri* (1,5 %). Konkrétně *C. hominis* bylo detekováno pouze u jedné *A. agrarius* odchycené na východním Slovensku v lokalitě Rozhanovce (genotyp IbA10G2). *Cryptosporidium muris*, žaludeční druh kryptosporidie, bylo detekováno pouze u tří jedinců *A. flavicollis* – u dvou jedinců na Slovensku a jednoho v Polsku. Dále bylo detekováno *C. parvum* (alelická rodina IIa – subtyp A16G1R1b) na Slovensku – lokalita Hýľov u *A. flavicollis* a *A. agrarius* a v Německu u *A. flavicollis*. *Cryptosporidium tyzzeri* bylo detekováno u dvou druhů, a to konkrétně u *A. flavicollis* v České republice (alelická rodina IXa) a u *A. sylvaticus* v Srbsku (alelická rodina IXc).

U jedné *A. flavicollis* v České republice bylo detekováno i *C. andersoni*. Posledním detekovaným druhem kryptosporidií bylo *C. microti*. Tento druh byl detekován u *A. flavicollis* a *Apodemus* spp. (mladí jedinci bez určení druhu) na třech odlišných lokalitách v České republice.

Kromě již jmenovaných druhů výše byla na základě molekulárních analýz získaných v rámci této studie prokázána i přítomnost dvou genotypů blíže příbuzných k *C. ubiquitum*, v této práci pojmenovaných jako *Cryptosporidium apodemus* genotyp I (7,7 %) a II (8,5 %). *Cryptosporidium apodemus* genotyp I byl detekován u *A. flavicollis* v České republice, Polsku a Slovensku, zatímco *Cryptosporidium apodemus* genotyp II byl detekován u *A. flavicollis* v České republice, u *A. agrarius* v Lotyšsku, u *A. flavicollis* v Polsku, u *A. agrarius* na Slovensku a u *A. flavicollis* a *A. agrarius* v Srbsku. Konkrétní druhy/genotypy kryptosporidií detekované v rámci této práce u konkrétních druhů myšic v rámci jednotlivých států jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5: Jednotlivé druhy/genotypy detekované v rámci této práce u konkrétních druhů myší rodu *Apodemus* v jednotlivých státech Evropy.

Stát	Druh	Počet vyšetřených (n)	Počet pozitivních (n)	Detekovaný druh/genotyp <i>Cryptosporidium</i> spp.	
				SSU/ actin/ COWP	GP60
Belgie	<i>Apodemus</i> spp.*	2	1	<i>C. ditrichi</i>	-
	<i>A. agrarius</i>	5	0	-	-
Bulharsko	<i>A. flavicollis</i>	2	0	-	-
	<i>A. sylvaticus</i>	2	0	-	-
	<i>Apodemus</i> spp.*	1	0	-	-
Bosna a Hercegovina	<i>A. flavicollis</i>	1	0	-	-
Česká republika	<i>A. flavicollis</i>	301	1	<i>C. andersoni</i>	-
			1	<i>C. apodemi</i>	-
			38	<i>C. ditrichi</i>	-
			2	<i>C. microti</i>	-
			1	<i>C. tyzzeri</i>	IXa
	4	apodemus genotyp I	-		
	1	apodemus genotyp II	-		
	<i>A. sylvaticus</i>	36	1	<i>C. ditrichi</i>	-
<i>Apodemus</i> spp.*	33	6	<i>C. ditrichi</i>	-	
		2	<i>C. microti</i>	-	
		1	apodemus genotyp I	-	
Finsko	<i>A. flavicollis</i>	2	1	<i>C. ditrichi</i>	-
Francie	<i>A. flavicollis</i>	15	3	<i>C. ditrichi</i>	-
	<i>A. sylvaticus</i>	4	1	<i>C. ditrichi</i>	-
	<i>Apodemus</i> spp.*	1	0	-	-
Litva	<i>A. agrarius</i>	3	1	<i>C. apodemi</i>	-
Lotyšsko	<i>A. agrarius</i>	11	1	<i>C. apodemi</i>	-
			2	apodemus genotyp II	-
Maďarsko	<i>A. agrarius</i>	2	0	-	-
	<i>Apodemus</i> spp.*	2	0	-	-
Německo	<i>Apodemus</i> spp.*	10	2	<i>C. ditrichi</i>	-
Nizozemí	<i>Apodemus</i> spp.*	6	1	<i>C. parvum</i>	IIaA16G1R1b
			1	<i>C. ditrichi</i>	-
Polsko	<i>A. flavicollis</i>	83	2	-	-
			1	<i>C. apodemi</i>	-
			5	<i>C. ditrichi</i>	-
			1	<i>C. muris</i>	-
			2	apodemus genotyp I	-
			1	apodemus genotyp II	-
Rakousko	<i>A. flavicollis</i>	2	0	-	-
	<i>A. sylvaticus</i>	3	0	-	-
	<i>Apodemus</i> spp.*	3	0	-	-
Rumunsko	<i>A. agrarius</i>	2	2	<i>C. apodemi</i>	-
	<i>A. flavicollis</i>	1	0	-	-
	<i>A. sylvaticus</i>	1	0	-	-
Slovensko	<i>A. agrarius</i>	132	9	<i>C. apodemi</i>	-
			1	<i>C. ditrichi</i>	-
			1	<i>C. hominis</i>	IbA10G2
			1	<i>C. parvum</i>	IIaA16G1R1b
	4	apodemus genotyp II	-		
	<i>A. flavicollis</i>	253	6	<i>C. apodemi</i>	-
			7	<i>C. ditrichi</i>	-
			2	<i>C. muris</i>	-
4			<i>C. parvum</i>	IIaA16G1R1b	
3	apodemus genotyp I	-			
<i>A. sylvaticus</i>	4	2	<i>C. apodemi</i>	-	
<i>A. agrarius</i>	4	1	apodemus genotyp II	-	
Srbsko	<i>A. flavicollis</i>	14	2	<i>C. ditrichi</i>	-
	<i>A. sylvaticus</i>	3	2	apodemus genotyp II	-
			1	<i>C. tyzzeri</i>	IXc

* Juvenilní jedinci, u kterých se nepodařilo určit příslušný druh.

5.3. Biologické vlastnosti kryptosporidií parazitujících u hlodavců rodu *Apodemus* a popis nových druhů

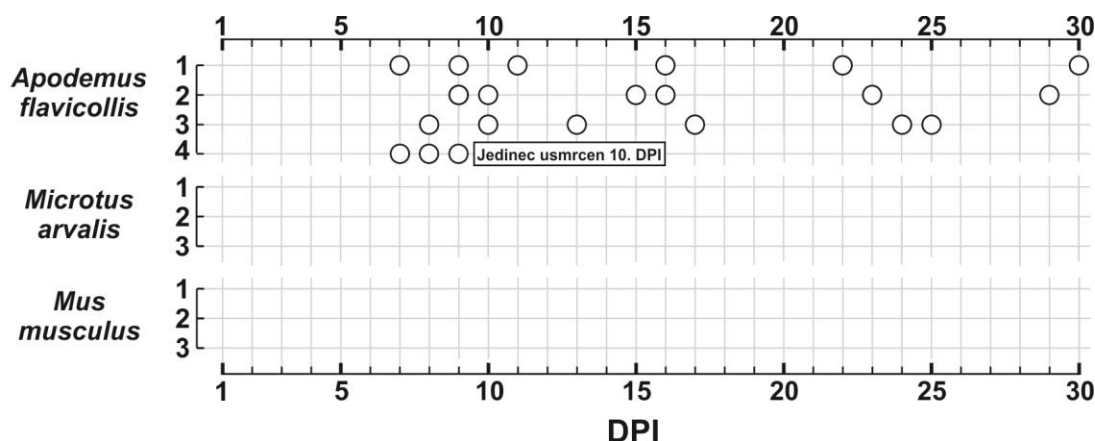
Znalosti o biologických vlastnostech, mezi které patří hostitelská specifita, průběh infekce (prepatentní a patentní perioda, patogenita a intenzita infekce), lokalizace v hostiteli nebo morfometrie oocyst, jsou velmi významné nejen z pohledu odlišení jednotlivých druhů, ale také v rámci porozumění interakcí parazit – hostitel.

5.3.1 Experimentální infekce

5.3.1.1. Experimentální infekce způsobené druhem *Cryptosporidium apodemi*

K experimentální infekci byli použiti jedinci druhu *A. flavicollis* (juvenilní a adultní jedinci), *Microtus arvalis* a BALB/c myš. Všechna pokusná zvířata byla před pokusem molekulárně vyšetřena na přítomnost specifické DNA *Cryptosporidium* spp., žádné z nich nebylo pozitivní.

Prepatentní perioda u *A. flavicollis* byla 7–9 DPI a patentní perioda trvala déle než 30 DPI. intermitentní vylučování bylo detekováno v denních vzorcích až do 30 DPI (obrázek 12). Molekulární analýzy prokázaly přítomnost specifické DNA *C. apodemi* ve střevě myšic (jejunum, ileum, caecum a colon), zatímco pomocí histologických metod a elektronové mikroskopie nebyla endogenní vývojová stádia detekována v žádném vyšetřovaném orgánu. Analýza histologických řezů neprokázala žádné patologické změny. U pokusných zvířat nebyly pozorovány žádné klinické příznaky. Jedince druhu *Microtus arvalis* ani BALB/c myš se nepodařilo nainfikovat.

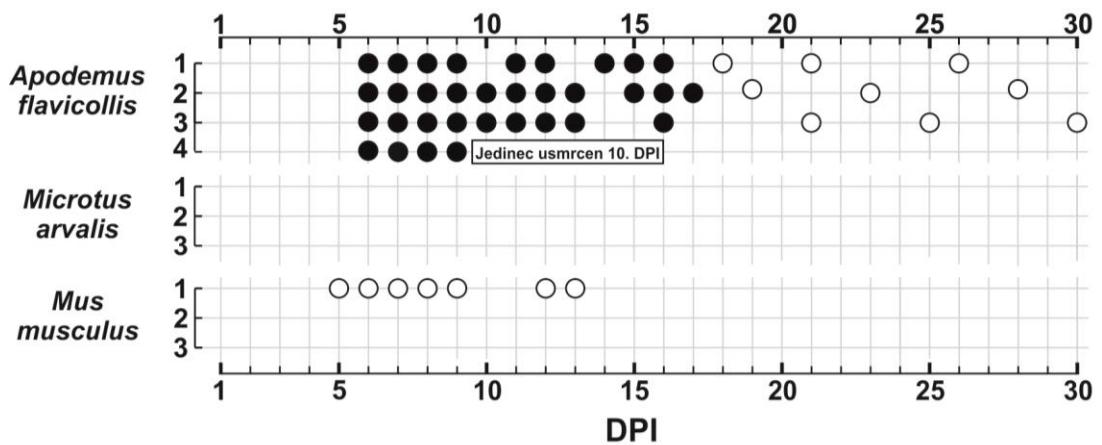


Obrázek 12: Průběh infekce *Cryptosporidium apodemi* založený na mikroskopické a molekulární detekci oocyst u *A. flavicollis*, *Mus Musculus* (BALB/c myš) a *Microtus arvalis*. Kruhy označují detekci specifické DNA *C. apodemi* (bílý kruh označuje molekulární detekci oocyst) (Čondlová et al. 2018).

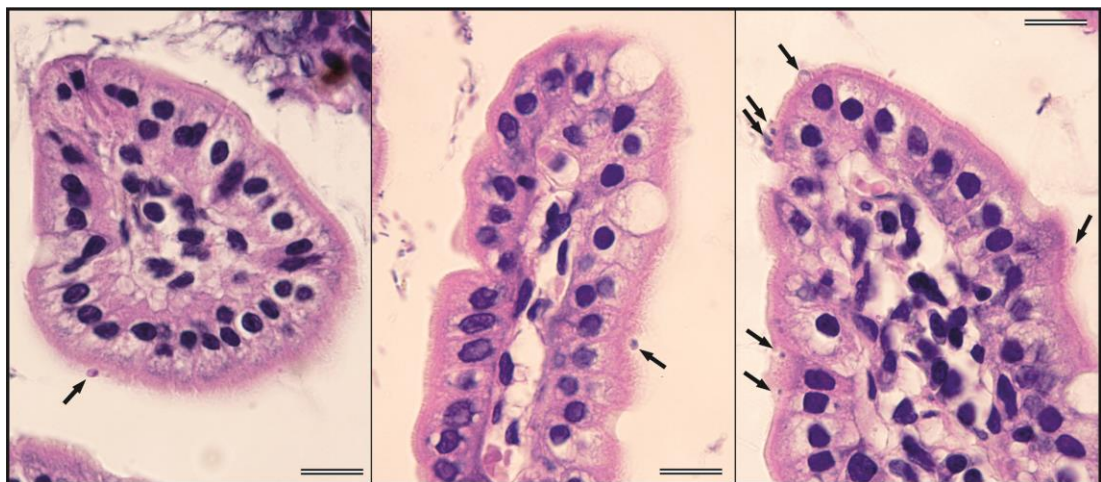
5.3.1.2. Experimentální infekce způsobené druhem *Cryptosporidium ditrichi*

K experimentální infekci byli použiti jedinci druhu *A. flavicollis* (juvenilní a adultní jedinci), *Microtus arvalis* a BALB/c myši. Všechna pokusná zvířata byla před pokusem molekulárně vyšetřena na přítomnost specifické DNA *Cryptosporidium* spp., žádné z nich nebylo pozitivní.

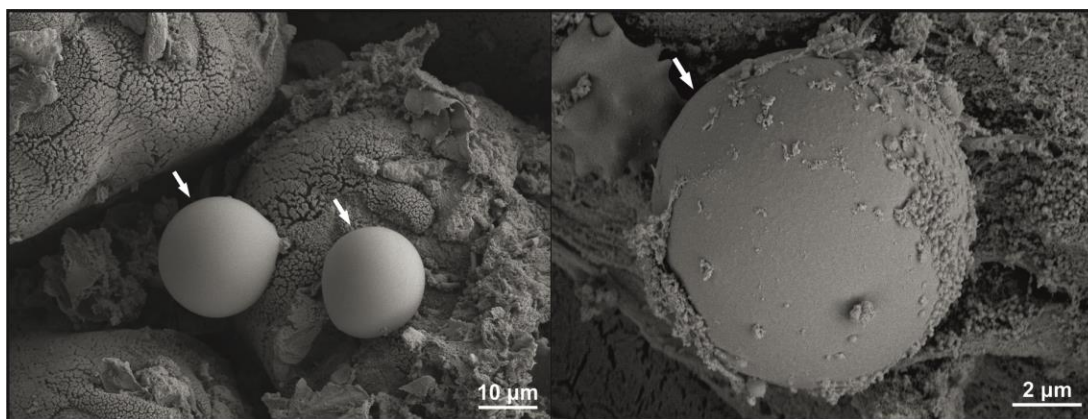
Jedna BALB/c myš byla molekulárně pozitivní 5–13 DPI. Prepatentní perioda u *A. flavicollis* byla 6 DPI, intermitentní vylučování bylo detekováno v denních vzorcích až do 30 DPI (obrázek 13). Patentní perioda trvala déle než 30 DPI. Intenzita infekce u *A. flavicollis* byla 4000–50000 oocyst/g trusu. Zvířata byla odebírána denně po dobu 30 dní. U pokusných zvířat nebyly pozorovány žádné klinické příznaky. Pomocí histologického vyšetření a elektronové mikroskopie byla endogenní vývojová stádia detekována v jejunu a ileu (obrázek 14 a 15). Analýza histologických řezů neprokázala žádné patologické změny. Jedince druhu *Microtus arvalis* se nepodařilo nainfikovat.



Obrázek 13: Průběh infekce *Cryptosporidium ditrichi* založený na mikroskopické a molekulární detekci oocyst u *A. flavicollis*, *Mus Musculus* (BALB/c myš) a *Microtus arvalis*. Kruhy označují detekci specifické DNA *C. ditrichi* (černý kruh označuje mikroskopickou a molekulární detekci oocyst a bílý kruh označuje jen molekulární detekci oocyst) (Čondlová et al. 2018).



Obrázek 14: Histologický řez epitelem ilea *A. flavicollis* s vývojovými stádii *Cryptosporidium ditrichi* (označena šipkou); jedinec usmrcen 10. DPI; měřítko 25 μ m (Čondlová et al. 2018).

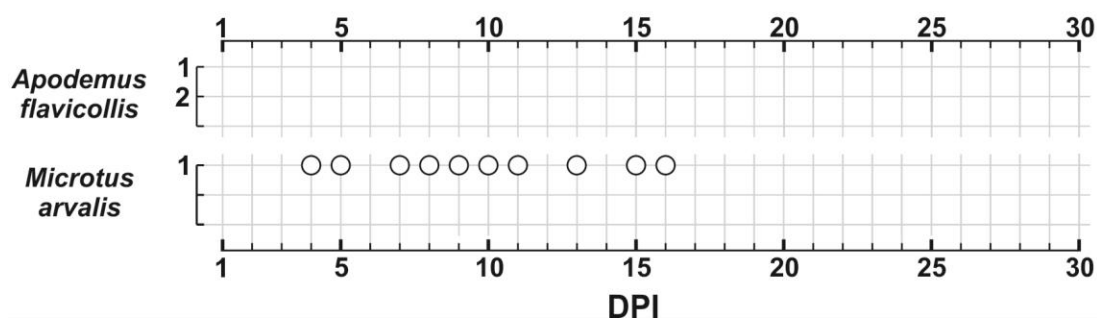


Obrázek 15: Skenovací elektronová mikrofotografie epitelu jejunu *A. flavicollis* s vývojovými stádii *Cryptosporidium ditrichi*; jedinec usmrčen 10. DPI; měřítko uvedeno v obrázku (Čondlová et al. 2018).

5.3.1.3. Experimentální infekce způsobené druhem *Cryptosporidium microti*

K experimentální infekci byli použiti dva adultní jedinci druhu *A. flavicollis* a jeden jedinec druhu *Microtus arvalis* (druh k infekci vnímavý dle Horčičkové et al. (2018)). Všechna pokusná zvířata byla před pokusem molekulárně vyšetřena na přítomnost specifické DNA *Cryptosporidium* spp., žádné z nich nebylo pozitivní.

Microtus arvalis byl molekulárně pozitivní na *C. microti* 4–16 DPI, zvířata byla odebírána denně po dobu 30 dní (obrázek 16). U pozitivního jedince druhu *Microtus arvalis* nebyla prováděna detekce vývojových stádií v trávicím traktu (molekulární detekce, histologie ani elektronová mikroskopie). Mikroskopickým vyšetřením trusu jedinců *A. flavicollis* nebyly detekovány žádné oocysty, ani molekulární a histologické metody neprokázaly přítomnost specifické DNA, respektive vývojových stádií *C. microti* v inokulovaných *A. flavicollis*. Zvířata byla odebírána denně po dobu 30 dní. Žádné z infikovaných zvířat nevykazovalo klinické příznaky infekce.

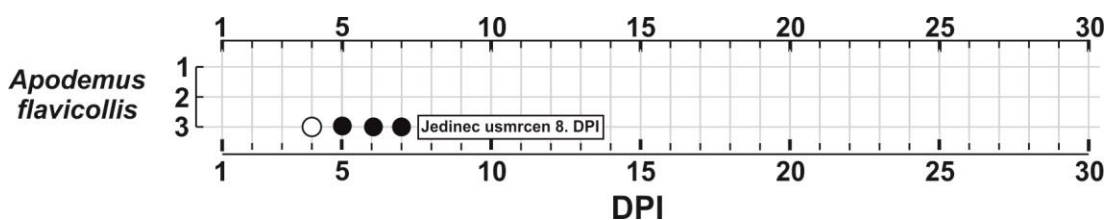


Obrázek 16: Průběh infekce *Cryptosporidium microti* založený na mikroskopické a molekulární detekci oocyst u *A. flavicollis* a *Microtus arvalis*. Kruhy označují detekci specifické DNA *C. microti* (bílý kruh označuje molekulární detekci oocyst).

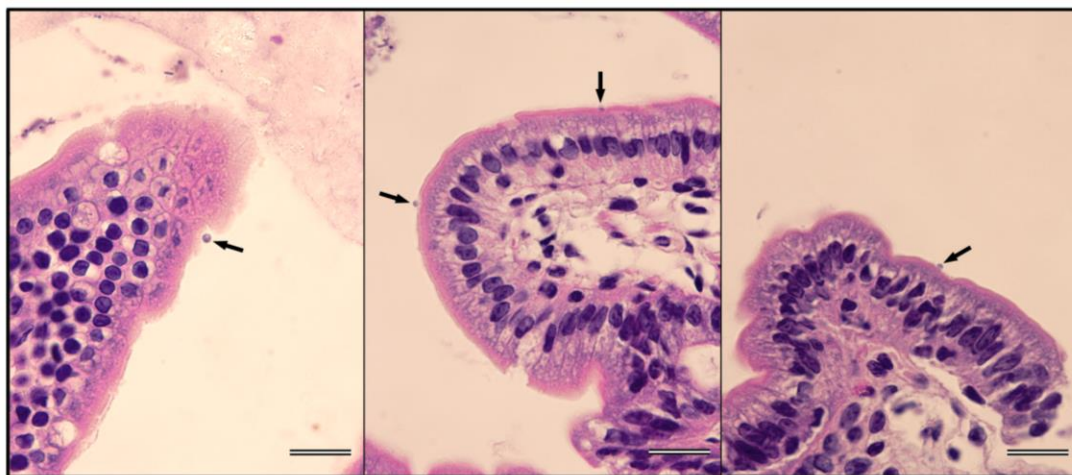
5.3.1.4. Experimentální infekce způsobené druhem *Cryptosporidium parvum*

K experimentální infekci byli použiti tři adultní jedinci druhu *A. flavicollis*. Všechna pokusná zvířata byla před pokusem molekulárně vyšetřena na přítomnost specifické DNA kryptosporidií, žádné z nich nebylo pozitivní.

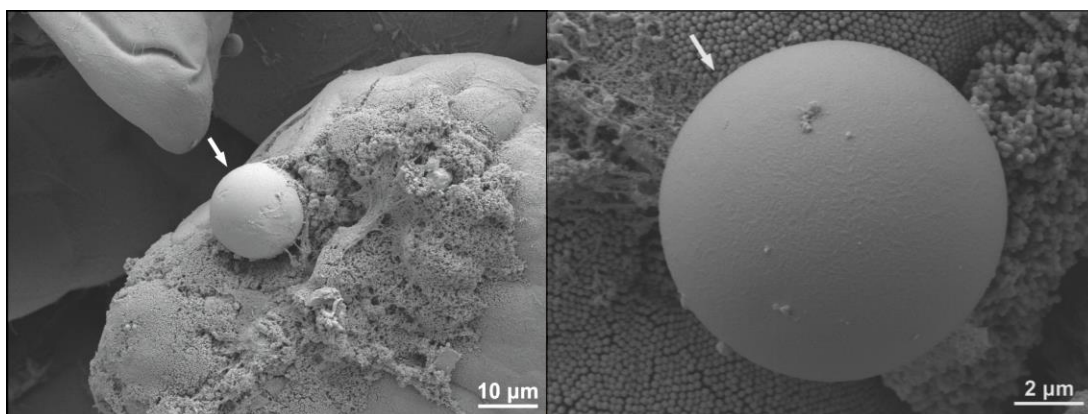
Prepatentní perioda byla 4 dny a u zvířat nebyly pozorovány žádné klinické příznaky. Zvířata byla odebírána denně po dobu 30 dní (obrázek 17). Mikroskopická detekce a molekulární analýzy prokázaly přítomnost specifické DNA *C. parvum* pouze u jednoho jedince usmrceného 8. DPI v částech tenkého střeva (jejunum a ileum), při vyšetření pomocí histopatologie a elektronové mikroskopie byla prokázána přítomnost endogenních vývojových stádií ve stejných částech tenkého střeva (obrázek 18 a 19). Analýza histologických řezů neprokázala žádné patologické změny. Intenzita infekce byla 2000–5000 oocyst/g trusu.



Obrázek 17: Průběh infekce *Cryptosporidium parvum* založený na mikroskopické a molekulární detekci oocyst u *A. flavicollis*. Kruhy označují detekci specifické DNA *C. parvum* (černý kruh označuje mikroskopickou a molekulární detekci oocyst a bílý kruh označuje jen molekulární detekci oocyst).



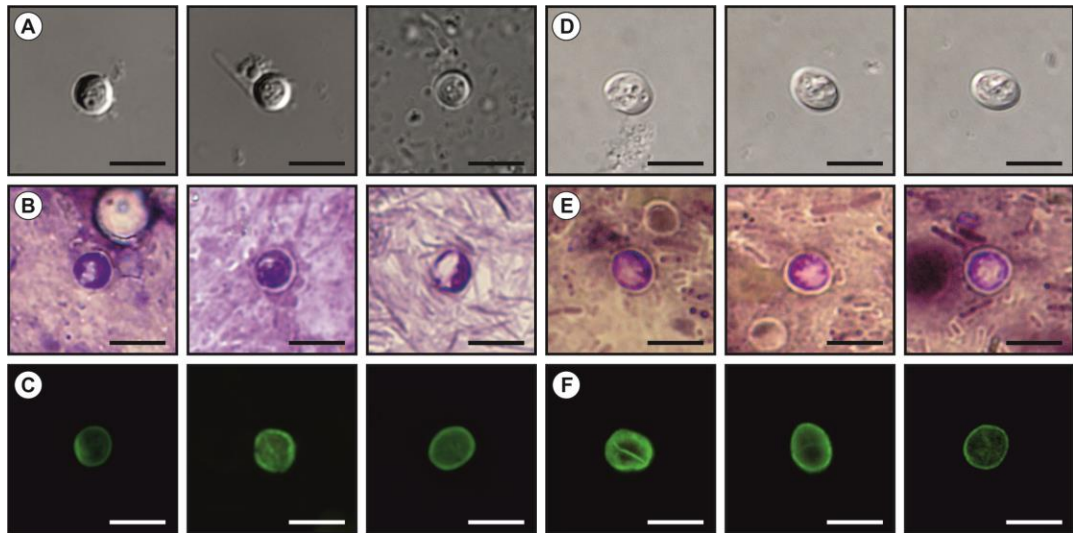
Obrázek 18: Histologický řez epitelem ilea *A. flavicollis* s vývojovými stádii *Cryptosporidium parvum* (označena šipkou); jedinec usmrcen 8 DPI; měřítko 25 μm .



Obrázek 19: Skenovací elektronová mikrofotografie epitelu ilea *A. flavicollis* s vývojovými stádii *Cryptosporidium parvum*; jedinec usmrcen 8 DPI; měřítko uvedeno v obrázku.

5.3.2. Morfometrie oocyst

Oocysty *C. apodemi* (obrázek 20A; 20B; 20C), které jsou z hostitele vylučovány plně vysporulované o velikosti 3,9–4,7 μm ($x \pm \text{SD} = 4,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$) \times 3,8–4,4 μm ($x \pm \text{SD} = 4,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$), poměr mezi délkou a šířkou 1,00– 1,06 ($x \pm \text{SD} = 1,03 \pm 0,03$), jsou menší než oocysty *C. ditrichi* (obrázek 20D; 20E; 20F), které měří 4,5–5,2 μm ($x \pm \text{SD} = 4,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$) \times 4,0–4,6 μm ($x \pm \text{SD} = 4,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$), poměr mezi délkou a šířkou 1,00–1,20 ($x \pm \text{SD} = 1,12 \pm 0,02$), a jsou také vylučovány plně vysporulované.



Obrázek 20: Oocysty *C. apodemi* a *C. ditrichi* zobrazené různými technikami: **A)** oocysty *C. apodemi* v diferenciálním interferenčním kontrastu; **B)** oocysty *C. apodemi* barvené metodou dle Miláčka a Vítovce (1985); **C)** oocysty *C. apodemi* značené anti-*Cryptosporidium* FITC konjugovanou protilátkou; **D)** oocysty *C. ditrichi* v diferenciálním interferenčním kontrastu; **E)** oocysty *C. ditrichi* barvené metodou dle Miláčka a Vítovce (1985); **F)** oocysty *C. ditrichi* značené anti-*Cryptosporidium* FITC konjugovanou protilátkou. Měřítka: 5 µm (Čondlová et al. 2018).

5.4. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. a *Cryptosporidium ditrichi* sp. n.

Cryptosporidium apodemi a *C. ditrichi* jsou geneticky odlišné od dosud popsaných platných druhů rodu *Cryptosporidium*.

Cryptosporidium apodemi sdílí na lokusu kódujícím SSU gen 97,0%, 95,1% a 93,0% sekvenční identity s izolátem *C. canis*, *Cryptosporidium* muskrat genotypem I, respektive *C. felis*. Na lokusu kódujícím aktin je tato shoda 89,3% a 83,8% s izolátem *C. canis* a *C. felis* a na lokusu kódujícím COWP je to 93,9% a 87,2% s *Cryptosporidium* giant panda genotypem a *C. ubiquitum*. SSU sekvence jedné z několika různých variant *C. ditrichi* je na 100 % totožná s izolátem UK E6 (No. GQ183527) získaným ze vzorku vody. Pro všechny varianty *C. ditrichi* byla sekvenční identita 98,9 – 100%. Na lokusu kódujícím aktin je sekvenční shoda 95,9% a 91,9% s *Cryptosporidium* bear genotypem a *C. canis* a na lokusu kódujícím COWP je to 93,9% a 85,4% s *Cryptosporidium* giant panda genotypem a *C. ubiquitum*. Tato data přispěla k popsání nových druhů *C. apodemi* a *C. ditrichi* v rámci rodu *Cryptosporidium*.

6. DISKUZE

6.1. Výskyt a prevalence

Do současné doby bylo publikováno 19 prací provedených v České republice, Japonsku, Koreji, Polsku, Slovensku, Španělsku a Velké Británii, které se zabývají prevalencí a diverzitou kryptosporidií u hlodavců patřících do rodu *Apodemus*. Procento zvířat pozitivních na kryptosporidie se v jednotlivých studiích liší s ohledem na použitý způsob detekce, konkrétní druh myšic a druh/genotyp kryptosporidie. Molekulární metody pro detekci kryptosporidií u volně žijících zvířat jsou senzitivnější než mikroskopická detekce, rozdíly ve výsledcích získaných molekulárními a mikroskopickými metodami ovlivněné druhem/genotypem byly zaznamenány u hlodavců rodu *Apodemus* přirozeně infikovaných druhem *C. ditrichi*, kdy bylo 65 % zvířat mikroskopicky pozitivních, ale žádné zvíře infikované *C. apodemi* nevyklučovalo množství oocyst detekovatelné pomocí mikroskopických technik. Obdobné rozdíly byly popsány při infekcích, například: *C. scrofarum* a *C. suis* u selat (více jsou vylučovány oocysty *C. scrofarum* (Jeníková et al. 2011; Kváč et al. 2012, 2013a) nebo *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* a *C. ryanae* u skotu, kdy jsou více vylučovány oocysty *C. parvum*, jedná-li se o tele, nebo *C. andersoni*, jedná-li se o mladý a dospělý skot (Kváč et Vítovec 2003; Santín et al. 2004; Fayer et al. 2005; Kváč et al. 2006).

Obecně lze konstatovat, že se promoření populace *A. agrarius* pohybuje v rozmezí 33–61 %, *A. flavicollis* 8–68 % a *A. sylvaticus* 4–26 % (Bajer 2008; Bajer et al. 2001; Bajer et al. 2003; Bednarska et al. 2007; Čondlová 2013; Danišová et al. 2017; Hajdušek et al. 2004; Chalmers et al. 1997; Kuliš-Małkowska 2007; Li et al. 2014; Perc-Matysiak et al. 2015; Sinski et al. 1998; Torres et al. 2000). Obdobná prevalence byla zjištěna také u druhů vyskytujících se v Asii (*A. agrarius* 33 %, *A. speciosus* 8–26 % a *A. chejuensis* okolo 32 %) (Hikosaka et Nakai 2005; Murakoshi et al. 2013; Song et al. 2015). Oproti tomu data o celkové prevalenci jednotlivých druhů zjištěná v rámci této práce jsou nižší – u *A. agrarius* 16,8 %, *A. flavicollis* 13,4 % a *A. sylvaticus* 9,4 %.

Konkrétní prevalence získané v rámci jednotlivých států se liší v závislosti na počtu odchycených jedinců. V České republice byla celková prevalence 16,2 % (u *A. flavicollis* 16,6 %, *A. sylvaticus* 2,8 % a *Apodemus* spp. 27,3 %). Tato data jsou srovnatelná s výsledky Čondlové (2013), která zmiňuje celkovou prevalenci okolo

12 % (v rámci druhu *A. flavicollis* 13,2 % a *A. sylvaticus* 4,0 %). Na Slovensku byla v rámci této práce zjištěna celková prevalence 11,3 % a prevalence v rámci jednotlivých druhů *A. agrarius* 15,2 %, *A. flavicollis* 8,7 % a *A. sylvaticus* 50 %. Naopak vyšší celkovou prevalenci na Slovensku 27 % a vyšší prevalenci tedy i v rámci jednotlivých druhů *A. agrarius* 31,8 % a *A. flavicollis* 20,5 % uvádí Danišová et al. (2017).

Prevalence v rámci dalších států Evropy byla v dostupných studiích stanovena převážně na základě mikroskopické detekce (Bajer 2008; Bajer et al. 2001; Bednarska et al. 2007; Chalmers et al. 1997; Siński et al. 1998; Torres et al. 2000). V Anglii byla prevalence u vyšetřených jedinců 26 % (pouze jedinci druhu *A. sylvaticus*; Chalmers et al. 1997), ve Španělsku 10 % (*A. sylvaticus* 9,8 %, *A. flavicollis* 50 %; Toress et al. 2000), v Polsku se pohybovala v rozmezí 24–64,5 % (Bajer 2008; Bajer et al. 2001; Bednarska et al. 2007; Perec-Matysiak et al. 2015; Siński et al. 1998). Prevalence získané v dalších státech Evropy v této práci nejsou vzhledem k malým a nevyrovnaným počtům odchycených jedinců uvedeny a nejsou z tohoto důvodu pokládány za vhodné ke srovnání s výše uvedenými daty získanými v rámci jiných studií.

6.2. Genetická diverzita kryptosporidií

U hlodavců rodu *Apodemus* byla v rámci této studie detekována přítomnost různých druhů/genotypů kryptosporidií – *C. andersoni*, *C. apodemi*, *C. ditrichi*, *C. hominis*, *C. microti*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. tyzzeri* a *Cryptosporidium apodemus* genotypu I a II.

Nejčastěji detekovaným druhem kryptosporidií bylo *C. ditrichi* (detekováno u 53,0 % pozitivních jedinců, u tří druhů myšic (*A. agrarius*, *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*), na území 9 z 16 států Evropy (v Belgii, České republice, Finsku, Francii, Německu, Nizozemí, Polsku, Slovensku a Srbsku)), i když tato data vypovídají o rozšíření *C. ditrichi* v několika evropských státech, výskyt tohoto druhu u hlodavců rodu *Apodemus* byl doposud popsán jen v rámci této práce a studie Čondlové (2013). Studie zabývající se kryptosporidiovými infekcemi u hlodavců rodu *Apodemus* na území Belgie, Finska, Francie, Německa, Nizozemí a Srbska úplně chybí, zatímco v ostatních státech (České republice, Polsku a Slovensku) bylo

studii provedeno velmi malé množství. Většina studií zabývajících se kryptosporidiovými infekcemi u rodu *Apodemus* v Polsku byla založena pouze na mikroskopické detekci oocyst (Bajer 2008; Bajer et al. 2001; Bednarska et al. 2007; Siński et al. 1998), vzhledem k nízké senzitivě mikroskopické detekce a nemožnosti odlišit od sebe jednotlivé druhy střevních kryptosporidií pouze na základě velikosti, nebylo možné odlišit ani tento druh. Ani v rámci studií Perec-Matysiak et al. (2015) a Bajer et al. (2003) na území Polska, které byly prováděny pomocí molekulárních analýz, nebyl tento druh detekován. Lokality, na kterých byla prováděna studie u druhů *A. agrarius* a *A. flavicollis* Perec-Matysiak et al. (2015), jsou vzdálené 100 km a více (severním směrem) od odchytových lokalit ze kterých pocházejí vzorky vyšetřené v této práci. Lokality, na kterých byla prováděna studie u druhu *A. flavicollis* Bajerem et al. (2003), jsou vzdálené dokonce 500 km a více rovněž severním směrem, což by mohlo částečně souviset s fylogenezí druhu *Apodemus flavicollis* a být jedním z několika doposud neobjasněných důvodů, kvůli kterým nebylo *C. ditrichi* detekováno v těchto případech. V rámci studií prováděných na území Slovenska taktéž výskyt *C. ditrichi* u myšic nebyl detekován (Danišová et al. 2017 a Li et al. 2014). Li et al. (2014) ve své studii neuvádějí celkový počet vyšetřených jedinců, ale pouze počet jedinců pozitivních (n=2). Naopak Danišová et al. (2017) tyto počty uvádějí a prováděly výzkum na shodných lokalitách (2 lokality) nebo se jejich lokality nacházely ve velmi blízké vzdálenosti (1 lokalita) od odchytových lokalit využívaných v rámci této práce. Ačkoliv využívané lokality byly shodné nebo velmi blízké Danišová et al. (2017) *C. ditrichi* nedetekovali, i přes to, že bylo několik jedinců pozitivních na *C. ditrichi* na shodných/blízkých lokalitách v rámci této práce detekováno (čtyři jedinci druhu *A. flavicollis*). Nemí zcela jasné proč se *C. ditrichi* nepodařilo Danišové et al. (2017) detekovat. V rámci studie prováděné na území České republiky Hajduškem et al. (2004) nebylo *C. ditrichi* detekováno, autoři neuvádějí celkový počet vyšetřovaných hlodavců rodu *Apodemus* a zmiňují se jen o pozitivních jedincích (n=2). Čondlová (2013) v rámci své práce jako první tento druh detekovala u 96 % pozitivních jedinců a pojmenovala ho v rámci své práce jako *Cryptosporidium Apodemus* genotyp I. Druh *C. ditrichi* byl detekován také v přirozených vodních zdrojích v Norsku (KU892579; nepublikovaná data) a Velké Británii (GQ183527) (Chalmers et al. 2010).

Cryptosporidium apodemi bylo detekováno u 17,7 % pozitivních jedinců, u tří druhů myšic (*A. agrarius*, *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*) na území České republiky, Litvy, Lotyšska, Polska, Rumunska a Slovenska. Studie zabývající se kryptosporidiovými infekcemi u hlodavců rodu *Apodemus* na území Litvy, Lotyšska a Rumunska úplně chybí, zatímco v ostatních státech (České republice, Polsku a Slovensku) nebyl doposud tento druh vůbec detekován (Bajer 2008; Bajer et al. 2001; Bednarska et al. 2007; Čondlová et al. 2013; Danišová et al. 2017; Hajdušek et al. 2004; Li et al. 2014; Perec-Matysiak et al. 2015; Siński et al. 1998) a to ani přes to, že Danišová et al. (2017) prováděli odchyty na několika shodných lokalitách (3 lokality). Proč se *C. apodemi* nepodařilo Danišové et al. (2017) detekovat není zcela jasné. Detekovat *C. apodemi* se nepodařilo ani v rámci studie prováděné v České republice Čondlovou (2013), což by mohlo být způsobeno velmi malým zastoupením druhu *C. apodemi* v rámci České republiky, které bylo detekováno u jednoho jedince (tedy u 0,3 % pozitivních jedinců). Nebo i detekcí tohoto druhu na lokalitě, na které výzkum Čondlové (2013) neprobíhal. Tento druh byl tedy poprvé detekován v rámci této práce.

Dále bylo v rámci této práce detekováno *Cryptosporidium hominis* (subtyp IbA10G2) u *A. agrarius* na lokalitě Rozhanovce; Slovensko – stejný subtyp *C. hominis* byl detekován v rámci studie Danišové et al. (2017) u stejného druhu myšic v Košicích, taktéž na Slovensku (vzdálenost lokalit Rozhanovce-Košice je 12 km). Tento subtyp IbA10G2, byl detekován v rámci několika případů znečištění vodních toků nebo při epidemiích přenášených potravinami zaznamenaných po celém světě (Ng et al. 2010). Dále byl také detekován na Slovensku u sourozenců – sedmiletého chlapce a dvouleté dívky (Ondriska et al. 2013). *Cryptosporidium hominis*, druh považovaný za hostitelsky specifický pro lidi, je spolu s *C. parvum* nejčastěji detekovaným druhem způsobujícím kryptosporidíozu lidí (Morgan-Ryan et al. 2002; Muthusamy et al. 2006; Xiao et al. 2009; Xiao et Feng 2008).

Cryptosporidium muris, žaludeční druh kryptosporidie, bylo detekováno u *A. flavicollis* – u dvou jedinců na Slovensku a jednoho v Polsku. V rámci studií prováděných na území Polska nebylo *C. muris* detekováno (Bajer 2008; Bajer et al. 2001, 2003; Bednarska et al. 2007; Kuliś-Malkowska 2007; Perec-Matysiak et al. 2015; Siński et al. 1998) a detekováno nebylo ani v rámci studie Danišové et al. (2017) prováděné na Slovensku – i přes to, že studie probíhala na shodné lokalitě, na

kteřé byl odchycen pozitivní jedinec v rámci této práce. Proč se nepodařilo detekovat *C. muris* i Danišové et al. (2017) není zcela jasné. O detekci druhu *C. muris* u *A. sylvaticus* se ve svých studiích prováděných ve Velké Británii zmiňují Chalmers et al. (1997) a ve Španělsku Torres et al. (2000), ale oba výzkumy byly založeny pouze na mikroskopické detekci oocyst, takže nelze s jistotou říci, zda se opravdu jednalo o tento druh nebo o jiný druh žaludečních kryptosporidií. Výskyt *C. muris* u druhů *A. speciosus* a *A. chejuensis* v Japonsku a Koreji detekovali v rámci svých prací založených na molekulárních analýzách mezi prvními Hikosaka a Nakai (2005), Murakoshi et al. (2013) i Song et al. (2015). *Cryptosporidium muris* je jedním z nejčastějších druhů kryptosporidií infikujících myši (*Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus*), dále bylo detekováno i u žiraf, psů, koček a lidí (Fayer 2010; Feng et al. 2011; Kváč et al. 2013b).

Dalším detekovaným druhem bylo *C. parvum* (IIaA16G1R1b) na Slovensku – lokalita Hýľov u *A. flavicollis* a *A. agrarius* a v Německu u *A. flavicollis*. Studie zabývající se kryptosporidiovými infekcemi u hlodavců rodu *Apodemus* na území Německa zcela chybí. Jedinci druhu *A. flavicollis* a *A. agrarius* pozitivní na *C. parvum*, byli odchyceni na Slovensku (na lokalitě Rozhanovce vzdálené 25 km od Hýľova) i Danišovou et al. (2017), ale v tomto případě se jednalo o odlišné alelické rodiny/subtypy *C. parvum* detekované u jedenácti jedinců (IIiA10; IIa18G3R1 u druhu *A. flavicollis* a IIiA10; IIcA5G3a; IIaA18G3R1 u *A. agrarius*). O nálezu *C. parvum* v Polsku u *A. flavicollis* a *A. agrarius* se ve svých studiích zmiňují i Kuliš-Maľkowska (2007) a Perek-Matysiak et al. (2015), ale blíže neuvádějí konkrétní alelické rodiny ani subtypy. Subtyp detekovaný v rámci této práce je subtypem běžně detekovaným u skotu a ovcí (Imre et al. 2013; Kváč et al. 2011; Ondráčková et al. 2009; Plutzer et Karanis 2007; Silverlas et al. 2013).

Cryptosporidium tyzzeri bylo v rámci této práce detekováno u *A. flavicollis* v České republice (alelická rodina IXa) a u *A. sylvaticus* v Srbsku (alelická rodina IXc). Tento druh byl detekován také Bajerem et al. (2003) u *A. flavicollis*, *M. arvalis* a *C. glareolus*, ale i u laboratorních myši a potkanů (Lv et al. 2009). Alelická rodina IXa byla detekována u *M. m. musculus* v České republice (východně od centra takzvané hybridní zóny) v rámci studie Kváce et al. (2013b) a u *M. musculus* v Číně (Ren et al. 2012). Oproti tomu alelická rodina IXb byla detekována u vzorků z Německa (západně od centra takzvané hybridní zóny) (Kváč et al. 2013b). Nízká

prevalence výskytu *C. tyzzeri* u myšic může být ovlivněna hostitelskou specifitou tohoto druhu (Ren et al. 2012; Kváč et al. 2013b). Alelická rodina IXc nebyla doposud detekována.

U jedné *A. flavicollis* v České republice bylo detekováno *C. andersoni*, které patří mezi žaludeční kryptosporidie a je známo jako původce kryptosporidiových infekcí skotu – bylo nalezeno také u koní, velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) nebo takina zlatého (*Budorcas taxicolor bedfordi*) (Anderson 1987; Lindsay et al. 2000; Liu et al. 2014; Liu et al. 2015; Zhao et al. 2015). Infekce tímto druhem byla popsána také u krysy malé (*Mastomys coucha*) (Kváč et al. 2007). *Cryptosporidium andersoni* se ukázalo jako plně infekční i pro laboratorní myši (Matsubayashi et al. 2005) a bylo detekováno i u lidí v jižním Assamu – Indie (Hussain et al. 2017).

Posledním detekovaným druhem kryptosporidií bylo *C. microti*. Pozitivita na tento druh byla prokázána pouze u čtyř jedinců *A. flavicollis* na třech odlišných lokalitách v České republice. *Cryptosporidium microti* je nejčastěji detekovaným druhem u *M. arvalis* (tvoří 63,5 % ze všech kryptosporidiových infekcí tohoto druhu v České republice) (Horčíčková et al. 2018), na základě výsledků experimentální infekce lze hlodavce rodu *Apodemus* považovat za náhodné hostitele, kteří částečně sdílí lokality s hrabošem polním nebo přes tyto lokality migrují, shodné výsledky uvádí ve své práci i Horčíčková et al. (2018).

Kromě již jmenovaných druhů výše byla na základě molekulárních analýz získaných v rámci této studie prokázána i přítomnost dvou druhů *Cryptosporidium* spp. blízké příbuzných s *C. ubiquitum*, v této práci pojmenovaných jako *Cryptosporidium apodemus* genotyp I a II. *Cryptosporidium apodemus* genotyp I byl dříve detekován v rámci studie Perek-Matysiak et al. (2015) u *A. flavicollis* v Polsku (uváděný jako *C. ubiquitum* izolát 4-O-10 (KC962124)) a *Cryptosporidium apodemus* genotyp II byl dříve detekován v povrchové vodě v Japonsku (AB694733; nepublikovaná data) (uváděný jako *Cryptosporidium cervine* genotyp). Nukleotidové sekvence GP60 genu *Cryptosporidium apodemus* genotypu I a II jsou identické se sekvencemi izolátů detekovanými u *A. agrarius* a *A. flavicollis* na Slovensku (uváděné jako *C. ubiquitum* XIIe a XIIIf) (Li et al. 2014). Vzhledem k získaným výsledkům multilokusových a genotypových dat v rámci této práce a k souladu s nomenklaturou pro rodiny GP60 (Lv et al. 2009; Sulaiman et al. 2005) by bylo

vhodné následné použití označení – *Cryptosporidium apodemus* genotyp I a II, které je odvozeno od zatím jediných popsanych hostitelů rodu *Apodemus*. Na základě získaných dat se lze domnívat, že oba tyto genotypy jsou druhově specifické pro hlodavce rodu *Apodemus*.

6.3. Hostitelská, věková a pohlavní specifita

Na základě výsledků této práce považujeme *C. apodemi*, *C. ditrichi* a *Cryptosporidium apodemus* genotyp I a II za hostitelsky úzce specifické druhy pro hlodavce rodu *Apodemus*. V rámci práce se nepodařilo experimentálními infekcemi prokázat, že druh *C. microti* je infekční pro myšice, ale bylo prokázáno, že *C. microti* je druh úzce hostitelsky specifický pro *Microtus arvalis*. Tento výsledek je shodný s výsledky práce Horčičkové et al. (2018), která prokázala úzkou hostitelskou specifitu tohoto druhu pro hraboše (*Microtus arvalis* a *Microtus pennsylvanicus*). No opak druhem *C. parvum*, se podařilo myšici nainfikovat, což odpovídá i výsledkům experimentálních infekcí druhem *C. parvum* u *A. flavicollis*, *M. arvalis* a *C. glareolus* úspěšně provedených Bednarskou et al. (2003) a široké hostitelské specifitě tohoto druhu, která je považována za jednu z nejširších vůbec. *Cryptosporidium parvum* bylo detekováno a experimentálně přeneseno na celou řadu hostitelů včetně člověka a u tohoto druhu je předpokládána vnímavost všech savců (Fayer 2004; Ng-Hublin et al. 2013; Tyzzer 1912; Xiao et Ryan 2008; Xiao et al. 2012).

Vzhledem k výsledným datům této práce, lze také konstatovat, že druhy nejčastěji detekované u myšic patří mezi druhy kryptosporidií bez věkové a pohlavní specifity – mezi pozitivními jedinci v rámci přirozených infekcí se nacházeli jak adultní, tak i juvenilní jedinci, samčího i samičího pohlaví, tento výsledek se podařilo prokázat i u *C. apodemi* a *C. ditrichi* experimentálními infekcemi *A. flavicollis*, kdy se podařilo nainfikovat různá pohlaví v rámci různých věkových kategorií. Vliv věku a pohlaví na kryptosporidiové infekce u myšic ve své práci neprokázala ani Čondlová (2013). Obdobných výsledků bylo dosaženo i v jiných studiích (Bajer et al. 2001; Kváč et al. 2008; Torres et al. 2000). Ke stanovení hostitelské, věkové a pohlavní specifity u ostatních druhů kryptosporidií detekovaných v rámci této práce by bylo potřebné provést několik dalších experimentálních infekcí zaměřených na tuto problematiku.

Získanými výsledky nebyla tedy potvrzena ani obecně akceptovaná hypotéza, že samci jsou více parazitováni než samice (Klein 2004).

6.4. Průběh infekce a lokalizace vývojových stádií

Průběh infekce je blíže specifikován prepatentním obdobím, které trvá od požití infekčních oocyst po vyloučení do vnějšího prostředí, je závislý na druhu/genotypu kryptosporidií, momentálním imunitním stavu hostitele a dalších faktorech (Hijjawi et al. 2002; Lindsay et Blagburn 1990). Za mezní hodnotu tohoto období je považována doba 3–24 dnů (Fayer et al. 2005). Průměrná prepatentní perioda střevních druhů kryptosporidií infikujících savce trvá zhruba okolo jednoho týdne, naopak prepatentní perioda žaludečních kryptosporidií je více variabilní (Enemark et al. 2003; Iseki 1979; Kváč et al. 2013b, 2014; Tzipori 1983).

Do současné doby bylo provedeno velmi malé množství studií zabývajících se experimentálními infekcemi u hlodavců rodu *Apodemus*. Ve většině studií zabývajících se infekcemi druhem *C. parvum* u myšic je zásadním nedostatkem absence molekulárních analýz, a tudíž nelze tato data srovnávat s dosaženými výsledky. Molekulárními analýzami bylo u myšic potvrzeno *C. tyzzeri* ve studii Bajera et al. (2003) a následně byl tento izolát použit k experimentální infekci v rámci studie Bednarske et al. (2003), které na sebe navazují. Experimentální infekce druhem *C. apodemi* a *C. ditrichi* nebyly doposud prováděny v rámci žádné studie.

Délka prepatentní periody u myšic při infekci druhem *C. apodemi* byla 7–9 DPI, u *C. ditrichi* 6 DPI a *C. parvum* 4 DPI. Prepatentní perioda u *M. musculus* při infekci druhem *C. ditrichi* byla 5 DPI a u *M. arvalis* při infekci druhem *C. microti* byla 4 DPI. Tyto doby jsou v souladu s dobou potřebnou k ukončení vývojového cyklu většiny střevních druhů kryptosporidií. Pro srovnání byla např. prepatentní perioda popsána při infekci *C. parvum* u *M. musculus* 3–4 DPI, při infekci druhem *C. tyzzeri* u *A. flavicollis*, *C. glaeolus* a *M. arvalis* kratší než 7 DPI a při infekci druhem *C. microti* u *M. arvalis* 4 DPI (Bednarska et al. 2003; Horčíčková et al. 2018; Tzipori 1983), což jsou data podobná získaným datům během experimentální infekce v rámci této práce u *A. flavicollis*, *M. arvalis* i *M. musculus*.

Délka infekce druhem *C. apodemi* a *C. ditrichi* u *A. flavicollis* trvala déle než 30 DPI a druhem *C. ditrichi* u *M. musculus* 5–13 DPI. Bednarska et al. (2003) ve své studii uvádějí délku infekce druhem *C. tyzzeri* u *A. flavicollis* delší než 60 DPI, což je výsledek podobný délce infekce druhu *C. apodemi* a *C. ditrichi* u *A. flavicollis* stanovené v rámci této práce. Délka infekce druhem *C. microti* u *M. arvalis* trvala 4–16 DPI, shodnou délku infekce popsala i Horčíková et al. (2018) u druhů *C. alticolis* a *C. microti* u hrabošů. Délka infekce druhem *C. parvum* u *A. flavicollis* nebyla v rámci této práce stanovena, vzhledem k upřednostnění stanovení lokalizace vývojových stádií a případnému doladění pracovních postupů prvně využívaných u hlodavců rodu *Apodemus*.

Během infekce ani jedním z těchto druhů nebyly pozorovány žádné klinické příznaky. Tato data se shodují s absencí klinických příznaků *C. alticolis* a *C. microti* u hrabošů, *C. scrofarum* u prasat ale i *C. tyzzeri* u myší, myšic, hrabošů a norníků (Bednarska et al. 2003; Horčíková et al. 2018; Kváč et al. 2013a; Ren et al. 2012). Bez klinických příznaků probíhaly i infekce žaludečnými druhy *C. muris* (Japanese field mouse genotyp) u *A. speciosus* a SCID myši a *C. proliferans* u mastomyši a SCID myši (Hikosaka et Nakai 2005; Kváč et al. 2016). Kryptosporidiové infekce bývají doprovázeny klinickými příznaky u zvířat jen vzácně, pokud se však klinické příznaky vyskytnou, jsou podobné těm u lidí (Fayer 2004).

Vzhledem k lokalizaci kryptosporidií v trávicím traktu lze jednotlivé druhy a genotypy rozdělit na střevní a žaludeční. Druhy námi využívané k experimentálním infekcím patří k druhům střevních kryptosporidií, což bylo prokázáno i lokalizací vývojových stádií u experimentálních zvířat pomocí molekulárních analýz, histologie, popř. skenovací elektronové mikroskopie. Vývojová stádia *C. apodemi* byla detekována ve střevě – jejunum až colon. Většina studií zabývajících se lokalizací střevních kryptosporidií popsala výskyt vývojových stádií v tenkém nebo tlustém střevě (Fayer et al. 2001, 2005; Kváč et al. 2018; Ren et al. 2012; Robinson et al. 2010; Tyzzer 1912). Lokalizaci vývojových stádií v tenkém i tlustém střevě uvádí u druhu *C. scrofarum* Kváč et al. (2013a). V tomto případě lze říci, že se jedná o první zmínku o lokalizaci vývojových stádií v tenkém i tlustém střevě u čeledi Muridae vůbec.

Lokalizace vývojových stádií *C. ditrichi* a *C. parvum* byla detekována v tenkém střevě (jejunu a ileu). Lokalizace dvou posledních druhů se podobá výsledkům experimentálních infekcí *C. tyzzeri* u BALB/c myši, kdy bylo detekováno větší množství vývojových stádií v ileu než v jejunu, také lokalizaci druhu *C. alticolis* v jejunu a ileu u hrabošů, ale i popisu lokalizace *C. parvum* u myši (Horčíčková et al.; Ren et al. 2012; Tyzzer 1912).

6.5. Morfologie a morfometrie

Morfometrie oocyst *C. apodemi* a *C. ditrichi* je typická pro střevní druhy kryptosporidií. I když je průměrná velikost oocyst *C. apodemi* menší, než je tomu u oocyst *C. ditrichi*, není možné od sebe spolehlivě tyto dva druhy odlišit pouze, na základě mikroskopických analýz. Stejně jako je nemožné odlišit tyto druhy od sebe, je nemožné i jejich odlišení od dalších střevních druhů pouze na základě velikosti oocyst. Oocysty *C. apodemi* (3,9–4,7 $\mu\text{m} \times$ 3,8–4,4 μm , poměr mezi délkou a šířkou je 1,00–1,06) a *C. ditrichi* (4,5–5,2 $\mu\text{m} \times$ 4,0–4,6 μm , poměr mezi délkou a šířkou je 1,00–1,20) se svou velikostí překrývají s několika střevními kryptosporidii a mohly by být snadno zaměněny na základě velikosti oocyst například s druhy *C. parvum* (4,5–5,4 $\mu\text{m} \times$ 4,2–5,2 μm), *C. tyzzeri* (4,5–4,7 $\mu\text{m} \times$ 4,1–4,3 μm) nebo *C. ubiquitum* (4,9–5,6 $\mu\text{m} \times$ 4,5–5,5 μm) (Fayer et al. 2010; Ren et al. 2012; Tyzzer 1912). Proto je důležité tato data vždy doplnit o další známé poznatky o daném druhu kryptosporidie, tak aby nemohlo dojít k záměně.

6.6. Zoonotický potenciál

O zoonotickém potenciálu druhů/genotypů kryptosporidií detekovaných u myšic je známo velmi málo informací. S ohledem na danou problematiku a detekci několika různých druhů s možným zoonotickým potenciálem u volně žijících myšic pouze v rámci této práce, je velmi komplikované vyvodit jednoznačný závěr.

Obecně lze konstatovat, že druhy detekované v této práci patří k *C. hominis* – Ib, *C. parvum* – IIa a *C. tyzzeri* – IXa byly v několika studiích označeny za původce lidské kryptosporidiózy (Cama et al. 2007, 2008; Insulander et al. 2013; Jex et al. 2007, 2008; Kinross et al. 2015; Ng et al. 2010; Ondriska et al. 2013; Petřincová et al. 2015; Rašková et al. 2013; Zintl et al. 2011) a tudíž by mohly za určitých

podmínek představovat ohrožení lidské populace. S upřesněním detekovaných subtypů v rámci jednotlivých druhů již nelze toto tvrzení zcela podpořit.

Lze však konstatovat, že *C. parvum* IIa A16G1R1b detekované v této práci u *A. flavicollis* je subtypem vyskytujícím se především u skotu a ovcí (Imre et al. 2013; Kváč et al. 2011; Ondráčková et al. 2009; Plutzer et Karanis 2007; Silverlas et al. 2013). Tento subtyp (A16G1R1b) *C. parvum* byl detekován jako původce průjmových onemocnění studentů veterinární medicíny ve Švédsku (předpokládaný zdroj infekce – telata s průjmovým onemocněním), kontakt s nemocnými zvířaty, kontaminovanými předměty, zanedbání hygienických návyků a konzumace jídla cestou z farem vedly k přenosu této infekce na studenty (Kinross et al. 2015). Kalinová et al. (2017) tento subtyp *C. parvum* detekovali ve vodní nádrži Slepčany (okres Nitra, Slovensko). Doměnka o přenosu této infekce z myšic na člověka je v tomto případě podpořena možným přenosem z telat na člověka. Ale zohledněním velmi nízké pravděpodobnosti kontaktu infikované myšice s člověkem a dalších faktorů, které by mohly hrát významnou roli, nelze možnost přenosu infekce jednoznačně potvrdit, ale ani zcela vyvrátit. Přenos infekce kontaminovanou vodou využívanou k rekreačním účelům by mohl být hrozbou pro člověka.

Obdobné poznatky byly popsány i u *C. hominis* (IbA10G2), které bylo poprvé popsáno jako původce lidské kryptosporidiózy ve studii na Slovensku u sedmiletého chlapce a jeho dvouleté sestry, přesný zdroj infekce nebyl určen – je spojován s pobytem chlapce v lázních (Ondriska et al. 2013). Infekce tímto druhem byla popsána i v Austrálii (1141 případů), kde zdrojem infekce byla voda z bazénu (Waldron et al. 2011). Totožný subtyp detekovaný v této práci u *A. agrarius* na Slovensku pochází z lokality Rozhanovce. V tomto případě není zcela jednoznačné, zda by byl přenos infekce z myšice na člověka možný. Ale na základě studie Waldrona et al. (2011) je zcela zřejmé, že přenos infekce rekreačními vodami je pro člověka hrozbou.

V případě *C. tyzzeri* - Rašková et al. (2013) popsali infekci ženy pracující nejen s laboratorními hlodavci, ale i podílející se na odchycích jedinců ve volné přírodě. I když se jednalo o přenos z myši domácí na člověka, zajímavé je, že k tomuto případu došlo v rámci České republiky a detekce vzorků trusu prokázala smíšenou infekci subtypy *C. parvum* IIa A13G1R1 a *C. tyzzeri* IXa a IXb. *Cryptosporidium*

tyzzeri IXa bylo detekované v rámci této práce u *A. flavicollis* v České republice (okres Český Krumlov). Možnost přenosu tohoto druhu z myšice na člověka lze na základě přenosu z myši na člověka považovat za pravděpodobnou, vzhledem k přítomnosti několika výzkumných pracovišť a probíhajícím výzkumům i v terénních podmínkách. I v tomto případě by byl přenos infekce ovlivněn několika faktory.

V rámci *Cryptosporidium ditrichi* byla významná data získána detekcí druhu *C. ditrichi* u člověka ve Švédsku (Swec449 isolate; KU892562; podrobná data k této infekci nebyla do dnešního dne publikována), v přirozených vodních zdrojích v Norsku (KU892579; nepublikovaná data) a Velké Británii (GQ183527) (Chalmers et al. 2010). Vzhledem k zohlednění experimentálního přenosu na *M. musculus* v laboratorních podmínkách a výše uvedeným datům, lze možnost přenosu tohoto druhu předpokládat za poměrně pravděpodobnou, i v tomto případě by byl přenos ovlivněn několika faktory.

Cryptosporidium andersoni a *C. muris* bylo detekováno v několika málo případech, a to u pacientů s průjmy ve Velké Británii, u dětí mladších 5 let v Malawi, u HIV/AIDS pacientů v Iránu, Indii a u dobrovolníka v USA (Agholi et al. 2013; Leoni et al. 2006; Hussain et al. 2017; Morse et al. 2007; Tosini et al. 2010). Vzhledem k malé četnosti infekcí u lidí se lze přiklánět k domněnce, že ani hlodavci rodu *Apodemus* nebudou v tomto případě hrát významnou roli v přenosu infekce na člověka.

Výše uvedená data většinou podporují domněnky o možném přenosu diskutovaných druhů kryptosporidií na člověka, ale z jednotlivých poznatků, je také zřejmé, že by se jednalo o případy většinou ojedinělé, které by byly ovlivněny několika dalšími faktory. I když hlodavci mohou být rezervoáry různých zoonotických patogenů, Simpson (2002) se domnívá, že významným zdrojem lidských patogenních druhů kryptosporidií nejsou. S touto jeho domněnkou nelze na základě výše uvedeného souhlasit.

7. ZÁVĚRY

Pomocí multilokusových analýz bylo prokázáno, že hlodavci rodu *Apodemus* mohou být přirozeně parazitováni deseti různými druhy a genotypy kryptosporidií.

- Nejčastěji se vyskytujícím druhem kryptosporidií je *C. ditrichi*.
- Další druhy/genotypy detekované u myšic ve větších počtech byly *C. apodemi* a *Cryptosporidium apodemus* genotyp I a II.
- U odchycených jedinců byly detekované ve velmi malých počtech druhy *C. andersoni*, *C. hominis*, *C. microti*, *C. muris*, *C. parvum* a *C. tyzzeri*.

Morfometrická, genetická a biologická data získaná při této práci vedla k popisu dvou nových druhů kryptosporidií v rámci rodu *Cryptosporidium*.

- Byly popsány dva nové druhy pojmenované *Cryptosporidium apodemi* sp. n. a *Cryptosporidium ditrichi* sp. n.

Výsledky práce prokazují, že kryptosporidie hostitelsky specifické pro hlodavce rodu *Apodemus* nejsou věkově a pohlavně specifické.

- Nebyl prokázán rozdíl v prevalenci detekovaných druhů a genotypů kryptosporidií v závislosti na věku nebo pohlaví.
- Experimentálně nebyl zjištěn rozdíl ve vnímavosti juvenilních/adultních jedinců ani samců/samic k infekci *C. apodemi* a *C. ditrichi*.

Výsledky práce prokázaly, že zástupci rodu *Apodemus* obývající Evropu jsou parazitováni stejnými hostitelsky specifickými druhy/genotypy kryptosporidií.

- *Cryptosporidium apodemi* bylo detekováno v několika státech Evropy (Česká republika, Litva, Lotyšsko, Polsko, Rumunsko a Slovensko).
- *Cryptosporidium ditrichi* bylo detekováno v Belgii, České republice, Finsku, Francii, Německu, Nizozemí, Polsku, Slovensku a Srbsku.

- *Cryptosporidium* apodemus genotyp I byl detekován v České republice, Polsku a Slovensku.
- *Cryptosporidium* apodemus genotyp II byl detekován v České republice, Lotyšsku, Polsku, Slovensku a Srbsku.

Data získaná pomocí terénního sledování a experimentálními infekcemi ukazují, že infekce druhů/genotypů kryptosporidií parazitujícími u hlodavců rodu *Apodemus* nejsou spojeny s klinickými příznaky, ani patologickými změnami v infikovaných částech zažívacího traktu hostitele.

- Nebyla prokázána souvislost mezi kryptosporidiovými infekcemi a změnami konzistence trusu u přirozeně infikovaných jedinců.
- Experimentálně infikovaní jedinci v průběhu infekce nevykazovali žádné klinické příznaky onemocnění.
- Nebyly zjištěny žádné makroskopické ani histopatologické změny v zažívacím traktu infikovaných hostitelů.

Na základě vyšetření 946 vzorků lze konstatovat, že u hlodavců rodu *Apodemus* bylo detekováno několik druhů kryptosporidií se zoonotickým potenciálem. Některé tyto druhy by mohly za určitých podmínek představovat riziko v ohrožení zdraví lidské populace.

- Z detekovaných druhů/genotypů kryptosporidií popsanych v této práci bylo u lidí detekováno *C. andersoni*, *C. ditrichi*, *C. hominis*, *C. muris*, *C. parvum* a *C. tyzzeri*.
- Experimentálně bylo prokázáno, že hlodavci rodu *Apodemus* jsou vnímaví k infekci druhem *C. parvum*.
- Doposud nebyl prokázán přenos žádného druhu kryptosporidií z hlodavců rodu *Apodemus* na člověka.

8. PUBLIKACE, Z NICHŽ VYCHÁZÍ TATO PRÁCE

8.1. Publikace I

Cryptosporidium apodemi sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n.
(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp.

Čondlová Š., Horčíčková M., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R.,
Stanko M., McEvoy J., Kváč M. 2018. Eur. J. Protistol. 63: 1-12.



Cryptosporidium apodemi sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp.

Šárka Čondlová^{a,b}, Michaela Horčíčková^{a,b}, Bohumil Sak^b, Dana Květoňová^b,
Lenka Hlásková^b, Roman Konečný^a, Michal Stanko^c, John McEvoy^d, Martin Kváč^{a,b,*}

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

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

^cSlovak Academy of Sciences, Košice, Slovakia

^dMicrobiological Sciences Department, North Dakota State University, Fargo, USA

Received 2 November 2017; received in revised form 20 December 2017; accepted 29 December 2017
Available online 4 January 2018

Abstract

Faecal samples from striped field mice (n=72) and yellow-necked mice (n=246) were screened for *Cryptosporidium* by microscopy and PCR/sequencing. Phylogenetic analysis of small-subunit rRNA, *Cryptosporidium* oocyst wall protein and actin gene sequences revealed the presence of *C. parvum*, *C. hominis*, *C. muris* and two new species, *C. apodemi* and *C. ditrichi*. Oocysts of *C. apodemi* are smaller than *C. ditrichi* and both are experimentally infectious for yellow-necked mice but not for common voles. Additionally, infection by *C. ditrichi* was established in one of three BALB/c mice. The prepatent period was 7–9 and 5–6 days post infection for *C. apodemi* and *C. ditrichi*, respectively. The patent period was greater than 30 days for both species. Infection intensity of *C. ditrichi* ranged from 4000–50,000 oocyst per gram of faeces and developmental stages of *C. ditrichi* were detected in the jejunum and ileum. In contrast, neither oocysts nor endogenous developmental stages of *C. apodemi* were detected in faecal or tissue samples, although *C. apodemi* DNA was detected in contents from the small and large intestine. Morphological, genetic, and biological data support the establishment of *C. apodemi* and *C. ditrichi* as a separate species of the genus *Cryptosporidium*.

© 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Europe; Experimental infection; Molecular analyses; Oocyst size; Phylogeny; Rodentia

Introduction

Cryptosporidium species are apicomplexans that infect the epithelial cells of the gastrointestinal, respiratory and urinary tract of vertebrates (Ryan and Xiao 2014). More than

35 species of *Cryptosporidium* have been formally described and are considered valid. Additionally, a large number of *Cryptosporidium* genotypes/isolates, which lack the biological and morphological data necessary for species designation, have been reported in vertebrates and the environment (Kváč et al. 2014; Robertson et al. 2014; Ryan and Xiao 2014). Molecular studies have shown that *Cryptosporidium* infecting humans and livestock represent a small fraction of the diversity in the genus (Nakamura and Meireles 2015; Stenger et al. 2015a; Yang et al. 2015). Rodents, an order that com-

*Corresponding author at: Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic.

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

prises about 40% of the mammalian diversity, host much of the described diversity in the genus *Cryptosporidium* (Kváč et al. 2014; Li et al. 2015; Ng-Hublin et al. 2013; Stenger et al. 2015b). *Apodemus*, in the rodent family Muridae, comprises approximately 20 Palearctic species, divided into four groups according to their evolution (Filippucci et al. 2002; Liu et al. 2004; Wojcik et al. 2004). *Cryptosporidium* was first reported in *Apodemus* in the late 1990s, and several of the earlier studies, which were based on descriptions of oocyst morphology, identified *C. parvum* and *C. muris* (Bednarska et al. 2007; Chalmers et al. 1997; Torres et al. 2000). It is now known that many *Cryptosporidium* species have morphologically indistinguishable oocysts and can only be distinguished by genotyping. Using genotyping, 12 *Cryptosporidium* species and genotypes have been identified in different species of *Apodemus*, including *C. ubiquitum*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. hominis*, *C. muris*, *C. parvum*, *Cryptosporidium* cf. *parvum*, *Cryptosporidium* Naruko genotype, *C. muris* Japanese field mouse genotype, *Cryptosporidium* muskrat genotype II, *Cryptosporidium* chipmunk genotype I, and *Cryptosporidium* sp. KSFM (Danisova et al. 2017; Hajdušek et al. 2004; Hikosaka and Nakai 2005; Kulis-Malkowska 2007; Li et al. 2014; Murakoshi et al. 2013; Perec-Matysiak et al. 2015; Song et al. 2015). Most of these cryptosporidia occur rarely in *Apodemus* and are more typically found in other hosts, so they are not considered specific for *Apodemus*. We undertook the present study to describe the presence of *Cryptosporidium* spp. in the genus *Apodemus* in central Europe. Additionally, we described the experimental transmission, oocyst morphology and molecular characteristics of *Apodemus*-associated *Cryptosporidium* spp. Based on these data, we describe two new *Cryptosporidium* species that are specific for the genus *Apodemus* and we propose that they be named *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n.

Material and Methods

Specimens studied

The research was performed on rodents of the genus *Apodemus* in the Czech Republic and Slovakia. Animals were trapped with snap traps baited with smoked cheese. After identification of species and gender, the animal was dissected and a faecal sample was collected from the colon. Each sample was preserved in 2.5% potassium dichromate and stored at 4 °C. All faecal samples obtained from individual animals were monitored for the presence of *Cryptosporidium* oocysts using the aniline-carbol-methyl violet (ACMV) staining method (Miláček and Vítovec 1985) with microscopic examination at a magnification of $\times 1000$. The infection intensity was determined from the microscopic examination as number of oocysts per gram (OPG) according to Kváč et al. (2007).

Molecular characterisation and phylogenetic analysis

Genomic DNA was extracted from 200 mg of faecal samples by bead disruption for 60 s at 5.5 m s^{-1} using 0.5 mm glass beads in a FastPrep[®] 24 Instrument (MP Biomedicals, CA, USA) by Sak et al. (2008). DNA was isolated by using an Exgene[™] stool DNA mini kit (GeneAll[®], Korea) in accordance with the manufacturer's instructions. DNA was stored at -20 °C until used in PCR assays. Nested-PCR protocols were used to amplify partial sequences of the *Cryptosporidium* small-subunit rRNA gene (SSU) according to Jiang et al. (2005), the *Cryptosporidium* 60-kDa glycoprotein gene (gp60) according to Alves et al. (2003), actin gene according to Sulaiman et al. (2002) and *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene (COWP) according to Spano et al. (1997). Negative (molecular grade water) and positive controls (DNA of *C. hominis* subtype Id) were included in each PCR amplification. Secondary products were visualized with ethidium bromide following electrophoresis on an agarose gel. PCR products were purified with GenElute[™] Gel Extraction Kit (Sigma–Aldrich, 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 analyser (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). The nucleotide sequences were assembled using ChromasPro 2.1.4 (www.technelysium.com.au/ChromasPro.html), edited using BioEdit 7.04 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) and aligned with previously published sequences using the MAFFT version 7 online server using the Q-INS-i algorithm for SSU, actin, and COWP sequences and L-INS-i algorithm for gp60 sequences (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

Phylogenetic analyses were performed using MEGA 6.0 (www.megasoftware.net/). The evolutionary history of aligned sequences was inferred using the maximum likelihood (ML) method (Saitou and Nei 1987), with the substitution model that best fit the alignment selected using the Bayesian information criterion. The General Time Reversible model was selected for alignment of actin and gp60 alignments and the Tamura 3-parameter test was selected for the SSU and COWP alignments. All models were used under an assumption that rate variation among sites was gamma distributed. 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 MG266030–MG266048.

Source of oocyst for morphometric and transmission studies

Oocysts of *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. from five naturally infected yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*),

which were trapped at three localities in the Czech Republic, and oocysts of *Cryptosporidium apodemi* sp. n. from three naturally infected striped field mice (*Apodemus agrarius*), which were trapped at two localities in Slovakia, were purified using caesium chloride gradient centrifugation for morphometry analyses (Arrowood and Donaldson 1996). Oocyst of each taxon were pooled and used for experimental infection studies.

Morphological evaluation

Oocysts were examined using differential interference contrast (DIC) microscopy, following ACMV staining, and fluorescence microscopy, following labelling with genus-specific FITC-conjugated antibodies (IFA; *Cryptosporidium* IF Test, Crypto cel, Cellabs Pty Ltd., Brookvale, Australia). Morphometry was determined by digital analysis of images (M.I.C. Quick Photo Pro v.3.1 software; Promicra, s.r.o., Praha, Czech Republic) collected using an Olympus DP73 Digital Colour Camera. Length and width of oocysts ($n = 50$) were measured under DIC at $1000\times$ magnification and these measurements were used to calculate the shape index. Oocysts were measured by the same person using the same microscope. Photomicrographs of oocysts observed by DIC, ACMV and IFA were deposited as a phototype at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Czech Republic.

Experimental infection

To study the course of infection and host specificity, purified oocysts were used to infect 8-week-old yellow-necked mice, BALB/c mice (*Mus musculus*), and common voles (*Microtus arvalis*). To prevent environmental contamination with oocysts, laboratory rodents were housed in plastic cages and supplied with a sterilized diet (TOP-VELAZ, Prague, Czech Republic) and sterilized water ad libitum. Each experimental animal was inoculated orally by stomach tube with 50,000 purified oocysts of appropriate taxa suspended in 200 μ l of distilled water. Animals serving as negative controls were inoculated orally by stomach tube with 200 μ l of distilled water. Faecal samples of all animals were screened daily for the presence of *Cryptosporidium* oocysts using ACMV staining, and the presence of *Cryptosporidium*-specific DNA was confirmed using nested PCR targeting the SSU gene. All experiments were terminated 30 days post infection (DPI). Infection intensity was reported as OPG, as previously described by Kváč et al. (2007). In addition, faecal consistency and general health status were examined daily. To study site of infection, a susceptible host was euthanized during the patent period and tissue specimens of the digestive tract (oesophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, and colon) and other organs (liver, kidney, spleen and lungs) were processed for PCR detection, histology and electron microscopy. Animal caretakers wore new

disposable coveralls, shoe covers, and gloves every time they entered the experimental room. All wood-chip bedding, faeces, and disposable protective clothing were sealed in plastic bags, removed from the experimental room, and incinerated.

Histopathological and scanning electron microscopy examinations

The complete examination of all gastrointestinal organs was conducted at necropsy. Tissue specimens were sampled and processed for histology according to Kváč and Vítovec (2003), scanning electron microscopy (SEM) according to Valigurová et al. (2008) and for PCR analyses. Histology sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and Periodic Acid–Schiff (PAS) stain, and genus-specific FITC-conjugated monoclonal antibodies targeting *Cryptosporidium* oocyst wall antigens (*Cryptosporidium* IF Test, Crypto Cel, Medac). All samples processed for SEM were examined by JEOL JSM-7401F.

Statistical analysis

Prevalence was calculated by dividing the number of positive individuals by the total number of individuals sampled. Differences in *Cryptosporidium* prevalence were determined by Chi-square analysis using a 5% significance level. Analyses were performed using the program Epi Info (TM) 7.1.1.14 (Centers for Disease Control and Prevention, GA, USA).

Ethics statement

The research was conducted under ethical protocols approved by the Institute of Parasitology, Biology Centre, and Central Commission for Animal Welfare, Czech Republic (protocol nos. 071/2010 and 114/2013).

Results

Out of 318 rodents, comprising 72 striped field mice and 246 yellow-necked mice, sampled at 11 locations in the Czech Republic and 9 in Slovakia, 17 and 41 were positive for *Cryptosporidium* by microscopy and PCR, respectively (Table 1). All microscopically positive animals were also PCR positive. The overall prevalence of *Cryptosporidium* spp. in *Apodemus* spp. was 12.9% (41/318). The *Cryptosporidium* prevalence in yellow-necked mice (13.4%; 33/246) and striped field mice (11.1%; 8/72) was similar ($\chi^2 = 0.098$, *d.f.* 1). Out of 41 *Cryptosporidium* positive animals, 40, 41 and 25 were genotyped by sequence analysis of SSU, actin and COWP genes, respectively (Table 1). The remaining positive samples yielded sequences of insufficient quality to include in analyses. Phylogenetic analysis of SSU, actin and COWP sequences using the ML method revealed the presence of *C. parvum*, *C. hominis* and *C. muris*, each in a single sample (Table 1, Fig. 1–3).

Table 1. *Cryptosporidium* species and genotypes in wild yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*) and striped field mice (*Apodemus agrarius*) in the Czech Republic (CZE) and Slovakia (SVK). Isolates were characterized by microscopy, including infection intensity expressed as number of oocyst per gram of faeces (OPG), and PCR analysis of the small ribosomal subunit rRNA (SSU), actin, *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) and 60 kDa glycoprotein (gp60) genes.

Isolate ID	Host species	Location (country)	Microscopical positivity (OPG)	Genotyping at the gene loci			
				SSU	Actin	COWP	gp60
12391	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 2 (CZE)	Yes (4000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>		
12414	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 2 (CZE)	Yes (6500)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
12423	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 1 (CZE)	Yes (10,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
12426	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 1 (CZE)	No	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
12427	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 2 (CZE)	Yes (4000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>		
12667	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 2 (CZE)	Yes (25,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>		
12668	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 2 (CZE)	No	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>		
12679	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 2 (CZE)	Yes (15,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>		
12699	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 2 (CZE)	Yes (10,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
12710	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 2 (CZE)	No	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
24843	<i>A. flavicollis</i>	České Budějovice (CZE)	Yes (13,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
25372	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 1 (CZE)	Yes (13,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
25374	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 1 (CZE)	No	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>		
25378	<i>A. flavicollis</i>	Dolní Třebonín (CZE)	Yes (10,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
28036	<i>A. flavicollis</i>	České Budějovice (CZE)	Yes (13,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
28060	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 1 (CZE)	Yes (4000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>		
28531	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 1 (CZE)	No	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
28533	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 1 (CZE)	Yes (4000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
28534	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 1 (CZE)	Yes (13,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
28535	<i>A. flavicollis</i>	Opatovice 1 (CZE)	No	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
30890	<i>A. flavicollis</i>	Hůry (CZE)	Yes (25,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>		
4950	<i>A. flavicollis</i>	Rozhanovce (SVK)	No	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
8147	<i>A. flavicollis</i>	Hýl'ov (SVK)	No	<i>C. muris</i>	<i>C. muris</i>		
10466	<i>A. flavicollis</i>	Rozhanovce (SVK)	No	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>		
11979	<i>A. flavicollis</i>	Rozhanovce (SVK)	Yes (22,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>		
21787	<i>A. flavicollis</i>	Košice 1(SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	
21931	<i>A. flavicollis</i>	Košice 1 (SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	–	
21993	<i>A. flavicollis</i>	Košice 2 (SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	
21999	<i>A. flavicollis</i>	Košice 2(SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>		
27649	<i>A. flavicollis</i>	Rozhanovce (SVK)	Yes (13,000)	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
30399	<i>A. flavicollis</i>	Komárno (SVK)	No		<i>C. ditrichi</i>	<i>C. ditrichi</i>	
30405	<i>A. flavicollis</i>	Komárno (SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	
30406	<i>A. flavicollis</i>	Komárno (SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>		
4951	<i>A. agrarius</i>	Rozhanovce (SVK)	No	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	IaA16G1R1b
10467	<i>A. agrarius</i>	Rozhanovce (SVK)	No	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	IbA10G2
10496	<i>A. agrarius</i>	Rozhanovce (SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>		
10508	<i>A. agrarius</i>	Rozhanovce (SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	
10510	<i>A. agrarius</i>	Rozhanovce (SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	
10517	<i>A. agrarius</i>	Rozhanovce (SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	
11983	<i>A. agrarius</i>	Rozhanovce (SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>	
30403	<i>A. agrarius</i>	Komárno (SVK)	No	<i>C. apodemi</i>	<i>C. apodemi</i>		

Subtyping of *C. parvum* and *C. hominis* at the gp60 locus revealed the presence of subtype families IIAA16G1R1 and IBA10G2, respectively (tree not shown). All remaining isolates clustered in one of two clades. Descriptions of oocyst morphology and experimental infectivity of isolates from these clades support a separate species designation, and a description of these novel species follows.

Cryptosporidium apodemi sp. n.

Prevalence and infection intensity

Out of 318 mice examined, 12 (3.8%) had DNA of *C. apodemi* detectable by PCR. None of these positive samples had oocysts detectable by microscopy (Table 1).

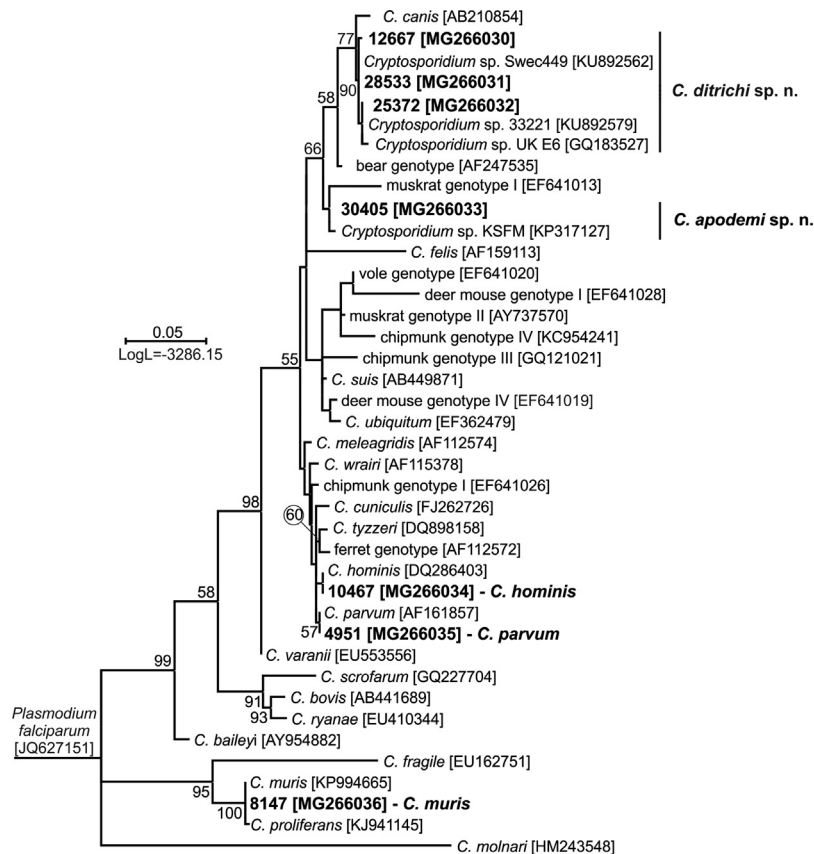


Fig. 1. Maximum likelihood tree based on partial small subunit ribosomal RNA gene sequences of *Cryptosporidium* ($n = 40$), including *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. and *Cryptosporidium apodemi* sp. n. Sequences from this study are bolded. The alignment contained 550 base positions in the final dataset. The Tamura 3-parameter method modelled by using a discrete Gamma distribution was used. Numbers at the nodes represent the bootstrap values with more than 50% bootstrap support from 1000 pseudoreplicates. Branch length scale bar indicate number of substitution per site.

Molecular characterization and phylogenetic analysis

All isolates of *C. apodemi* shared 100% identity at the SSU, actin and COWP loci, and phylogenetic analysis revealed *C. apodemi* to be a sister clade of muskrat genotype I (Figs. 1–3). At the SSU locus, *C. apodemi* shared 99.1% identity with a 480 bp sequence from isolate KSFM [Acc. No. KP317127], which was obtained from a striped field mouse in South Korea.

Experimental host transmissions

Experimental infection was established in yellow-necked mice but not in BALB/c mice or common voles. Specific DNA of *C. apodemi* was first detected in faeces 7–9 DPI. Occasional presence of specific DNA was detected up to 30 DPI (Fig. 4). No oocysts were detected by microscopy during the experimental infectivity studies. Sequences of SSU, actin and COWP genes from experimentally infected hosts shared 100% identity with the isolate used in the inoculum. No macroscopical changes were observed in infected mice

and the surface epithelia were intact. An examination by histology and electron microscopy did not reveal the presence of developmental stages in any part of digestive tract or other organs (liver, pancreas, kidneys, lungs, and spleen). Specific DNA of *C. apodemi* was detected in the content of the small and large intestine. All experimentally infected yellow-necked mice exhibited growth that was typical of their size and weight. None of the faecal samples was diarrhoetic.

Taxonomic summary

Cryptosporidium apodemi sp. n.

Description. Oocysts are shed fully sporulated with 4 sporozoites and oocyst residuum inside. Sporulated oocysts ($n = 50$) measure $3.9\text{--}4.7$ (mean = 4.2) \times $3.8\text{--}4.4$ (mean = 4.0) with a length to width ratio of 1.03 (1.0–1.06) (Fig. 5). Morphology and morphometry of other developmental stages is unknown.

Type host: striped field mouse (*Apodemus agrarius*)

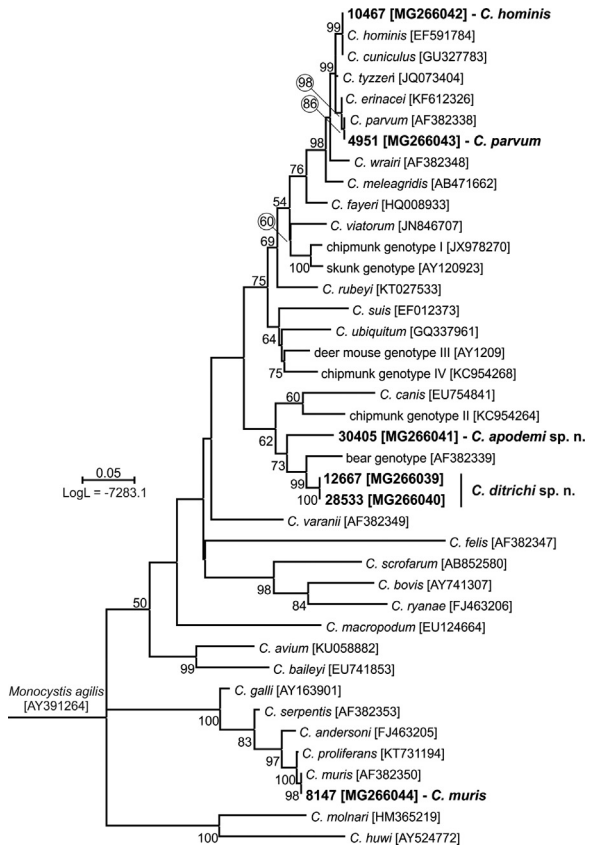


Fig. 2. Maximum likelihood tree based on partial actin gene sequences of *Cryptosporidium* (n = 40), including *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. and *Cryptosporidium apodemi* sp. n. Sequences from this study are bolded. The alignment contained 696 base positions in the final dataset. The General Time Reversible method modelled by using a discrete Gamma distribution was used. Numbers at the nodes represent the bootstrap values with more than 50% bootstrap support from 1000 pseudoreplicates. Branch length scale bar indicate number of substitution per site.

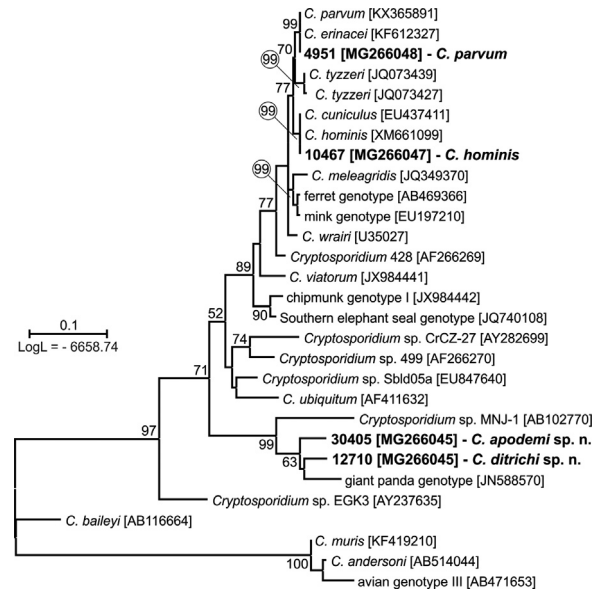


Fig. 3. Maximum likelihood tree based on partial sequences of *Cryptosporidium* (n = 29) coding *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene, including *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. and *Cryptosporidium apodemi* sp. n. Sequences from this study are bolded. The alignment contained 384 base positions in the final dataset. The Tamura 3-parameter method modelled by using a discrete Gamma distribution was used. Numbers at the nodes represent the bootstrap values with more than 50% bootstrap support from 1000 pseudoreplicates. Branch length scale bar indicate number of substitution per site.

Other host: yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*)
Type locality: Rozhanovce, Košice and Komárno (Slovakia)
Site of infection: intestine
Distribution: Slovakia

Material deposited: Slides with oocysts and DNA are deposited at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Czech Republic. Partial sequences of SSU, actin and COWP genes were

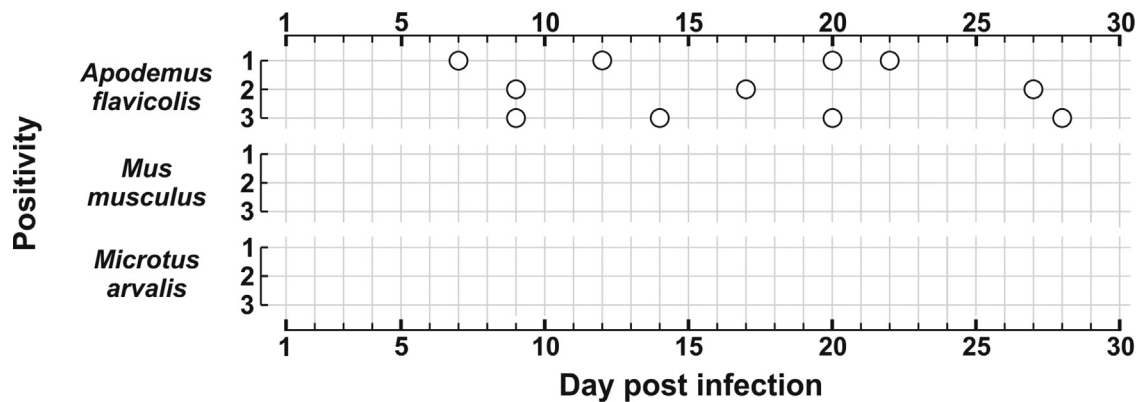


Fig. 4. Course of infection of *Cryptosporidium apodemi* sp. n. based on coprological and molecular examination of faeces. Circles indicate detection of specific DNA.

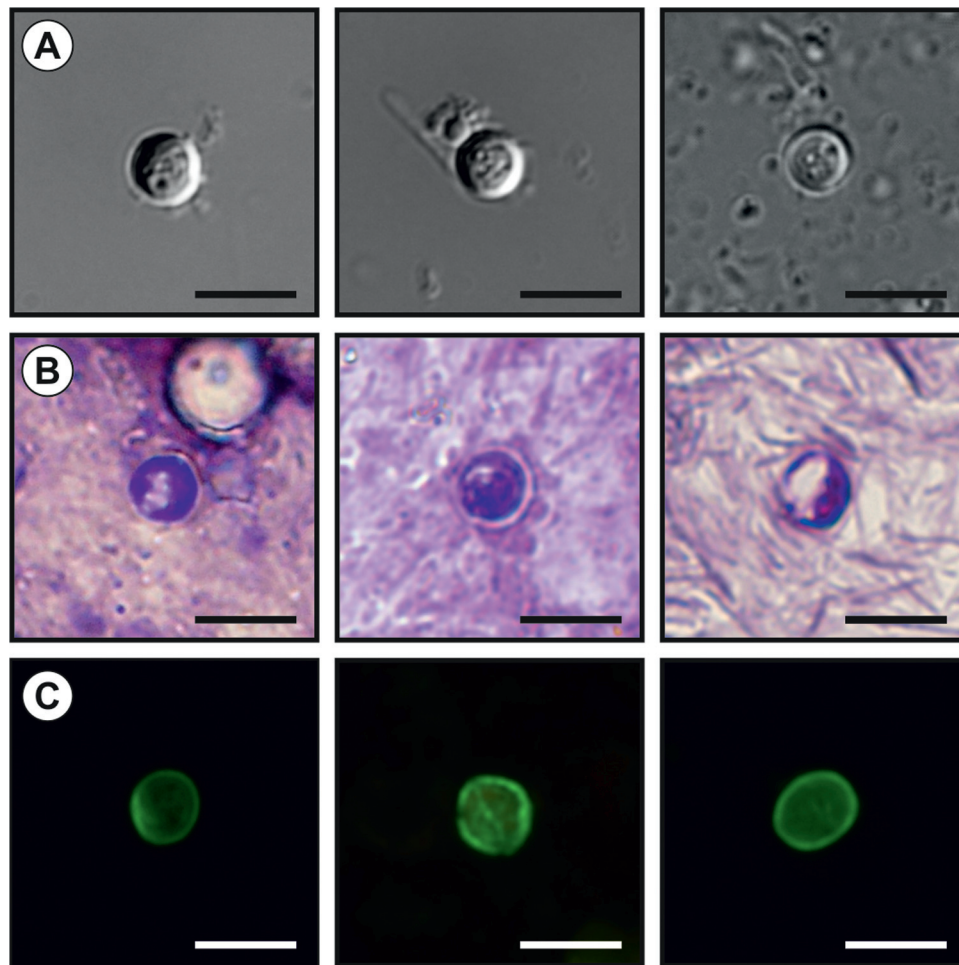


Fig. 5. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. oocysts visualized in various preparations: (A) differential interference contrast microscopy and stained by (B) aniline-carbol-methyl violet and (C) anti-*Cryptosporidium* FITC-conjugated antibody. Bar = 5 μ m.

deposited at GenBank (Acc. Nos. MG266033, MG266041 and MG266046).

Etymology: The species name *apodemi* is derived from the genus *Apodemus*, latin name for Eurasian field mice.

Differential diagnosis. Oocysts of *C. apodemi* are smaller than those of *C. ditrichi* and *C. parvum*, have similar ACMV staining to other species of *Cryptosporidium* and cross react with immunofluorescence reagents developed primarily for *C. parvum*. It can be differentiated genetically from other cryptosporidia based on sequences of SSU, actin and COWP genes.

Cryptosporidium ditrichi sp. n.

Prevalence and infection intensity

Out of 318 examined mice, 26 (8.2%) were positive for DNA of *C. ditrichi*. Of these, 17 (65%) shed oocysts detectible by microscopy at the time of trapping. The infec-

tion intensity in microscopy positive animals ranged from 4000 to 25,000 OPG.

Molecular characterization and phylogenetic analysis

Sequences of *C. ditrichi* formed a well-supported clade that included *Cryptosporidium* SSU sequences from raw water and a human in Sweden and from raw water in the UK. Three variants of the *C. ditrichi* SSU gene shared 98.9–100% similarity with each other. All variants were detected in the Czech Republic (Acc. Nos. MG266030–MG266033), but only one was detected in Slovakia (Acc. No. MG266032; Fig. 1). Two variants of the *C. ditrichi* actin sequence differed by a single synonymous substitution. Both actin variants were detected in the Czech Republic (Acc. Nos. MG266039 and MG266040), but only one was found in Slovakia (Acc. No. MG266040; Fig. 2). COWP gene sequences did not differ among isolates of *C. ditrichi*. Phylogenetic analyses of

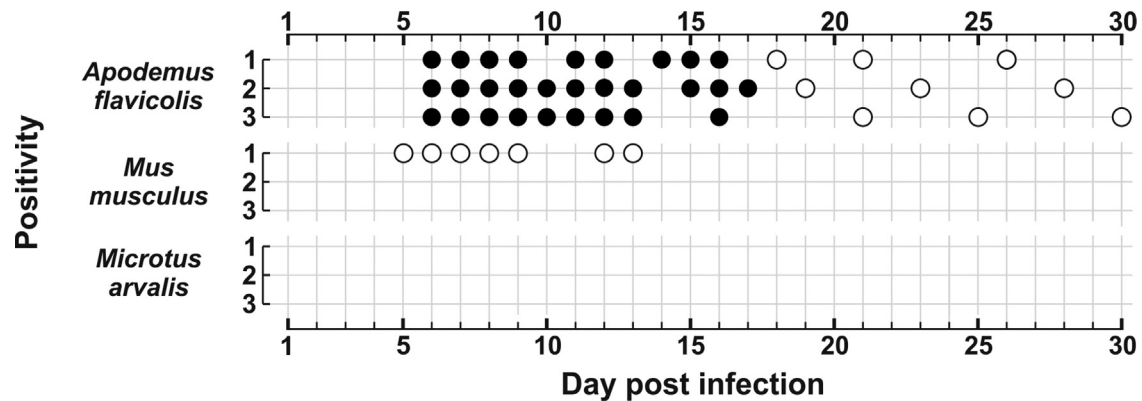


Fig. 6. Course of infection of *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. based on coprological and molecular examination of faeces. Circles indicate detection of specific DNA, black circle indicates microscopic detection of oocysts.

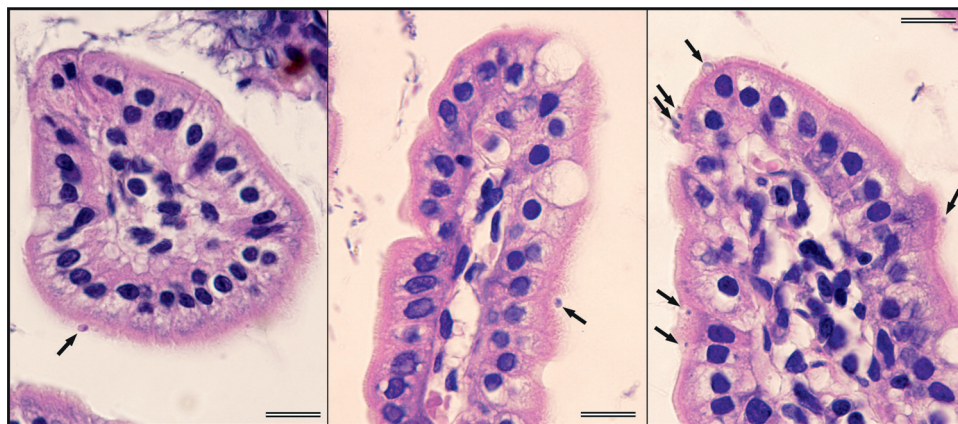


Fig. 7. *Cryptosporidium* developmental stages (arrows) in mucosal glandular epithelium from the ileum of experimentally infected yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) with dose 50,000 oocysts of *Cryptosporidium ditrichi* sp. n., sacrificed 10 DPI. Bar = 25 μ m.

sequences of all genes confirmed the position of *C. ditrichi* as a separate taxon (Figs. 1–3).

Experimental host transmissions

Experimental infection was successful in a yellow-necked mouse but not in common voles. Specific DNA of *C. ditrichi* was first detected in faeces 6 DPI and intermittent shedding was detected in daily samples up to 30 DPI (Fig. 6). The SSU, actin and COWP sequences of *C. ditrichi* recovered from faecal samples of experimentally infected animals were identical to those in the inoculum. Oocysts were detected by microscopy only during the first 12 days of the patent period, with an infection intensity ranging from 5000 to 50,000 OPG. After 12 days, DNA of *C. ditrichi* was detected intermittently by PCR (Fig. 6). No macroscopical changes were observed in the gastrointestinal tract of yellow-necked mice positive for *C. ditrichi* and the surface epithelia were intact. Examination of the epithelium by histology and electron microscopy revealed the presence of developmental stages attached to the microvillar border in the posterior of the jejunum and the ileum (Figs. 7 and 8), and their absence from the first half of

the small and large intestine. The lamina propria was slightly edematous with occasional dilatation of lymphatic vessels.

One of three BALB/c mice was susceptible to *C. ditrichi* infection. Specific DNA was detected from 5 to 13 DPI. All experimentally infected animals exhibited growth that was typical of their size and weight. None of the faecal samples was diarrhoeal.

Taxonomic summary

Cryptosporidium ditrichi sp. n.

Description. Oocysts are shed fully sporulated with 4 sporozoites and oocyst residuum inside. Sporulated oocysts ($n = 50$) measure $4.5\text{--}5.2\ \mu\text{m}$ (mean = 4.7) \times $4.0\text{--}4.6\ \mu\text{m}$ (mean = 4.2) with a length to width ratio of 1.12 (1.0–1.2) (Fig. 9). Morphology and morphometry of other developmental stages is unknown.

Type host: yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*).

Type locality: Branišov, Dolní Třebonín, Hluboká nad Vltavou, Opatovice and Vimperk (Czech Republic)

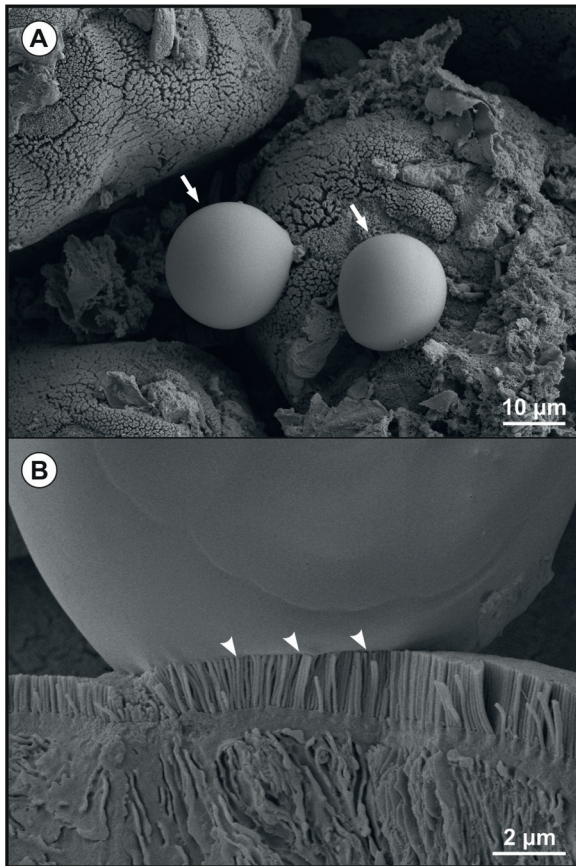


Fig. 8. Scanning electron photomicrograph of epithelium of jejunum of a yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) sacrificed 10 DPI. (A) Attached developmental stages (arrows) of *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (B) Detail of connection (arrow heads) between of parasitophorous sac and microvillous surface. Scale bar included in each picture.

Site of infection: small intestine – jejunum and ileum (Figs. 7 and 8)

Other hosts: mouse (*Mus musculus*), human (*Homo sapiens*)

Distribution: the Czech Republic and Slovakia

Material deposited: Slides with oocysts and DNA are deposited at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Czech Republic. Partial sequences of SSU, actin and COWP genes were deposited at GenBank (Acc. Nos. MG266030–MG266032, MG266039, MG266040 and MG266045).

Etymology: This species is named *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. in honour of Dr. Oleg Ditrich, an accomplished teacher and parasitologist, and one of the pioneers of *Cryptosporidium* research in the Czech Republic.

Differential diagnosis. Oocysts of *C. ditrichi* are larger than those of *C. apodemi* and indistinguishable from those of *C. parvum*, have similar ACMV staining to other species of *Cryptosporidium* and cross react with immunofluorescence

reagents developed primarily for *C. parvum*. It can be differentiated genetically from other cryptosporidia based on sequences of SSU, actin and COWP genes.

Discussion

Rodents are naturally infected with several *Cryptosporidium* spp. (Feng 2010). Here, we report five different *Cryptosporidium* in *Apodemus* spp., including *C. parvum* and *C. muris*, species with a relatively broad host range, *C. hominis*, a human pathogen with a narrow host range, and two novel species, which we have named *C. apodemi* and *C. ditrichi*. *Cryptosporidium parvum*, *C. muris* and *C. hominis* have been reported in *Apodemus* species previously; however, consistent with our findings, the prevalence of *C. hominis* was very low (Danisova et al. 2017; Hajdušek et al. 2004; Perec-Matysiak et al. 2015; Song et al. 2015). The gp60 subtype family of the *C. hominis* isolate from *A. agrarius* in Slovakia in the present study was identical to that reported by Danisova et al. (2017) in the same species from the same country. Other *Cryptosporidium* spp. that have been reported previously in *Apodemus*, including *C. suis*, *C. scrofarum*, and muskrat genotypes I and II (Danisova et al. 2017; Hikosaka and Nakai 2005; Li et al. 2014; Murakoshi et al. 2013; Perec-Matysiak et al. 2015; Song et al. 2015), were not detected in the present study. The novel *Cryptosporidium* species reported in the present study have not been reported previously in *Apodemus* spp. However, *Cryptosporidium* sp. KSFM from *A. agrarius* in South Korea shares 99.1% identity with *C. apodemi* at the SSU locus Song et al. (2015). Other genotypes from *A. agrarius* and *A. chejuensis* in South Korea Song et al. (2015), which shared 92.9–98.6% similarity with the bear genotype, could have been similar to *C. ditrichi*, but the sequences were not published in GenBank so they could not be compared. *Cryptosporidium ditrichi* has been reported in raw water in Norway and the United Kingdom (Chalmers et al. 2010) and in a human infection in Sweden (Acc. No. KU892562; unpublished). *Apodemus* spp. are distributed throughout the Palearctic in Europe, and could have been the source of water contamination and human infection in these countries.

Cryptosporidium apodemi and *C. ditrichi* were not infectious for *Microtus arvalis* in experimental infections, which is consistent with the absence of these species from wild *Microtus* spp. sampled at the same location as *Apodemus* from the present study Stenger et al. (2017). The finding that *C. ditrichi* infected only one of three BALB/c mice under experimental conditions, and that the patent period was short and produced no detectable oocysts by microscopy, suggests that *M. musculus* is not a significant host. This is consistent with the absence of *C. ditrichi* from *M. musculus* in field studies (Kváč et al. 2014).

Phylogenetic analyses based on SSU, actin and COWP gene sequences showed that *Apodemus* spp. in this study

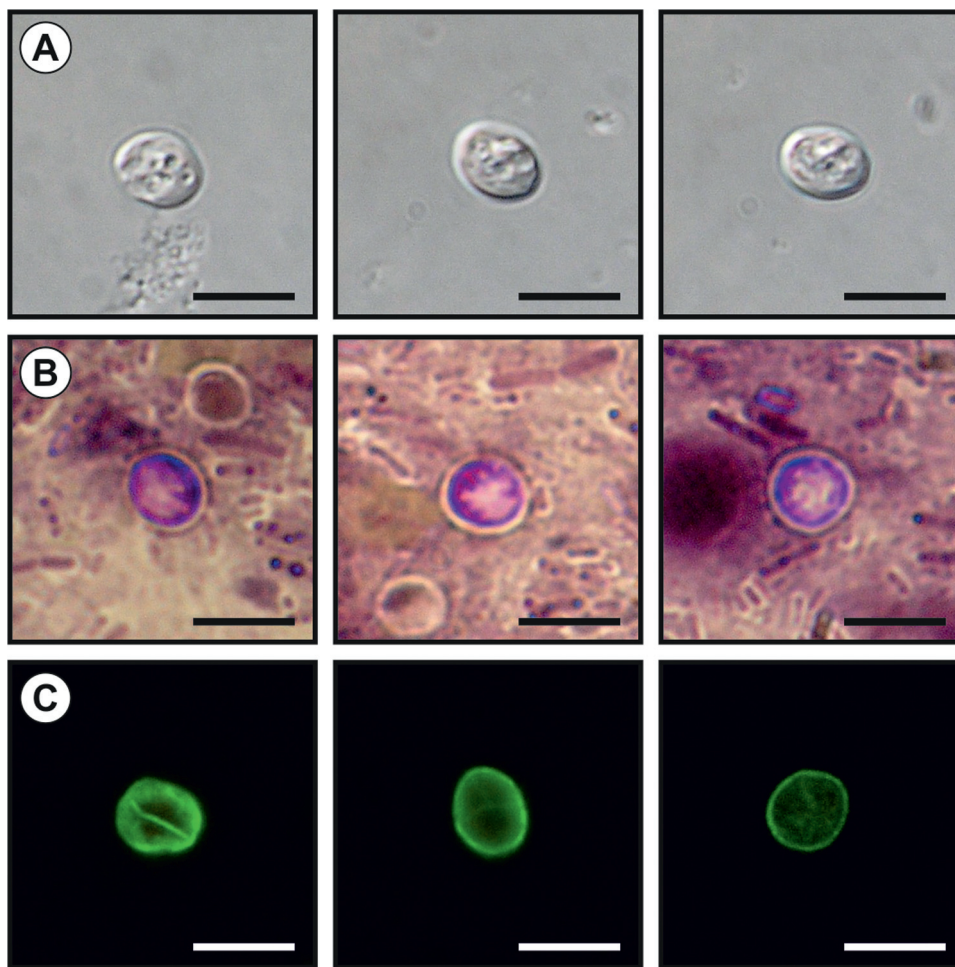


Fig. 9. *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. oocysts visualized in various preparations: (A) differential interference contrast microscopy and stained by (B) aniline-carbol-methyl violet and (C) anti-*Cryptosporidium* FITC-conjugated antibody. Bar = 5 μ m.

was frequently infected by two *Cryptosporidium* that are genetically distinct from previously described species. At the SSU locus, *C. apodemi* shared 97.0%, 95.1% and 93.0% sequence identity with *C. canis*, muskrat genotype I and *C. felis*, respectively. This is far greater than the identity of *C. hominis* and *C. cuniculus* (98.9%); *C. bovis* and *C. xiaoi* (99.5%). At the actin locus, *C. apodemi* shared 89.3% and 83.8% sequence identity with *C. canis* and *C. felis*, respectively, and at COWP locus, 93.9% and 87.2% sequence identity with the giant panda genotype and *C. ubiquitum*, respectively. SSU sequences of *C. ditrichi* clustered with SSU sequences reported from raw water, sharing 98.9–100% sequence identity. A sequence from a raw water sample was identical to one of the *C. ditrichi* variants. *Cryptosporidium* UK E6 [Acc. No. GQ183527] clusters within the *C. ditrichi* clade and should be considered a *C. ditrichi* variant. Intraspecific variability of SSU gene copies has been described in other *Cryptosporidium*, such as *C. parvum*, *C. hominis*, *C. andersoni* and *C. ubiquitum* (Fayer et al. 2010; Laatamna et al. 2015; Nagano et al. 2007; Xiao et al. 1999). Two actin sequence variants of *C. ditrichi* shared 99.8%

identity. Similarly, actin variants were previously reported in *C. tyzzeri* Kváč et al. (2012). At the actin locus, *C. ditrichi* shared 95.5% and 91.9% sequence identity with the bear genotype and *C. canis*, respectively. At the COWP locus, *C. ditrichi* shared 93.9% and 85.4% sequence identity with the giant panda genotype and *C. ubiquitum*, respectively.

The morphology of oocysts of *C. apodemi* and *C. ditrichi* is typical of intestinal species of the genus *Cryptosporidium*. The size range of intestinal *Cryptosporidium* spp. mostly overlap (Fayer 2010), which is the case for *C. apodemi* and *C. ditrichi*. Although the mean size of *C. apodemi* is smaller than *C. ditrichi* it is not possible to distinguish these species microscopically in field samples.

Infections by *C. apodemi* and *C. ditrichi* produced no clinical signs in *Apodemus* spp. in the present study. This is consistent with the several studies, including studies on *Apodemus*, that have found wild animals to rarely develop clinical cryptosporidiosis (Bajer et al. 2003; Bednarska et al. 2007; Danisova et al. 2017; Hikosaka and Nakai 2005; Perec-Matysiak et al. 2015; Song et al. 2015; Torres et al. 2000).

Acknowledgements

This study was funded by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LTAUSA17165), the Grant Agency of University of South Bohemia (002/2016/Z and 098/2016/Z) and supported by MEYS CR (LM2015062 Czech-BioImaging).

References

- 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>.
- Arrowood, M.J., Donaldson, K., 1996. Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 89S.
- 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. *J. Parasitol.* 89, 1053–1055.
- Bednarska, M., Bajer, A., Sinski, E., Girouard, 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, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-006-0276-y>.
- 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., Robinson, G., Elwin, K., Hadfield, S.J., Thomas, E., Watkins, J., Casemore, D., Kay, D., 2010. Detection of *Cryptosporidium* species and sources of contamination with *Cryptosporidium hominis* during a waterborne outbreak in north west Wales. *J. Water Health* 8, 311–325.
- Danisova, O., Valencakova, A., Stanko, M., Luptakova, L., Hatolova, E., Canady, A., 2017. Rodents as a reservoir of infection caused by multiple zoonotic species/genotypes of *C. parvum*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. scrofarum*, and the first evidence of *C. muskrat* genotypes I and II of rodents in Europe. *Acta Trop.* 172, 29–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.013>.
- Fayer, R., Santín, M., Macarisin, D., 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172, 23–32.
- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124, 90–97, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.005>.
- Feng, Y., 2010. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp. Parasitol.* 124, 128–137.
- Filippucci, M.G., Macholan, M., Michaux, J.R., 2002. Genetic variation and evolution in the genus *Apodemus* (Muridae: Rodentia). *Biol. J. Linn. Soc.* 75, 395–419, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00032.x>.
- Hajdušek, O., Ditrich, O., Šlapeta, J., 2004. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 122, 183–192, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.04.005>.
- Hikosaka, K., Nakai, Y., 2005. A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Parasitol. Res.* 97, 373–379, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-005-1459-7>.
- 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>.
- Kulis-Malkowska, K., 2007. The impact of nematode invasions on the pattern of *Cryptosporidium parvum* infection in wild rodents. *Wiad. Parazytol.* 53, 251–252.
- Kváč, M., Vítovec, J., 2003. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med. B* 50, 451–457, <http://dx.doi.org/10.1046/j.0931-1793.2003.00701.x>.
- 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, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.031>.
- Kváč, M., Kestránová, 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. *Exp. Parasitol.* 131, 107–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.016>.
- Kváč, M., McEvoy, J., Stenger, B., Clark, M., 2014. Cryptosporidiosis in other vertebrates. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease.*, 1st ed. Springer, Wien, pp. 237–326.
- Laatamna, A.E., Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Xiao, L., Rost, M., McEvoy, J., Saadi, A.R., Aissi, M., Kváč, M., 2015. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Vet. Parasitol.* 208, 135–142, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.007>.
- 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>.
- 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. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4, 343–350, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.08.005>.
- Liu, X.M., Wei, F.W., Li, M., Jiang, X.L., Feng, Z.J., Hu, J.C., 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of wood mice (genus *Apodemus* Kaup, 1829) based on complete mtDNA cytochrome b sequences, with emphasis on Chinese species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 1–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2004.05.011>.
- Miláček, P., Vítovec, J., 1985. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32, 50.
- 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.* 196, 184–188, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.011>.
- Nagano, S., Matsubayashi, M., Kita, T., Narushima, T., Kimata, I., Iseki, M., Hajiri, T., Tani, H., Sasai, K., Baba, E., 2007. Detection of a mixed infection of a novel *Cryptosporidium andersoni* and its subgenotype in Japanese cattle. *Vet. Parasitol.* 149, 213–218, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.016>.
- 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>.
- 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.* 16, 5–12, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.011>.
- Perec-Matysiak, A., Bunkowska-Gawlik, K., Zalesny, G., Hildebrand, J., 2015. Small rodents as reservoirs of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in south-western Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 22, 1–5, <http://dx.doi.org/10.5604/12321966.1141359>.
- 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.
- 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.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- 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>.
- 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>.
- Spano, F., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D.P., Crisanti, A., 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 150, 209–217.
- 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*). *Infect. Genet. Evol.* 32, 113–123, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.003>.
- 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. *Infect. Genet. Evol.* 36, 287–293, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.002>.
- 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, <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182017001524>.
- 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.
- Torres, J., Gracenea, M., Gomez, M.S., Arribabalaga, 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.
- Valigurová, A., Jirku, M., Koudela, B., Gelnar, M., Modrý, D., Šlapeta, J., 2008. Cryptosporidia: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *Int. J. Parasitol.* 38, 913–922, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.003>.
- Wojcik, J.M., Wojcik, A.M., Macholan, M., Pialek, J., Zima, J., 2004. The mammalian model for population studies of B chromosomes: the wood mouse (*Apodemus*). *Cytogenet. Genome Res.* 106, 264–270, <http://dx.doi.org/10.1159/000079297>.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R., Lal, A.A., 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1578–1583.
- Yang, R.C., Palermo, C., Chen, L.D., Edwards, A., Papparini, A., Tong, K.S., Gibson-Kueh, S., Lymbery, A., Ryan, U., 2015. Genetic diversity of *Cryptosporidium* in fish at the 18S and actin loci and high levels of mixed infections. *Vet. Parasitol.* 214, 255–263, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.013>.

8.2. Publikace II

Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae).

Horčíčková M., Čondlová Š., Holubová N., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R., Sedláček F., Clark M., Giddings C., McEvoy J., Kváč M. 2018. *Parasitology*. 17: 1-14. v tisku.

Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae)

Research Article

Cite this article: Horčíčková M *et al.* (2018). Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology* 1–14. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001142>

Received: 6 April 2018

Revised: 30 May 2018

Accepted: 8 June 2018

Key words:

Experimental infection; molecular analyses; oocyst size; phylogeny; Rodentia; voles

Author for correspondence:

M. Kváč, E-mail: kvac@paru.cas.cz

Michaela Horčíčková^{1,2}, Šárka Čondlová^{1,2}, Nikola Holubová^{1,2}, Bohumil Sak², Dana Květoňová², Lenka Hlásková², Roman Konečný¹, František Sedláček³, Mark Clark⁴, Catherine Giddings⁵, John McEvoy⁵ and Martin Kváč^{1,2}

¹Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic; ²Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic; ³Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic; ⁴Biological Sciences Department, North Dakota State University, Fargo, USA and ⁵Microbiological Sciences Department, North Dakota State University, Fargo, USA

Abstract

Fecal samples from wild-caught common voles ($n = 328$) from 16 locations in the Czech Republic were screened for *Cryptosporidium* by microscopy and PCR/sequencing at loci coding small-subunit rRNA, *Cryptosporidium* oocyst wall protein, actin and 70 kDa heat shock protein. *Cryptosporidium* infections were detected in 74 voles (22.6%). Rates of infection did not differ between males and females nor between juveniles and adults. Phylogenetic analysis revealed the presence of eight *Cryptosporidium* species/genotypes including two new species, *C. alticolis* and *C. microti*. These species from wild-caught common voles were able to infect common and meadow voles under experimental conditions, with a prepatent period of 3–5 days post-infection (DPI), but they were not infectious for various other rodents or chickens. Meadow voles lost infection earlier than common voles (11–14 vs 13–16 DPI) and had significantly lower infection intensity. *Cryptosporidium alticolis* infects the anterior small intestine and has larger oocysts ($5.4 \times 4.9 \mu\text{m}$), whereas *C. microti* infects the large intestine and has smaller oocysts ($4.3 \times 4.1 \mu\text{m}$). None of the rodents developed clinical signs of infection. Genetic and biological data support the establishment of *C. alticolis* and *C. microti* as separate species of the genus *Cryptosporidium*.

Introduction

Cryptosporidium is an apicomplexan protist parasite that primarily infects the gastrointestinal epithelium of a broad range of vertebrate species including humans (Lv *et al.*, 2009). Infections can be asymptomatic or can result in diarrhoea ranging from mild to severe. Disease severity depends mainly on the age and immune status of the host (Checkley *et al.*, 2015; Baneth *et al.*, 2016). Field studies have shown that genus *Cryptosporidium* is genetically diverse, with much of that diversity found in wildlife. Rodents are ubiquitous mammals comprising about 40% of mammalian diversity and occupying a wide range of habitats. Studies to date have shown that rodent species are predominantly parasitized with host-specific *Cryptosporidium* species and genotypes (Feng *et al.*, 2007; Foo *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2007a; Kváč *et al.*, 2008, 2013; Feng, 2010; Ng-Hublin *et al.*, 2013; Stenger *et al.*, 2015a, 2015b, 2018), although zoonotic species such as *C. parvum* and *C. ubiquitum* (Hajdušek *et al.*, 2004; Rašková *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Perc-Matysiak *et al.*, 2015) and livestock-specific species such as *C. scrofarum*, *C. andersoni* and *C. baileyi* (Ziegler *et al.*, 2007a; Lv *et al.*, 2009; Ng-Hublin *et al.*, 2013; Danišová *et al.*, 2017) have been reported. Despite a large number of studies, the diversity and biology of *Cryptosporidium* in several rodent hosts, including voles, have not been thoroughly characterized (Kváč *et al.*, 2014; Stenger *et al.*, 2018).

Early studies, relying on oocyst morphology to distinguish species, reported *C. parvum*, *C. muris* and *Cryptosporidium* sp. in voles (Chalmers *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2000; Sinski *et al.*, 1993, 1998; Bull *et al.*, 1998; Bajer *et al.*, 2002; Bednarska *et al.*, 2007). In more recent studies of voles, using more discriminatory genotyping tools to distinguish species, the prevalence of *C. parvum* was much lower than previously reported and *C. muris* was not detected. Additionally, common voles were not susceptible to *C. muris*, *C. proliferans* or *C. andersoni* under experimental conditions (Modrý *et al.*, 2012). In contrast, *Cryptosporidium* muskrat genotypes I and II and *Cryptosporidium* isolates closely related to muskrat genotypes I and II have been reported frequently (online Supplementary Table S1). In the most recent study, the largest to date, Stenger *et al.* (2018) reported greater diversity of *Cryptosporidium* spp. infecting North American and European voles than previously known. They identified at least 18 different *Cryptosporidium* spp. by sequencing of the partial sequence of the small ribosomal subunit rRNA and actin genes in European and North American voles, and most of these were identified for the first time. Phylogenetic analyses indicated the *Cryptosporidium* spp.



Fig. 1. Sampling locations across the study area in the Czech Republic. Sample site numbers indicate the following: (1) Dačice, (2) Výškovice, (3) Náměšť nad Oslavou, (4) Sedlečko u Tábora, (5) Dolní Třebonín, (6) Pelejovice, (7) Radimovice, (8) Budweis, (9) Bavorovice, (10) Masákova Lhota, (11) Všečov u Tábora, (12) Opatovice, (13) Lovečkovice, (14) Soběslav, (15) Dubovice and (16) Zmišovice.

infecting voles from the different continents remained closely related (Stenger *et al.*, 2018). Collectively, data from studies on voles show that they are host to at least 20 *Cryptosporidium* species and genotypes (see online Supplementary Table S1). Most of the genotypes lack biological data such as course of infection and host range.

We undertook the present study to extend knowledge of the occurrence and diversity of *Cryptosporidium* spp. infecting the common vole (*Microtus arvalis*). We selected two isolates from wild-caught common voles and, in accordance with ICZN nomenclature rules and criteria established by the scientific community studying *Cryptosporidium* (Xiao *et al.*, 2004; Jirků *et al.*, 2008; Fayer, 2010), we describe the morphometry of oocysts, determine phylogenetic relatedness at multiple genetic loci and report on the infectivity for several hosts (voles, laboratory and yellow-necked mice, laboratory rats and chickens) under natural and experimental conditions. Outcomes from the study support the conclusion that the *Cryptosporidium* isolates are genetically and biologically distinct from previously described species. We therefore propose them as new species named *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n.

Material and methods

Area and specimens studied

From 2014 to 2017 (May to September each year), wild-caught common voles were trapped using snap traps baited with apple and peanut at 16 locations in the Czech Republic (Fig. 1). After trapping, we identified the species, measured body mass (± 1 g) and determined the sex of each individual. We estimated the age of each individual using body mass, such that an individual weighing <15 g was considered a juvenile and all other animals were considered adults. Following collection, we dissected each individual and collected a fecal sample from the colon. Fecal samples were stored at 4 °C without fixation. All fecal samples were screened for the presence of *Cryptosporidium* oocysts using the aniline–carbol–methyl violet (ACMV) staining (Miláček and Vitovec, 1985) followed by microscopic examination at 1000 \times magnification (light microscope Olympus BX51, Tokyo, Japan). During microscopic examination, we counted oocysts and we quantified the infection intensity as number of oocysts per gram of feces (OPG) according to Kváč *et al.* (2007).

Molecular characterization

DNA was extracted from 200 mg of feces by bead disruption for 60 s at 5.5 m s⁻¹ using 0.5 mm glass beads in a Fast Prep 24

Table 1. Number of wild-caught common voles positive for *Cryptosporidium* by PCR and microscopy, by sex and age

Sex	Age	<i>n</i>	PCR positive	Microscopically positive
Female	J	29	9	3
	A	113	24	3
Male	J	45	10	3
	A	141	31	10
Total		328	74	19

J, juvenile; A, adult.

Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) followed by isolation and purification using a commercially available kit in accordance with the manufacturer's instructions (PSP spin stool DNA Kit, Invitex, Stratec, Berlin, Germany). Purified DNA was stored at -20 °C prior to amplification by PCR.

A nested PCR approach was used to amplify a partial region of the small ribosomal subunit rRNA (SSU; ~830 bp; Xiao *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2005), actin (~1066 bp; Sulaiman *et al.*, 2002), *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) (~550 bp; Spano *et al.*, 1997) and 70 kilodalton heat shock protein genes (HSP70; ~1950 bp; Sulaiman *et al.*, 2000).

The primary PCR mixtures contained 2 μ L of template DNA, 2.5 U of *Taq* DNA Polymerase (Dream Taq Green DNA Polymerase, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.5 \times PCR buffer (SSU) or 1 \times PCR buffer (actin, COWP and HSP70; Thermofisher Scientific), 6 mM MgCl₂ (SSU) or 3 mM MgCl₂ (actin, COWP and HSP70), 200 μ M each deoxynucleoside triphosphate, 100 mM each primer and 2 μ L non-acetylated bovine serum albumin (BSA; 10 mg ml⁻¹; New England Biolabs, Beverly, MA, USA) in 50 μ L reaction volume. The secondary PCR mixtures were similar to those described above for the primary PCR, with the exception that 2 μ L of the primary PCR product was used as the template, the MgCl₂ concentration was 3 mM and no BSA was used. DNA of *C. parvum* and molecular grade water were used as positive and negative controls, respectively. Secondary PCR products were detected by 2% agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining and extracted using GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Purified secondary products were sequenced in both directions with an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the secondary PCR primers and the BigDye1 Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) in 10 μ L reactions.

Phylogenetic analysis

The nucleotide sequences of each gene obtained in this study were edited using the ChromasPro 2.4.1. (Technelysium, Pty, Ltd, South Brisbane, Australia) and aligned with each other and with reference sequences from GenBank using MAFFT version 7 online server using the Q-INS-I algorithm (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Alignment adjustments were made manually to remove artificial gaps using BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). Phylogenetic analyses were performed and the best DNA/protein phylogeny models were selected using the MEGA7 software (Guindon and Gascuel, 2003; Tamura *et al.*, 2013) and Geneious v7.1.7 (<http://www.geneious.com>). Phylogenetic trees were inferred by maximum likelihood (ML) method, with the substitution model that best fits the alignment selected using the Bayesian information criterion. ML analysis of SSU, actin, COWP and HSP70 alignments was done in the MEGA7 software and concatenated SSU–actin–

Table 2. *Cryptosporidium* spp. in wild common voles (*Microtus arvalis*)

Isolate ID	Location (number of screened samples/ positive)	Microscopical positivity (OPG)	Genotyping at the gene loci (GenBank Acc. No. used in the phylogenetic trees)			
			SSU	Actin	COWP	HSP70
19608 ^a	Dačice (97/25)	Yes (4000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
19612 ^a		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
19615		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
19618 ^a		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
20055 ^a		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
20057		Yes (4000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
20059		Yes (18 000)	vole VII	vole VII	vole VII	
20063		No	vole V	vole V	vole V	
20065 ^a		Yes (6000)	<i>C. alticolis</i> (KY 644657)	<i>C. alticolis</i>	<i>C. alticolis</i>	<i>C. alticolis</i>
23407		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
23408		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
23409 ^b		No	vole V (MH145331)	vole V (MH145311)	vole V (MH145319)	vole V (MH145325)
23410		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
23390		No	vole V	vole V		
22731		Yes (8000)	<i>C. alticolis</i>	<i>C. alticolis</i>	<i>C. alticolis</i>	
23392 ^b		No	vole VII (MH145333)	vole VII (MH145313)	vole VII (MH145321)	vole VII (MH145327)
23393		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
23250		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
23251		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
23231		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
23111 ^b	Yes (2000)	<i>C. alticolis</i> (MH145330)	<i>C. alticolis</i> (MH145310)	<i>C. alticolis</i> (MH145318)	<i>C. alticolis</i> (MH145324)	
23112	No	<i>C. alticolis</i>	<i>C. alticolis</i>	<i>C. alticolis</i>		
23746 ^a	Yes (30 000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
23747	No	<i>C. alticolis</i>	<i>C. alticolis</i>			
23748 ^a	No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
20062 ^{a,b}	Výškovice (3/1)	No	vole III (MH145329, KY644593)	vole III (MH145309)	vole III (MH145317)	
23750 ^a		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
23400 ^{a,b}		No	vole VI (MH 145332)	vole VI (MH 145312)	vole VI (MH 145320)	vole VI (MH 145326)
23405 ^a		No	vole VI	vole VI		
28082 ^b		Yes (16 000)	vole IV (MH145335)	vole IV (MH145315)		
30906		No	vole IV	vole IV		
30908		No	vole IV	vole IV		
30909 ^b		No	vole II (MH145334)	vole II (MH145314)	vole II (MH145322)	
30928		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
22339		Sedlečko u Tábora (35/2)	No	<i>C. microti</i>		
22336	No		<i>C. microti</i>			
21146	Dolní Třebonín (32/8)	Yes (36 000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
22352		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
23115 ^a		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	

(Continued)

Table 2. (Continued.)

Isolate ID	Location (number of screened samples/positive)	Microscopical positivity (OPG)	Genotyping at the gene loci (GenBank Acc. No. used in the phylogenetic trees)			
			SSU	Actin	COWP	HSP70
23236 ^a		No	<i>C. microti</i> (KY644604)	<i>C. microti</i> (KY657294)	<i>C. microti</i>	
23743 ^a		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
24128 ^a		Yes (24 000)	vole VI	vole VI	vole VI	
24129 ^a		No	vole VI (KY644632)	vole VI	vole VI	
25643 ^a		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
24514	Pelejovice (37/2)	No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		<i>C. microti</i>
24916 ^a		No	vole V (KY644670)	vole V		
24919 ^a	Radimovice (18/7)	No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
24922 ^a		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>
24923 ^b		No	<i>C. microti</i> (MH145328)	<i>C. microti</i> (MH145308)	<i>C. microti</i> (MH145316)	<i>C. microti</i> (MH145323)
24924		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
24926 ^a		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>
25163 ^a		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>
25164 ^a		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>
28061	České Budějovice (2/1)	No	vole V			
28315	Masákova Lhota (18/7)	No	<i>C. alticolis</i>	<i>C. alticolis</i>		<i>C. alticolis</i>
28317		Yes (10 000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
28566		Yes (4000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
28567		No	vole VI	vole VI		
28665		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
28667		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
29936		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
28422	Všechov u Tábora (30/12)	No	vole VII	vole VII		
28423		Yes (42 000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
28425		No	<i>C. alticolis</i>	<i>C. alticolis</i>		
28428		No	vole VII	vole VII		
28429		Yes (8000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
28539		Yes (14 000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
28540		Yes (32 000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
28541		Yes (18 000)	vole VII	vole VII		
28543		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	
28545		Yes (6000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
28546		No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
28549		Yes (8000)	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>		
30904	Opatovice (4/1)	No	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	<i>C. microti</i>	

Isolates were characterized by microscopy, including infection intensity expressed as number of oocyst per gram of feces (OPG), and PCR analysis of the small ribosomal subunit rRNA (SSU), actin, *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) and 70 kDa heat shock protein (HSP70) genes. Only localities where *Cryptosporidium*-positive animals were trapped are shown.

^aSequences of SSU and actin previously obtained in the study of Stenger et al. (2018).

^bSequence of isolates used in phylogeny trees.

COWP alignment was done in RAXML v7.2.8 implemented in Geneious. The General Time Reversible model was selected for SSU, actin, HSP70 and concatenated SSU–actin–COWP alignment and the Tamura 3-parameter model was used of COWP alignment. All models were used under an assumption that rate variation among sites was γ distributed with invariant sites.

Bootstrap support for branching was based on 1000 replications. Phylograms were edited for style using CorelDrawX7.

Sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers (Acc. nos.) MH145308–MH145335.

Origin of specimens for transmission studies

Isolates of *C. alticolis* sp. n. and *C. microti* sp. n. were obtained from wild-caught common voles trapped at Dačice and Radimovice, respectively, in the Czech Republic. Oocysts from

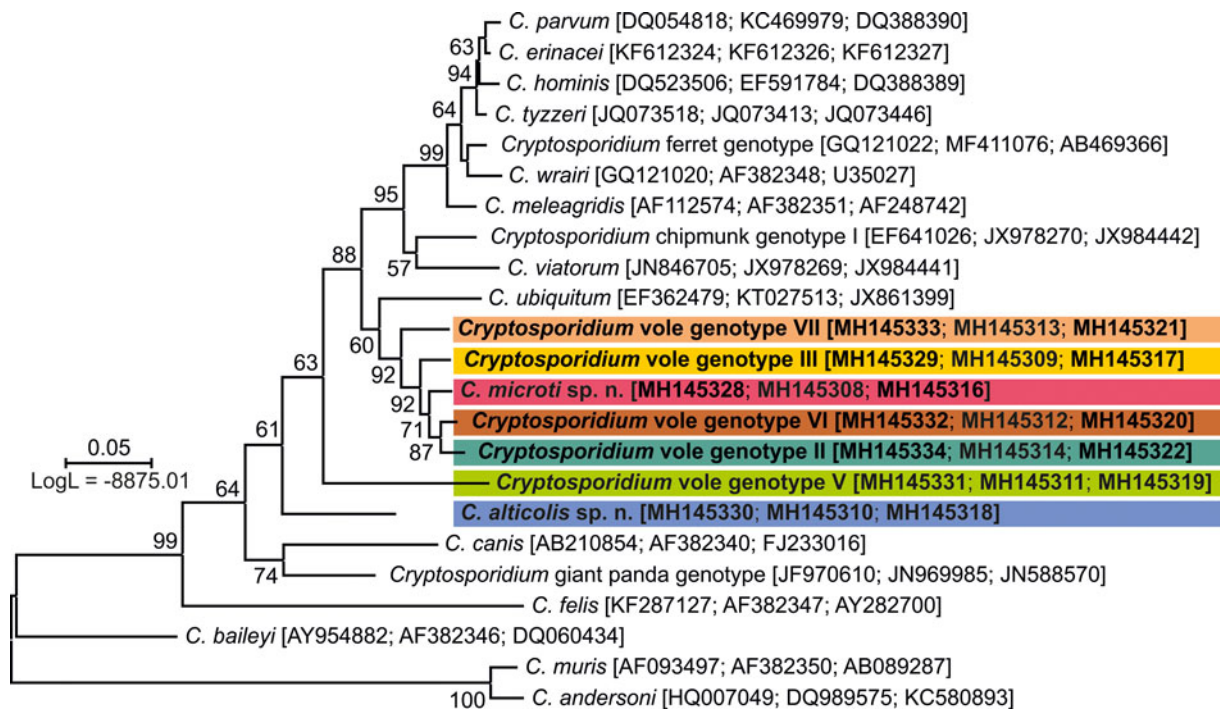


Fig. 2. A maximum likelihood (ML) tree based on concatenated small subunit rRNA (SSU), actin and *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene sequences. A representative of each SSU, actin and COWP species/genotype from wild-caught common voles from this study is highlighted in bold. GenBank accession numbers are shown in parenthesis after the isolate identifier. Numbers at the nodes represent the bootstrap values gaining more than 50% support. Branch length scale bar indicates the number of substitutions per site.

each species were used to infect a 6-month-old common vole (vole 0). Oocysts from vole 0 were purified using caesium chloride gradient centrifugation (Arrowood and Donaldson, 1996) and used for analysis of oocyst morphometry and to infect other animals (see below).

Transmission studies

We experimentally determined the infectivity and pathogenicity of *C. alticolis* sp. n. and *C. microti* sp. n. for 6-month-old common voles, meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) and yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*); 2-month-old SCID (severe combined immunodeficiency), BALB/c and C57BL/6J mice (*Mus musculus*) and brown rats (*Rattus norvegicus*); and 3-day-old chickens (*Gallus gallus* f. *domestica*). Common voles and yellow-necked mice used for infectivity studies were obtained from captive colonies maintained at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic. Laboratory (i.e. house mouse) mice and rats were purchased from Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany. Chickens originated from International Testing of Poultry, Ústřašice, Tábor, Czech Republic. Meadow voles were obtained from a captive colony maintained at Smith College, Northampton, Massachusetts, USA and used in transmission studies at North Dakota State University, USA. All other experiments were performed at the Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic. In determining infectivity and pathogenicity, we used five individuals from each species/group. A week prior to inoculation, fecal samples from all individuals were screened daily for the presence of *Cryptosporidium* oocysts and specific DNA of *Cryptosporidium* spp. using parasitological and molecular tools (SSU) as described above. Individuals were housed separately in plastic cages with sterilized bedding and supplied with a sterilized diet and water *ad libitum*. Each animal was inoculated orally by gavage with 100 000 purified oocysts suspended in 200 μ L of distilled water.

Fecal samples from each individual were screened daily for the presence of *Cryptosporidium* oocysts using ACMV staining and specific DNA using nested PCR targeting the SSU gene. At least three amplicons of each target gene were sequenced directly in both directions from each infected individual.

All experiments were terminated 30 days post-infection (DPI). Course of infection indicators, including fecal consistency, fecal colour and infection intensity, was examined.

Histopathological and scanning electron microscopy examinations

The gastrointestinal tract of one animal from each group was examined following necropsy at 6 DPI (this time was selected based on preliminary results; data not shown). The entire small and large intestine was divided into 1 cm sections and samples were processed for histology, scanning electron microscopy (SEM) and PCR/sequencing. Specimens for histology were fixed in 4% buffered formalin and processed by the usual paraffin method. Histological sections (5 μ m) were stained with haematoxylin and eosin and periodic acid-Schiff stains. The specimens for SEM were fixed overnight at 4 $^{\circ}$ C in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, washed three times for 15 min in the same buffer, post-fixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer for 2 h at room temperature and finally washed three times for 15 min in the same buffer. After dehydration in a graded acetone series, specimens were dried using the critical point technique, coated with gold and examined using a JEOL JSM-7401F-FE SEM.

Oocyst morphometry

Oocysts of *C. alticolis* sp. n. and *C. microti* sp. n. were examined using differential interference contrast (DIC) microscopy, ACMV staining and fluorescence microscopy (Olympus IX70, Tokyo, Japan) following labelling with genus-specific FITC-conjugated

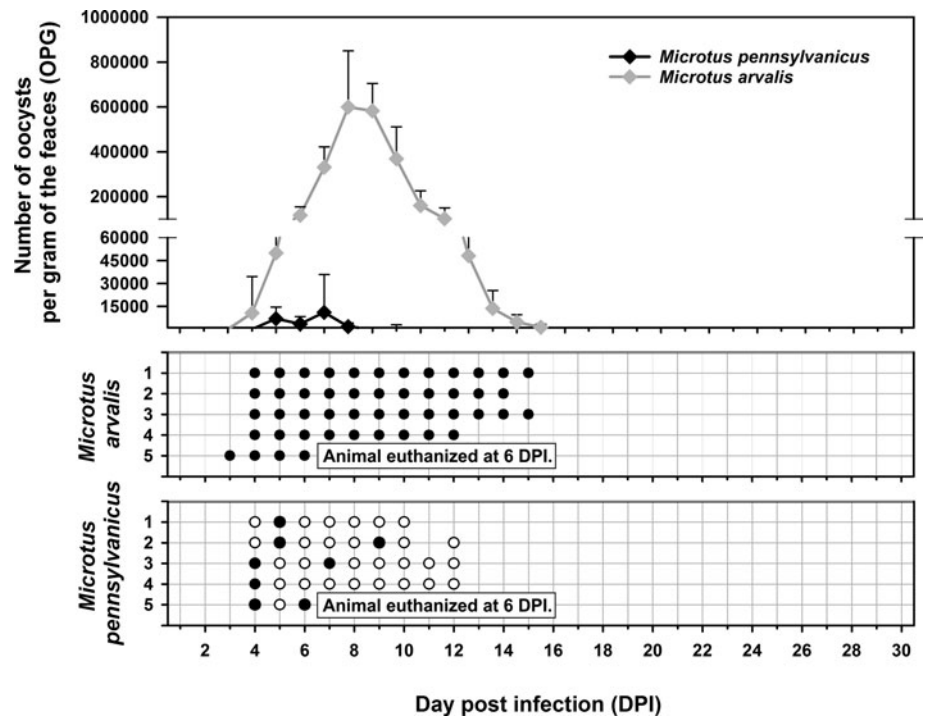


Fig. 3. Course of infection of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. in experimentally infected common voles (*Microtus arvalis*) and in meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) based on coprological and molecular examination of feces. Any circles indicate detection of specific DNA, black circle indicates microscopic detection of oocysts.

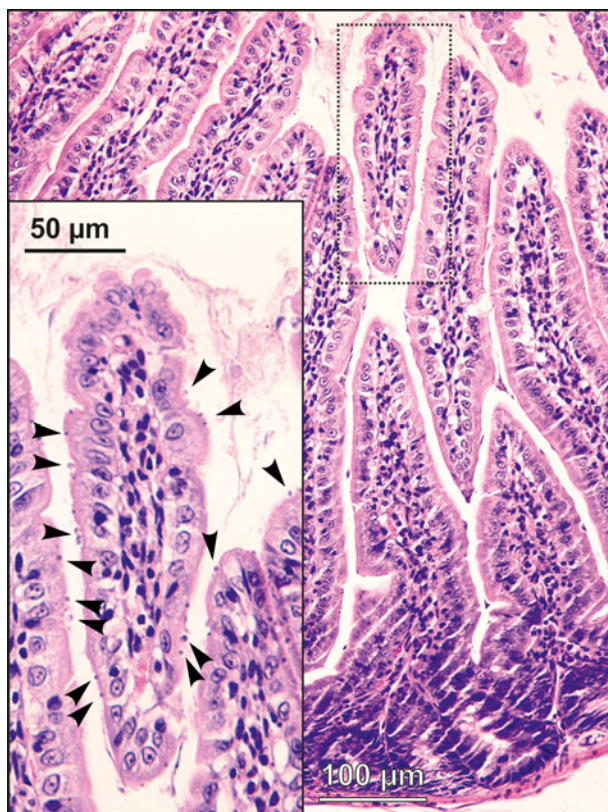


Fig. 4. Developmental stages (arrowheads) of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. in mucosal glandular epithelium from the duodenum of an experimentally infected common vole (*Microtus arvalis*). Bar included in each picture.

antibodies (*Cryptosporidium* IF Test, Crypto Cell, Medac, Wedel, Germany). Morphometry of oocysts was determined using digital analysis of images (M.I.C. Quick Photo Pro v.3.1 software; Promicra, s.r.o., Praha, Czech Republic) collected using an Olympus Digital Colour Camera DP73. Length and width of 50 oocysts of each isolate were measured under DIC at 1000×

magnification and the ratio of the length/width of each oocyst was calculated. The mean and standard deviation (s.d.) of length, width and ratio of the length/width of oocysts of each isolate were calculated.

Animal care

Animal caretakers wore disposable coveralls, shoe covers and gloves whenever entering the rooms where animals were housed. All wood-chip bedding, feces and disposable protective clothing were sealed in plastic bags, removed from the buildings and incinerated at the end of the study.

Statistical analysis

Prevalence was calculated by dividing the number of positive individuals by the total number of individuals sampled. Differences in *Cryptosporidium* prevalence were determined by χ^2 analysis using a 5% significance level. The hypothesis tested in the analysis of oocyst morphometry was that two-dimensional mean vectors of measurement are the same in the two populations being compared. Hotelling's T2 test was used to test the null hypothesis. Analyses were performed using program Epi Info (TM) 7.1.1.14 (Centers for Disease Control and Prevention, GA, USA) and R 3.5.0. (<https://www.r-project.org/>).

Results

Prevalence and infection intensity of *Cryptosporidium*

Out of 328 fecal samples from wild-caught common voles, 19 (5.8%) were microscopically positive for the presence of oocysts of *Cryptosporidium* sp. and 74 (22.6%) were positive for the presence of specific DNA of *Cryptosporidium* spp. (Table 1). All microscopically positive samples were also positive using PCR. Positive voles were trapped at 11 out of 16 localities (Table 2). There was no difference ($\chi^2 = 0.0153$; D.F. = 1; $P = 0.9016$) in the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in males (22.0%; 41/186) and females (23.2%; 33/142). Similarly, the prevalence did not

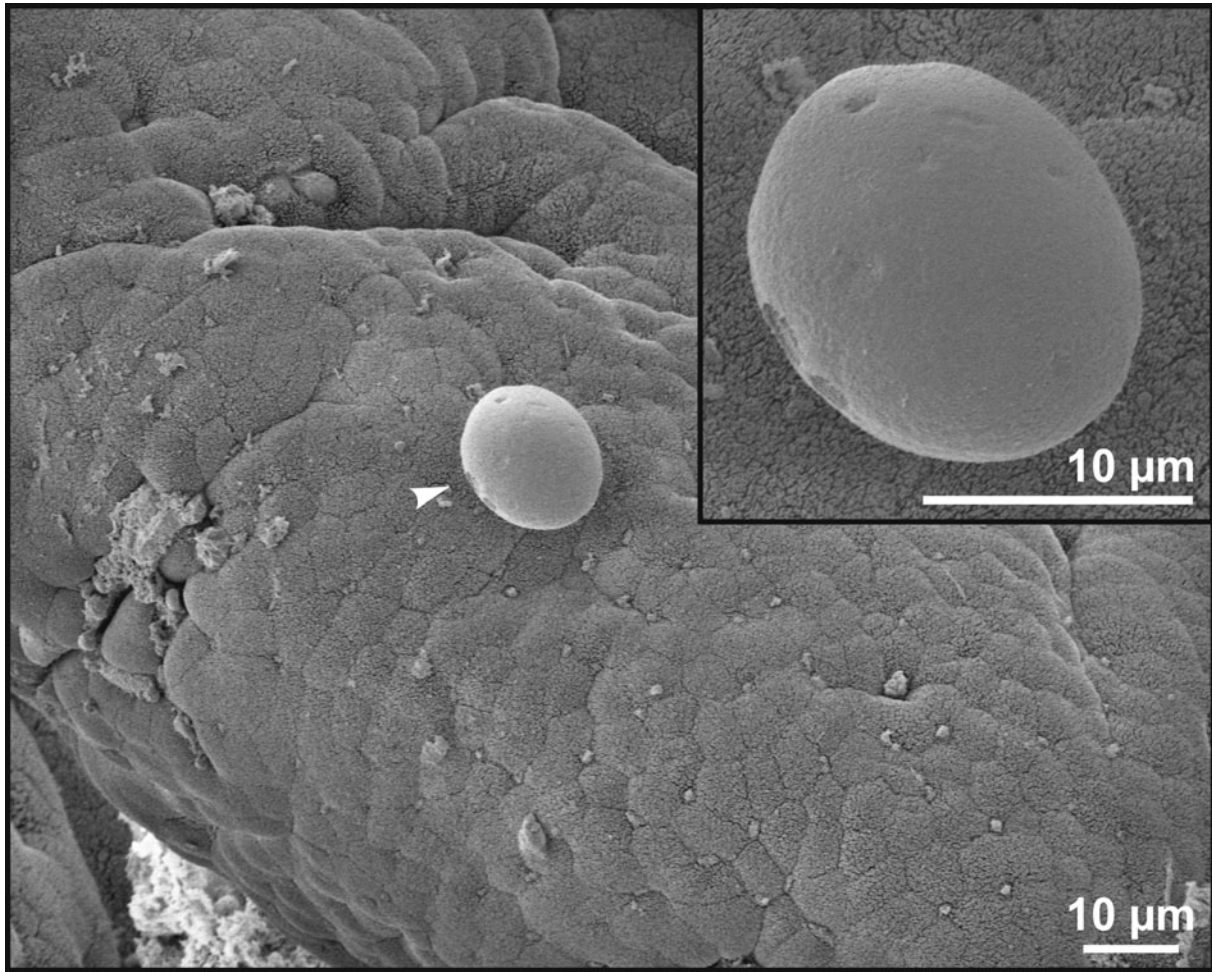


Fig. 5. Scanning electron photomicrograph of the jejunal epithelium of an experimentally infected common vole (*Microtus arvalis*). Attached developmental stage of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. (arrowhead; detail in the upper right corner).

differ ($\chi^2 = 0.3254$; D.F. = 1; $P = 0.5684$) between juvenile (25.7%; 19/74) and adult voles (21.7%; 55/254; Table 2). Infection intensity, which ranged from 4000 to 42 000 OPG, did not differ ($P = 0.1773$) between males (2000–36 000 with mean 15 000 OPG) and females (4000–42 000 with mean 20 000 OPG). None of the trapped voles had diarrhoea.

Out of 74 voles positive for *Cryptosporidium*, 74, 71, 33 and 14 were genotyped by sequence analysis of SSU, actin, COWP and HSP70 genes, respectively (Table 2, Fig. 2 and online Supplementary Figs S1–S4). The remaining positive samples yielded sequences of insufficient quality to include in analyses (three actin sequences) or failed to amplify at COWP ($n = 41$) and HSP70 ($n = 60$) loci.

Sequence analysis revealed the presence of eight genotypes of *Cryptosporidium*, of which two are described here as new species (Table 2). ML trees inferred from sequences of SSU, actin, COWP and HSP70 genes individually or SSU, actin and COWP in concatenation formed three major phylogenetic groups (Fig. 2 and online Supplementary Figs S1–S4). Group 1 included *C. microti* sp. n. and *Cryptosporidium* vole genotypes II, III, VI and VII. *Cryptosporidium microti* ($n = 47$) was identical to *Cryptosporidium* sp. isolate 19608-Miar-EU previously recovered from a wild-caught common vole in the Czech Republic [Acc. No. KY657290] and was closely related to *Cryptosporidium* muskrat genotype II [Acc. No. AY737571], *Cryptosporidium* sp. isolate 1857-Mipe-NA from a wild-caught meadow vole [Acc. No. KY644574] and *Cryptosporidium* sp. isolate 1544-Pero-NA from a wild-caught *Peromyscus* mouse [Acc. No. KY644565] in the USA, sharing 99.2%, 98.8% and 98.6% sequence identity, respectively.

Cryptosporidium vole genotype III ($n = 1$) was identical to *Cryptosporidium* sp. isolate 20062-Miar-EU from a wild-caught common vole in the Czech Republic (Acc. No. KY644593) and clustered with *Cryptosporidium* sp. isolate 10482-Mygl-EU from a wild-caught bank vole (Acc. No. KY644595) and *Cryptosporidium* sp. isolate 2035-Myga-NA from a wild-caught Southern red-backed vole (Acc. No. KY644592) in Slovakia and the USA, respectively, sharing 99.8 and 99.5% sequence identity.

Cryptosporidium vole genotype VI ($n = 5$) was identical to *Cryptosporidium* sp. isolate 24129-Miar-EU from a wild-caught common vole in the Czech Republic (Acc. No. KY644632) and clustered with *Cryptosporidium* vole genotype II ($n = 1$) from the present study (Acc. No. MH145334), sharing 99.1% sequence identity. *Cryptosporidium* vole genotype VII ($n = 5$), a genotype that was first identified in this study, clustered with the *Cryptosporidium* vole genotype (Acc. No. EF641020) and *Cryptosporidium* sp. isolate 1947-Mipe-NA (Acc. No. KY644626), both from wild-caught meadow voles in the USA, sharing 98.9 and 98.5% sequence identity, respectively. *C. alticolis* sp. n. ($n = 7$), the only member of group 2, was identical to *Cryptosporidium* sp. isolate 20065-Miar-EU from a wild-caught common vole in the Czech Republic (Acc. No. KY644657), and clustered with *Cryptosporidium* sp. isolate 2333-Pero-NA from a wild-caught meadow vole in the USA (Acc. No. KY644655) and *Cryptosporidium* sp. isolate Mrb001 from a grey red-backed vole in Japan (Acc. No. AB477098), sharing 97.3 and 97.5% sequence identity, respectively.

Group 3 comprised *Cryptosporidium* vole genotype IV ($n = 3$) and vole genotype V ($n = 5$). *Cryptosporidium* vole genotype V was

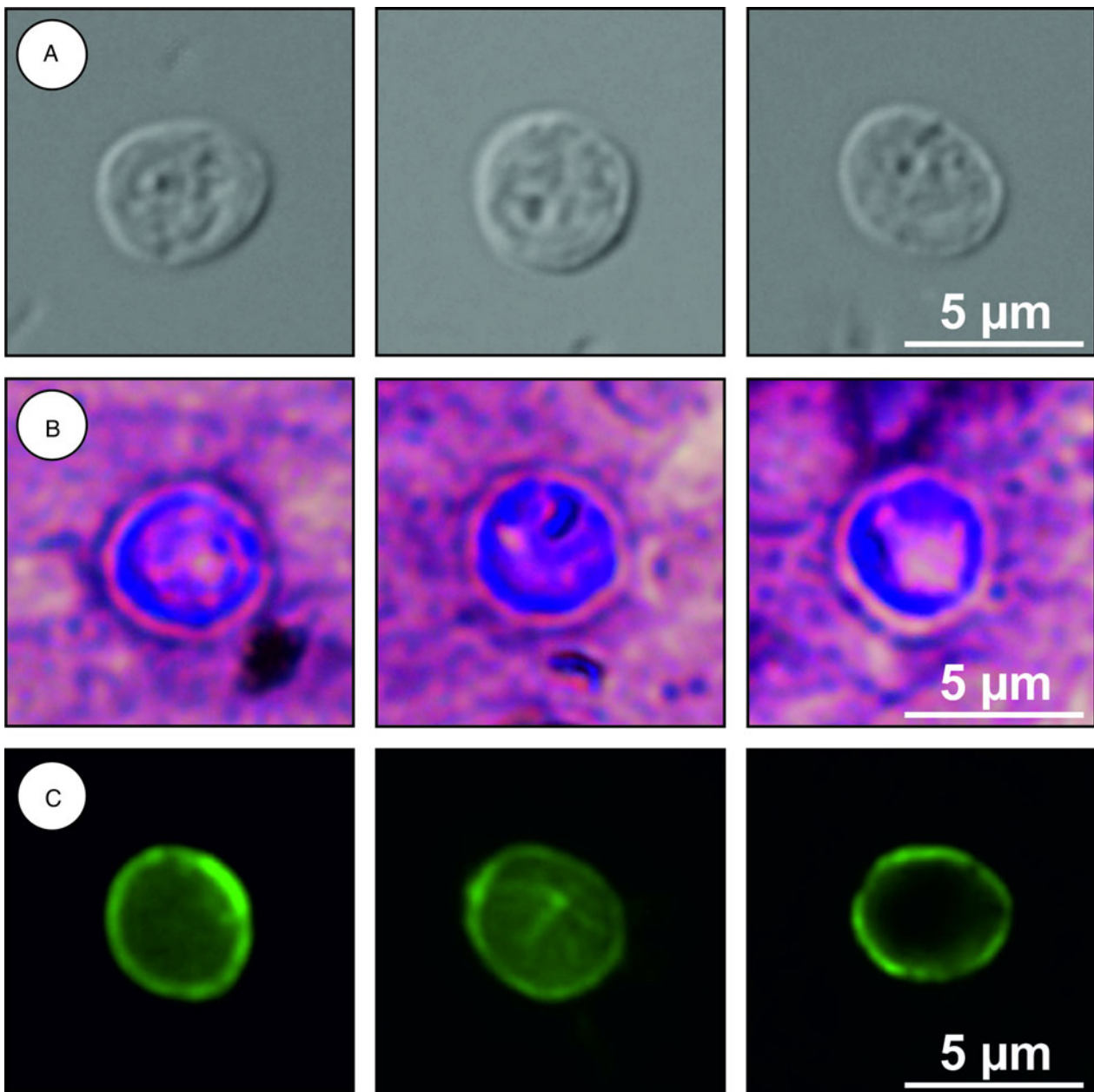


Fig. 6. *Cryptosporidium alticolis* sp. n. oocysts visualized in various preparations: (A) differential interference contrast microscopy and stained by (B) aniline-carbol-methyl violet and (C) anti-*Cryptosporidium* FITC-conjugated antibody. Bar included in each picture.

identical to *Cryptosporidium* sp. isolate 24916-Miar-EU from a wild-caught common vole in the Czech Republic (Acc. No. KY644670) and formed a sister group with muskrat genotype I (Acc. No. EF641013) and *Cryptosporidium* sp. isolate 1962-Mipe-NA from a wild-caught meadow vole (Acc. No. KY644685), both in the USA, sharing 98.1 and 98.0% sequence identity, respectively. *Cryptosporidium* vole genotype IV, which was reported for the first time in this study, clustered outside of this group.

Based on evidence that they are genetically and biologically distinct from known *Cryptosporidium* species, we describe *C. alticolis* sp. n. and *C. microti* sp. n. as new species of the genus *Cryptosporidium*. Descriptions of *C. alticolis* sp. n. and *C. microti* sp. n. follow.

***Cryptosporidium alticolis* sp. n.**

Prevalence and infection intensity. Seven voles (2.1%) from three localities had DNA of *C. alticolis* sp. n. detectable by PCR, of

which three had oocysts that were detectable by microscopy with an infection intensity of 2000–8000 OPG (Table 2).

Experimental transmission. Oocysts of *C. alticolis* sp. n. from naturally infected common voles were infectious for common and meadow voles, but not for yellow-necked mice, SCID mice, BALB/c mice, C57BL/6J mice, brown rats or chickens. The prepatent period of *C. alticolis* sp. n. in common and meadow voles was 3–4 DPI (Fig. 3). Whereas common voles shed oocysts of *C. alticolis* sp. n. continuously during the patent period (12–15 DPI), meadow voles shed oocysts sporadically up to 12 DPI (Fig. 3). The infection intensity of *C. alticolis* sp. n. in common voles (2000–1000 000 OPG) was higher than in meadow voles (2000–50 000 OPG). No macroscopical changes were observed in the gastrointestinal tract of common or meadow voles infected with *C. alticolis* sp. n. and the surface epithelium remained intact. DNA of *C. alticolis* sp. n. was detected throughout the small and large intestine of common and meadow voles; however, endogenous developmental stages were detected only in the jejunum and ileum by histology

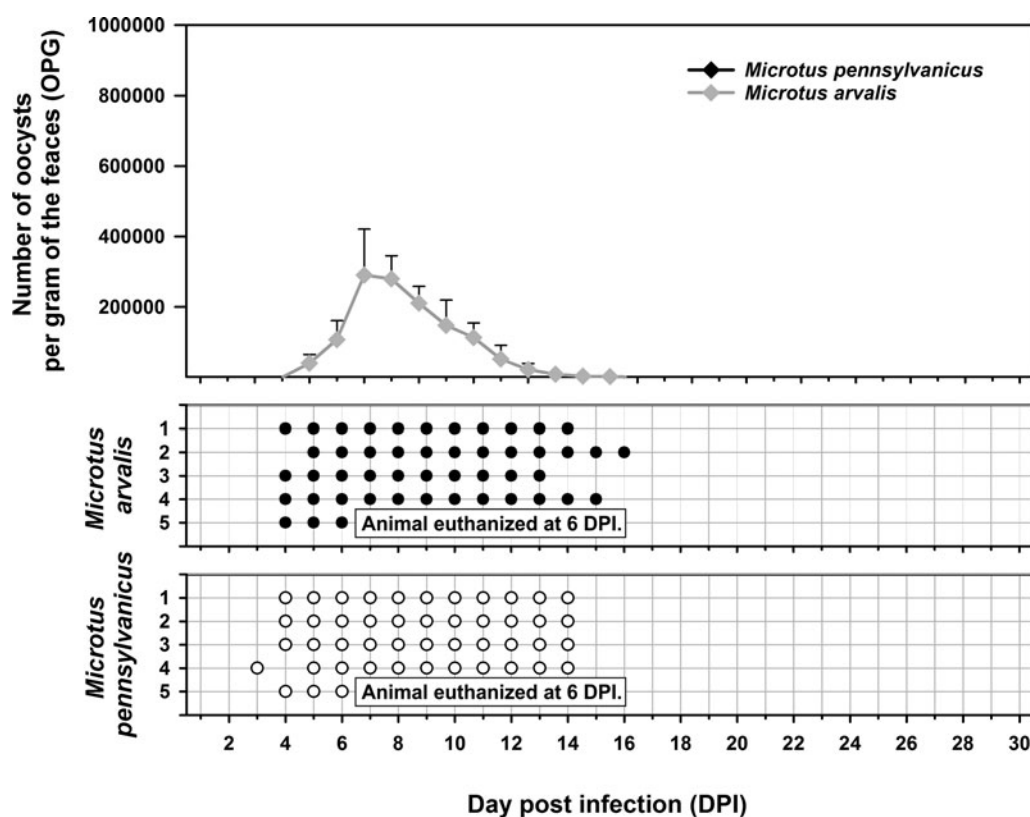


Fig. 7. Course of infection of *Cryptosporidium microti* sp. n. in experimentally infected common voles (*Microtus arvalis*) and in meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) based on coprological and molecular examination of feces. Any circles indicate detection of specific DNA, black circle indicates microscopic detection of oocysts.

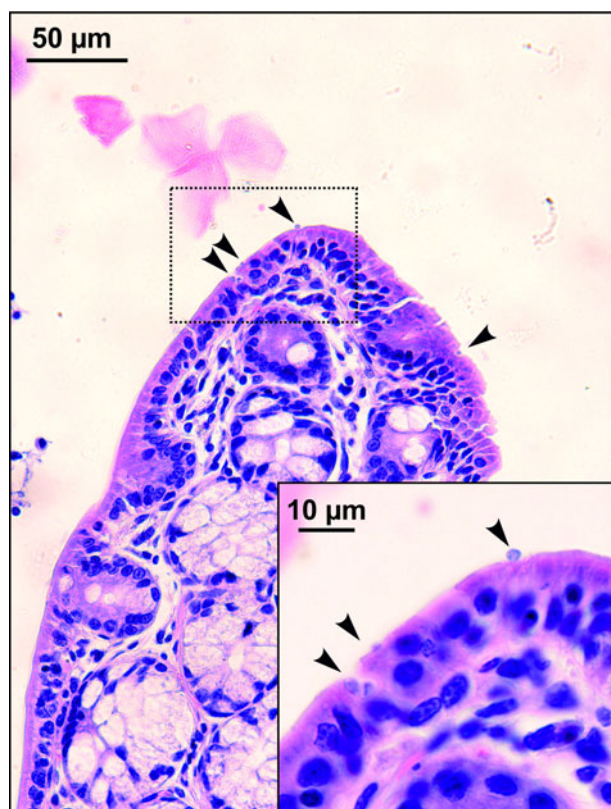


Fig. 8. Developmental stages (arrowheads) of *Cryptosporidium microti* sp. n. in mucosal glandular epithelium from the colon of an experimentally infected common vole (*Microtus arvalis*). Bar included in each picture.

and electron microscopy (Figs 4 and 5). *Cryptosporidium alticolis* sp. n. was not detected in the stomach and other organs (liver, pancreas, kidneys, lungs and spleen). None of the experimentally infected common or meadow voles were diarrhoeic. The lamina propria in the jejunum and ileum was slightly oedematous with occasional dilatation of lymphatic vessels (data not shown). Sequences of SSU, actin, COWP and HSP70 genes from experimentally infected hosts shared 100% identity with the isolate used in the inoculum.

Taxonomic summary

ZooBank number for species: urn:lsid:zoobank.org:act:D12C78AA-222E-4E07-A7CE-51AA6A747BC6

Description: Oocysts are shed fully sporulated with four sporozoites and an oocyst residuum. Sporulated oocysts ($n = 50$) measure $4.9\text{--}5.7\ \mu\text{m}$ (mean \pm s.d. = $5.4 \pm 0.2\ \mu\text{m}$) \times $4.6\text{--}5.2\ \mu\text{m}$ (mean \pm s.d. = $4.9 \pm 0.2\ \mu\text{m}$) with a length/width ratio of 1.00–1.20 (mean \pm s.d. = 1.10 ± 0.05) (Fig. 6). Morphology and morphometry of other developmental stages are unknown.

Type host: common vole (*M. arvalis*)

Type locality: Dačice (Czech Republic)

Other localities: Masákova Lhota and Všečov (Czech Republic)

Site of infection: jejunum and ileum (Figs 4 and 5)

Distribution: Czech Republic

Type material/hapanotype: Tissue samples in 10% formaldehyde and histological sections of infected jejunum (nos. 174/2016, 175/2016, 176/2016 and 177/2016) and ileum (nos. 178/2016 and 179/2016); genomic DNA isolated from fecal samples of naturally (isolation no. 23111) and experimentally (isolation no. 27124) infected *M. arvalis*; genomic DNA isolated from jejunal and ileal tissue of experimentally infected *M. arvalis* (isolation nos. 27035 and 27037, respectively); digital photomicrographs

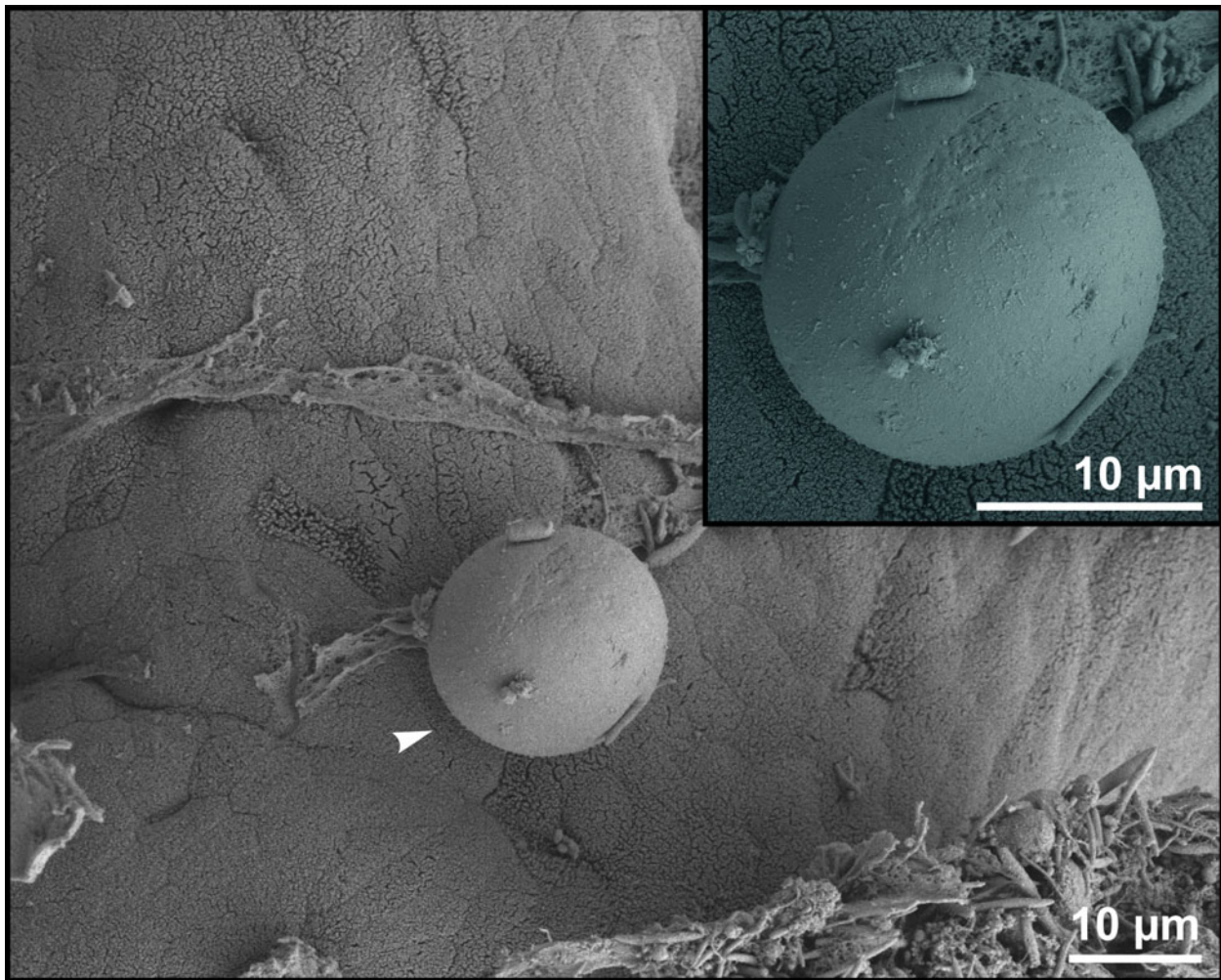


Fig. 9. Scanning electron photomicrograph of the colon epithelium of a common vole (*Microtus arvalis*). Attached developmental stage of *Cryptosporidium microti* sp. n. (arrowhead; detail in the upper right corner).

(nos. DIC 1-13/23111, MV 1-11/23111, IF 1-9/23111, HI 1-3/27124 and SEM 1-3/27124) and fecal smear slides with oocysts stained by ACMV staining from experimentally infected *M. arvalis* (nos. 27124/3, 27124/4, 27124/5 and 27124/6). Specimens deposited at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Czech Republic.

Reference sequences: Partial sequences of SSU, actin, COWP and HSP70 genes were deposited at GenBank under Acc. Nos. MH145330, MH145310, MH145318 and MH145324, respectively.

Etymology: The species name *alticolis* is derived from the Latin noun 'alticola' (meaning a vole).

Differential diagnosis: Oocysts of *C. alticolis* are larger than those of *C. microti* ($P=0.001$), have similar ACMV staining to other species of *Cryptosporidium* and cross-react with antibodies developed primarily for *C. parvum* (Fig. 6). It can be differentiated genetically from other *Cryptosporidium* spp. based on sequences of SSU, actin, COWP and HSP70 genes. Endogenous development of *C. alticolis* sp. n. takes place in the small intestine, whereas *C. microti* develops in the large intestine.

Cryptosporidium microti sp. n.

Prevalence. Forty-seven wild-caught common voles (14.3%) from nine localities were positive for *C. microti* sp. n. by PCR, of which 12 had oocysts detectable by microscopy. The infection intensity ranged from 4000 to 42 000 OPG.

Experimental transmission. Oocysts of *C. microti* sp. n. from naturally infected common voles were infectious for common and meadow voles, but not for yellow-necked mice, SCID mice, BALB/c mice, C57BL/6J mice, brown rats or chickens. Common voles shed *C. microti* sp. n. from 4 to 16 DPI, with oocysts detectable by microscopy throughout this period. The infection intensity ranged from 2000 to 430 000 OPG with maximum shedding at 6–7 DPI (Fig. 7). In meadow voles, DNA of *C. microti* sp. n. was detected from 4 to 14 DPI; however, oocysts were not detectable by microscopy at any time during the patent period.

Sequences of SSU, actin, COWP and HSP70 genes from experimentally infected hosts shared 100% identity with the isolate used in the inoculum. Specific DNA of *C. microti* sp. n. was found exclusively in the caecum and colon of common and meadow voles. Endogenous developmental stages were detected in the caecum and colon of the common vole (Figs 8 and 9), but were not detected in the meadow vole. Infections were not associated with macroscopical or pathological changes in the digestive tract of common or meadow voles and these animals showed no signs of diarrhoea.

Taxonomic summary

ZooBank number for species: urn:lsid:zoobank.org:act:4FD6136C-3932-4881-BE49-4714A5AB488A

Description: Oocysts are shed fully sporulated with four sporozoites and an oocyst residuum. Sporulated oocysts ($n=50$)

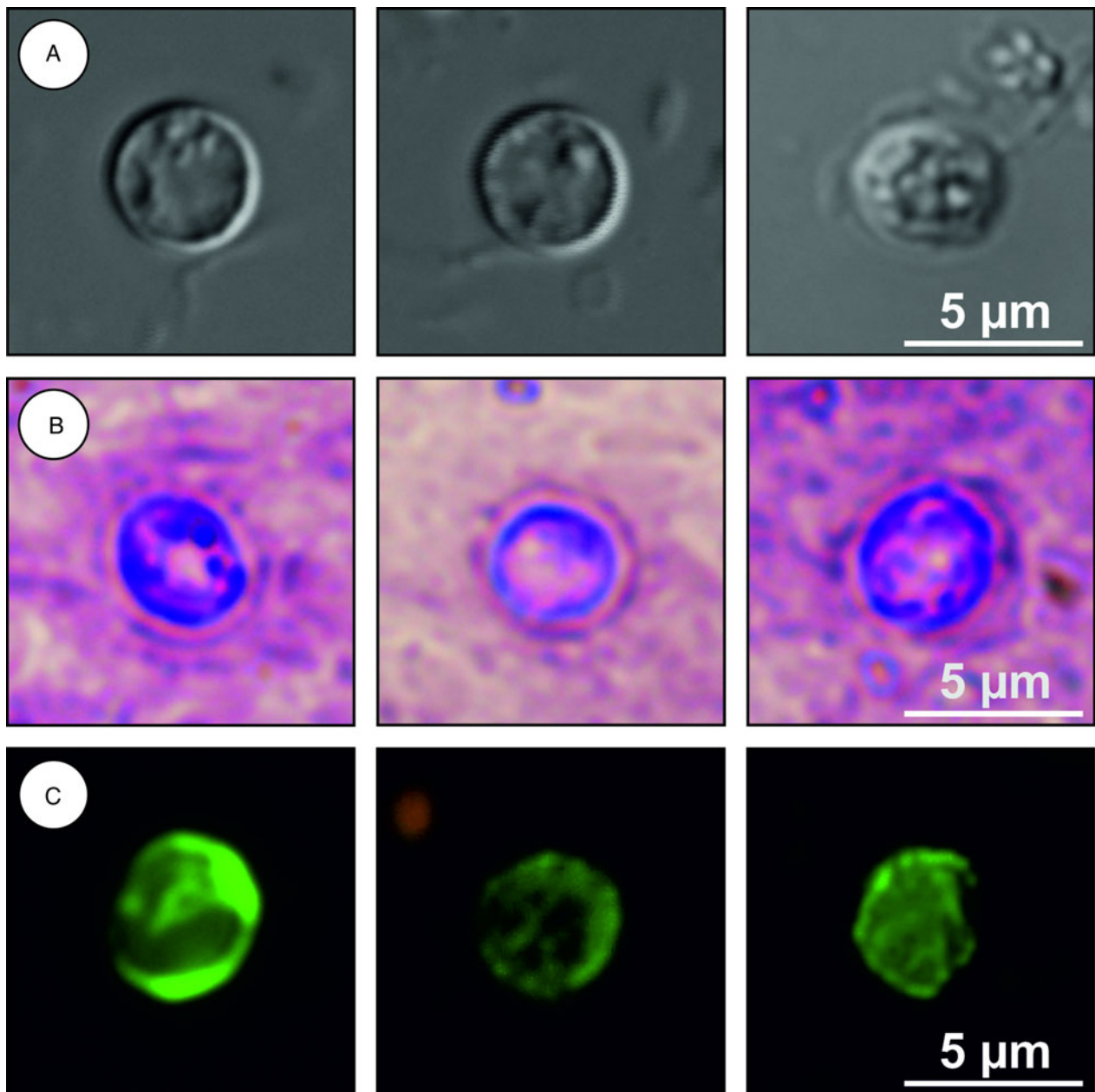


Fig. 10. *Cryptosporidium microti* sp. n. oocysts visualized in various preparations: (A) differential interference contrast microscopy and stained by (B) aniline-carbol-methyl violet and (C) anti-*Cryptosporidium* FITC-conjugated antibody. Bar included in each picture.

measure $3.9\text{--}4.7\ \mu\text{m}$ (mean \pm s.d. = $4.3 \pm 0.1\ \mu\text{m}$) \times $3.8\text{--}4.4\ \mu\text{m}$ (mean \pm s.d. = $4.1 \pm 0.1\ \mu\text{m}$) with length/width ratio of 1.00–1.06 (mean \pm s.d. = 1.03 ± 0.02) (Fig. 10). Morphology and morphometry of other developmental stages are unknown.

Type host: common vole (*M. arvalis*)

Type locality: Radimovice (Czech Republic)

Other localities: Dačice, Zňátky, Sedlečko, Dolní Třebonín, Pelejovice, Masáková Lhota, Všečov and Opatovice (Czech Republic)

Site of infection: caecum and colon (Figs 8 and 9)

Distribution: Czech Republic

Type material/hapantype: Tissue samples in 10% formaldehyde and histological sections of infected caecum (nos. 97/2016 and 98/2016) and colon (nos. 99/2016 and 100/2016), genomic DNA isolated from fecal samples of naturally (isolation no. 24923) and experimentally (isolation no. 28063) infected *M. arvalis*; genomic DNA isolated from ceecal and colonic tissue of experimentally infected *M. arvalis* (isolation nos. 29751 and

29753, respectively); digital photomicrographs (nos. DIC 1-11/24923, MV 1-9/24923, IF 1-9/24923, HI 1-3/28063 and SEM 1-3/28063) and fecal smear slides with oocysts stained by ACMV staining from experimentally infected *M. arvalis* (nos. 28063/3, 28063/4, 28063/5 and 28063/6). Specimens deposited at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Czech Republic.

Reference sequences: Partial sequences of SSU, actin, COWP and HSP70 genes were deposited at GenBank under Acc. Nos. MH145328, MH145308, MH145316 and MH145323, respectively.

Etymology: The species name *microti* is derived from the Latin noun 'microtus' (meaning a vole).

Differential diagnosis: Oocysts of *C. microti* sp. n. are smaller than those of *C. alticolis* sp. n. ($P = 0.001$), have similar ACMV staining to other species of *Cryptosporidium* and cross-react with antibodies developed primarily for *C. parvum* (Fig. 10). It can be differentiated genetically from other *Cryptosporidium* spp. based on sequences of SSU, actin, COWP and HSP70 genes. Endogenous

development of *C. microti* sp. n. takes place in the large intestine, whereas *C. alticolis* sp. n. develops in the small intestine.

Discussion

This and other genotyping studies have shown that voles host several *Cryptosporidium* species and genotypes that appear to be host specific and not infectious for humans, but they rarely host *C. parvum* (Feng *et al.*, 2007; Stenger *et al.*, 2018; Ziegler *et al.*, 2007a, 2007b). The finding that oocysts of *C. alticolis* sp. n. and *C. microti* sp. n. are indistinguishable from oocysts of *C. parvum* suggests that earlier detections of *C. parvum*, which were not supported by genotyping data, were misidentifications. Oocyst size is generally only useful for differentiating intestinal (smaller and rounder) and gastric (larger and more oval) species of *Cryptosporidium* (Ryan and Xiao, 2014).

Cryptosporidium microti sp. n. and *Cryptosporidium* vole genotypes II, III, VI and VII clustered as part of a large heterogeneous group in ML trees. This is generally consistent with the report by Stenger *et al.* (2018) that *Cryptosporidium* genotypes from voles in the Europe and North America formed between three and four phylogenetic groups in ML trees.

Cryptosporidium alticolis sp. n. and *C. microti* sp. n. are genetically distinct from other known species of *Cryptosporidium*. *Cryptosporidium alticolis* sp. n. shares 95.2, 94.7 and 94.3% sequence identity, respectively, with *C. canis*, *C. suis* and *C. parvum* at the SSU locus; 87.9, 90.5 and 89.7%, respectively, at the actin locus; and 84.5, 91.2 and 90.5%, respectively, at the HSP70 locus. At the COWP locus, *C. alticolis* sp. n. shared 88.1 and 89.9% sequence identity, respectively, with *C. canis* and *C. parvum*. *Cryptosporidium microti* sp. n. shared 95.5, 98.8 and 96.4% sequence identity, respectively, with *C. canis*, *C. suis* and *C. parvum* at the SSU locus; 85.6, 91.6 and 90.5%, respectively, at the actin locus; and 84.2, 93.1 and 92.6%, respectively, at the HSP70 locus. At the COWP locus, *C. microti* sp. n. shared 86.7 and 91.5% sequence identity, respectively, with *C. canis* and *C. parvum*. In comparison, *C. hominis* and *C. parvum* share 98–99% identity and *C. muris* and *C. andersoni* share 96–99% identity at these loci.

The prevalence of *Cryptosporidium* in voles ranges from 1 to 100% (Laakkonen *et al.*, 1994; Perz and Le Blancq, 2001; Bajer *et al.*, 2002, 2003; Zhou *et al.*, 2004). The prevalence in wild-caught common voles in the present study (23%) was greater than the 14% reported by Stenger *et al.* (2018) using similar detection methods, and much lower than the 62–73% reported by Bajer *et al.* (2002) and Bajer (2008) using microscopic detection, a method that is less sensitive than PCR. The prevalence of *Cryptosporidium* can be affected by factors such as age, season, population density, location, weather and climate, diet and water consumption (Nichols *et al.*, 2014).

Cryptosporidium microti sp. n. dominated at most locations in this study. Mixed infections were not detected, but they cannot be ruled out because the methods used were not effective at detecting multi-species infections. Microscopy cannot differentiate among species with similar sized oocysts and PCR preferentially amplifies DNA from the dominant species/genotype (Santín and Zarlenga, 2009; Jeníková *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2015).

Cryptosporidium alticolis sp. n. infects the small intestine, which is similar to most intestinal *Cryptosporidium* spp. of mammals (Ryan and Xiao, 2014). In contrast, *C. microti* is only the third species, after *C. suis* in pigs and *C. oculutus* in rats, reported to infect the colon (Ryan *et al.*, 2004; Vítovec *et al.*, 2006; Kváč *et al.*, 2018). Similar to *C. oculutus* (Kváč *et al.*, 2018), *C. microti* sp. n. localizes to the mucosal surface in the large intestine. In contrast, *C. suis* predominates in the glandular epithelium of

the submucosal colonic lymphoglandular complexes in pigs (Vítovec *et al.*, 2006).

Neither *C. alticolis* sp. n. nor *C. microti* sp. n. developed clinical signs in common voles or meadow voles under experimental conditions in the present study. This is consistent with the reports that wild animals rarely display signs of clinical cryptosporidiosis (Sturdee *et al.*, 1999; Hikosaka and Nakai, 2005; Castro-Hermida *et al.*, 2011; Nêmejc *et al.*, 2012; Čondlová *et al.*, 2018).

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0031182018001142>

Financial support. This study was funded by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LTAUSA17165), the US National Institute of Allergy and Infectious Diseases (1R15AI122152-01A1), Grant Agency of University of South Bohemia (098/2016/Z and 002/2016/Z) and supported by MEYS CR (LM2015062 Czech-BioImaging). We thank Annaliese Beery, Jennifer Christensen, Nancy Owen and Karen Swiecanski of Smith College for providing meadow voles and for assistance with transporting voles to North Dakota State University for the study.

Conflicts of interest. None.

Ethical standards. The research was conducted under ethical protocols approved by the Institute of Parasitology, Biology Centre and Central Commission for Animal Welfare, Czech Republic (protocol nos. 071/2010 and 114/2013) and Institutional Animal Care and Use Committee North Dakota State University, ND, USA (protocol no. A18014).

References

- Arrowood MJ and Donaldson K (1996) Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and caesium chloride gradients. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **43**, 895.
- Bajer A (2008) *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. *Parasitology Research* **104**, 1–17.
- Bajer A, Bednarska M, Pawelczyk A, Behnke JM, Gilbert FS and Sinski E (2002) Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology* **125**, 21–34.
- Bajer A, Caccio S, Bednarska M, Behnke JM, Pieniazek NJ and Sinski E (2003) Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *Journal of Parasitology* **89**, 1053–1055.
- Baneth G, Thamsborg SM, Otranto D, Guillot J, Blaga R, Deplazes P and Solano-Gallego L (2016) Major parasitic zoonoses associated with dogs and cats in Europe. *Journal of Comparative Pathology* **155**, S54–S74.
- Bednarska M, Bajer A, Sinski E, Girouard AS, Tamang L and Graczyk TK (2007) Fluorescent *in situ* hybridization as a tool to retrospectively identify *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in samples from terrestrial mammalian wildlife. *Parasitology Research* **100**, 455–460.
- Bull SA, Chalmers RM, Sturdee AP and Healing TD (1998) A survey of *Cryptosporidium* species in Skomer bank voles (*Clethrionomys glareolus skomerensis*). *Journal of Zoology* **244**, 119–122.
- Castro-Hermida JA, García-Preseido I, González-Warleta M and Mezo M (2011) Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain). *Veterinary Parasitology* **179**, 216–219.
- Chalmers RM, Sturdee AP, Bull SA, Miller A and Wright SE (1997) The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitology Research* **83**, 478–482.
- Checkley W, White Jr AC, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen XM, Fayer R, Griffiths JK, Guerrant RL, Hedstrom L, Huston CD, Kotloff KL, Kang G, Mead JR, Miller M, Petri Jr WA, Priest JW, Roos DS, Striepen B, Thompson RC, Ward HD, Van Voorhis WA, Xiao L, Zhu G and Houpt ER (2015) A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. *The Lancet Infectious Diseases* **15**, 85–94.

- Čondlová S, Horčíčková M, Sak B, Květoňová D, Hlásková L, Konečný R, Stanko M, McEvoy J and Kváč M (2018) *Cryptosporidium apodemii* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. *European Journal of Protistology* **63**, 1–12.
- Danišová O, Valenčáková A, Stanko M, Luptaková L, Hatalová E and Canady A (2017) Rodents as a reservoir of infection caused by multiple zoonotic species/genotypes of *C. parvum*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. scrofarum*, and the first evidence of *C. muskrat* genotypes I and II of rodents in Europe. *Acta Tropica* **172**, 29–35.
- Fayer R (2010) Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology* **124**, 90–97.
- Feng Y (2010) *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Experimental Parasitology* **124**, 128–137.
- Feng Y, Alderisio KA, Yang W, Blancero LA, Kuhne WG, Nadareski CA, Reid M and Xiao L (2007) *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6475–6483.
- Foo C, Farrell J, Boxell A, Robertson I and Ryan UM (2007) Novel *Cryptosporidium* genotype in wild Australian mice (*Mus domesticus*). *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 7693–7696.
- Guindon S and Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696–704.
- Hajdušek O, Ditrich O and Šlapeta J (2004) Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* **122**, 183–192.
- Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.
- Hikosaka K and Nakai Y (2005) A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Parasitology Research* **97**, 373–379.
- Jeniková M, Němejc K, Sak B, Květoňová D and Kváč M (2011) New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. *Veterinary Parasitology* **176**, 120–125.
- Jiang J, Alderisio KA and 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.
- Jirků M, Valigurová A, Koudela B, Křížek J, Modrý D and Šlapeta J (2008) New species of *Cryptosporidium tyzzeri*, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica (Praha)* **55**, 81–94.
- Kváč M, Ondráčková Z, Květoňová D, Sak B and Vítovec J (2007) Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology* **143**, 229–233.
- Kváč M, Hofmannová L, Bertolino S, Wauters L, Tosi G and Modrý D (2008) Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitologica* **55**, 95–99.
- Kváč M, McEvoy J, Loudová M, Stenger B, Sak B, Květoňová D, Ditrich O, Rašková V, Moriarty E, Rost M, Macholán M and Piálek J (2013) Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *International Journal for Parasitology* **43**, 805–817.
- Kváč M, McEvoy J, Stenger B and Clark M (2014) Cryptosporidiosis in other vertebrates. In Cacciò SM and Widmer G (eds), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Wien: Springer, pp. 237–326.
- Kváč M, Vlnatá G, Ježková J, Horčíčková M, Konečný R, Hlásková L, McEvoy J and Sak B (2018) *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *European Journal of Protistology* **63**, 96–104.
- Laakkonen J, Soveri T and Henttonen H (1994) Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in peak density *Microtus agrestis*, *Microtus oeconomus* and *Clethrionomys glareolus* populations. *Journal of Wildlife Diseases* **30**, 110–111.
- Li N, Xiao L, Alderisio K, Elwin K, Cebelski 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 and Feng Y (2014) Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases* **20**, 217–224.
- Lv C, Zhang L, Wang R, Jian F, Zhang S, Ning C, Wang H, Feng C, Wang X, Ren X, Qi M and Xiao L (2009) *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in China: prevalence and molecular characterization. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 7692–7699.
- Ma JB, Cai JZ, Ma JW, Feng YY and Xiao LH (2014) Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in yaks (*Bos grunniens*) in China. *Veterinary Parasitology* **202**, 113–118.
- Miláček P and Vítovec J (1985) Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica* **32**, 50.
- Modrý D, Hofmannová L, Antalová Z, Sak B and Kváč M (2012) Variability in susceptibility of voles (Arvicolinae) to experimental infection with *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *Parasitology Research* **111**, 471–473.
- Němejc K, Sak B, Květoňová D, Hanzal V, Jeniková M and Kváč M (2012) The first report on *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) (Czech Republic). *Veterinary Parasitology* **184**, 122–125.
- Ng-Hublin JS, Singleton GR and 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.
- Nichols GL, Chalmers RM and Hadfield SJ (2014) Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. In Cacciò SM and Widmer G (eds), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Wien: Springer, pp. 237–326.
- Perec-Matysiak A, Bunkowska-Gawlik K, Zalesny G and Hildebrand J (2015) Small rodents as reservoirs of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in south-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **22**, 1–5.
- Perz JF and Le Blancq SM (2001) *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1154–1162.
- Qi M, Wang H, Jing B, Wang D, Wang R and Zhang L (2015) Occurrence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Xinjiang, Northwestern China. *Veterinary Parasitology* **212**, 404–407.
- Rašková V, Květoňová D, Sak B, McEvoy J, Edwinston A, Stenger B and Kváč M (2013) Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *Journal of Clinical Microbiology* **51**, 360–362.
- Ryan U and Xiao L (2014). Taxonomy and molecular taxonomy. In Cacciò SM and Widmer G (eds), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Wien: Springer, pp. 3–42.
- Ryan UM, Monis P, Enemark HL, Sulaiman I, Samarasinghe B, Read C, Buddle R, Robertson I, Zhou L, Thompson RCA and Xiao L (2004) *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology* **90**, 769–773.
- Santín M and Zarlenga DS (2009) A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish *Cryptosporidium* species of veterinary and public health concern in cattle. *Veterinary Parasitology* **166**, 32–37.
- Sinski E, Hlebowicz E and Bednarska M (1993) Occurrence of *Cryptosporidium parvum* infection in wild small mammals in District of Mazury Lake (Poland). *Acta Parasitologica* **38**, 59–61.
- Sinski E, Bednarska M and Bajer A (1998) The role of wild rodents in ecology of cryptosporidiosis in Poland. *Folia Parasitologica* **45**, 173–174.
- Spano F, Putignani L, McLaughlin J, Casemore DP and Crisanti A (1997) PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiology Letters* **150**, 209–217.
- Stenger BL, Clark ME, Kváč M, Khan E, Giddings CW, Dyer NW, Schultz JL and McEvoy JM (2015a) Highly divergent 18S rRNA gene paralogs in a *Cryptosporidium* genotype from eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Infection Genetics and Evolution* **32**, 113–123.
- Stenger BL, Clark ME, Kváč M, Khan E, Giddings CW, Prediger J and McEvoy JM (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 BLS, Horčíčková M, Clark ME, Kváč M, Čondlová S, Khan E, Widmer G, Xiao L, Giddings CW, Pennil C, Stanko M, Sak B and McEvoy JM (2018) *Cryptosporidium* infecting wild cricetid rodents from the subfamilies Arvicolinae and Neotominae. *Parasitology* **145**, 326–334.
- Sturdee AP, Chalmers RM and Bull SA (1999) Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Veterinary Parasitology* **80**, 273–280.
- Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RC, Lal AA and Xiao L (2000) Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the

- 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2385–2391.
- Sulaiman IM, Lal AA and Xiao LH** (2002) Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *Journal of Parasitology* **88**, 388–394.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and Kumar S** (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729.
- Torres J, Gracenea M, Gomez MS, Arrizabalaga A and Gonzalez-Moreno O** (2000) The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Veterinary Parasitology* **92**, 253–260.
- Vítovec J, Hamadejová K, Landová L, Kváč M, Květoňová D and Sak B** (2006) Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *Journal of Veterinary Medicine B* **53**, 239–243.
- Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R and Lal AA** (1999) 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 and Upton SJ** (2004) *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* **17**, 72–97.
- Zhou L, Fayer R, Trout JM, Ryan UM, Schaefer 3rd FW and 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 PE, Wade SE, Schaaf SL, Chang YF and Mohammed HO** (2007a) *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York City watershed. *Journal of Wildlife Diseases* **43**, 586–596.
- Ziegler PE, Wade SE, Schaaf SL, Stern DA, Nadareski CA and Mohammed HO** (2007b) Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, **147**, 176–184.

9. REFERENCE

- Abubakar I., Aliyu S. H., Arumugam C., Hunter P. R., Usman N. K.** 2007. Prevention and treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised patients. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* 1: CD004932.
- Agholi M., Hatam G. R., Motazedian M. H.** 2013. HIV/AIDS-associated opportunistic protozoal diarrhea. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 29: 35-41.
- Alvarez-Pellitero P., Quiroga M. I., Sitjà-Bobadilla A., Redondo M. J., Palenzuela O., Padrós F., Vázquez S., Nieto J. M.** 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. Aquat. Organ.* 62: 133-145.
- Alvarez-Pellietro P., Sitja-Bobadilla A.** 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int. J. Parasitol.* 32: 1007-1021.
- Alves M., Xiao L., 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.
- Anderson B. C.** 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.* 24: 235-238.
- Atopkin D. M., Bogdanov A. S., Chelomina G. N.** 2007. Genetic variation and differentiation in striped field mouse *Apodemus agrarius* inferred from RAPD-PCR analysis. *Russ. J. Genet.* 43: 665-676.
- 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., Pawelczyk A., Behnke J. M., Gilbert F. S., Sinski E.** 2002. Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology.* 125: 21-34.

- Bajer A., Bednarska M., Siński E.** 2001. The ecology of *Cryptosporidium parvum* infection in small rodent populations. *Wiad. Parazytol.* 47: 747-753.
- Bajer A., Cacciò S., Bednarska M., Behnke J. M., Pieniazek N. J., Sinski E.** 2003. Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *J. Parasitol.* 89: 1053-1055.
- Baldursson S., Karanis P.** 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004–2010. *Water. Res.* 45: 6603-6614.
- Beach M. J.** 2008. Waterborne: recreational water. In: Fayer R.: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press. Boca Raton. 334-369.
- 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.
- Benitez A. J., McNair N., Mead J.** 2007. Modulation of gene expression of three *Cryptosporidium parvum* ATP-binding cassette transporters in response to drug treatment. *Parasitol. Res.* 101: 1611-1616.
- Blagburn B. L., Drain K. L., Land T. M., Kinard R. G., Moore P. H., Lindsay D. S., Patrick D. A., Boykin D. W., Tidwell R. R.** 1998. Comparative efficacy evaluation of dicationic carbazole compounds, nitazoxanide, and paromomycin against *Cryptosporidium parvum* infections in a neonatal mouse model. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42: 2877-2882.
- Blanshard C., Shanson D. C., Gazzard B. G.** 1997. Pilot studies of azithromycin, letrazuril and paromomycin in the treatment of cryptosporidiosis. *Int. J. std. AIDS.* 8: 124-129.

- Bugarski-Stanojevic V., Blagojevic J., Adnađević T., Jojic V., Vujošević M.** 2008. Molecular phylogeny and distribution of three *Apodemus* species (Muridae, Rodentia) in Serbia. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 46: 278-286.
- Bull S. A., Chalmers R. M., Sturdee A. P., Healing T. D.** 1998. A survey of *Cryptosporidium* species in Skomer bank voles *Clethrionomys glareolus skomerensis*. *J. Zool.* 244: 119-122.
- Bushen O. Y., Lima A. A., Guerrant R. L.** 2006. Cryptosporidiosis in: Tropical infectious diseases. Principle, pathogens and practice. Churchill Livingstone. Philadelphia. 1003-1014.
- Cama V. A., Ross J. M., Crawford S., Kawai V., Chavez-Valdez R., Vargas D.** 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J. Infect. Dis.* 196: 684-691.
- Cama V. A., Bern C., Roberts J., Cabrera L., Sterling C. R., Ortega Y.** 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1567-1574.
- 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.
- Cavalier-Smith T.** 2014. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *Eur. J. Protistol.* 50: 472-495.
- Clancy J. L., Hargy T. M., Marshall M. M., Dyksen J. E.** 1998. UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocyst. *J. Am. Water. Works. Assoc.* 90: 92-102.
- Current W. L., Blagburn B. L.** 1990. *Cryptosporidium*: infections in man and domesticated animals. *Coccidiosis of man and domestic animals* CRC Press. Boca Raton. 155-185.
- Current W. L., Reese N. C.** 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J. Protozool.* 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. J. Protozool. 33: 289-296.
- Čondlová Š.** 2013. Diverzita kryptosporidií infikujících hlodavce rodu *Apodemus* v České republice. Diplomová práce. České Budějovice. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zemědělská fakulta. 47 s.
- Čondlová Š., Horčíčková M., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R., Stanko M., McEvoy J., Kváč M.** 2018. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. Eur. J. Protistol. 63: 1-12.
- Danišová O., Valenčáková A., Stanko M., Luptáková L., Hatalová E., Čanády A.** 2017. Rodents as a reservoir of infection caused by multiple zoonotic species/genotypes of *C. parvum*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. scrofarum*, and the first evidence of *C. muskrat* genotypes I and II of rodents in Europe. Acta. Trop. 20: 29-35.
- Delafosse A., Chartier C., Dupuy M. C., Dumoulin M., Pors I., Paraud C.** 2015. *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in western France. Prev. Vet. Med. 118: 406-412.
- Denkinger C. M., Harigopal P., Ruiz P., Dowdy L. M.** 2008. *Cryptosporidium parvum*-associated sclerosing cholangitis in a liver transplant patient. Transpl. Infect. Dis. 10: 133-136.
- 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.
- Dolejš P.** 2004. *Cryptosporidium* a *Giardia*: přehled vodárenské problematiky za první desetiletí po událostech Milwaukee (USA). Vodní hospodářství. 54: 271-273.
- Domenéch-Sánchez A., Olea F., Berrocal C. I.** 2008. Infection related to recreational waters. Enferm. Infec. Microbiol. Clin. 26: 32-37.

- 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.
- 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. *N. Engl. J. Med.* 332: 855-859.
- Elwin K., Hadfield S. J., Robinson G., Crouch N. D., Chalmers R. M.** 2012. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. *Int. J. Parasitol.* 42: 675-682.
- Enemark H. L., Ahrens P., Bille-Hansen V., Hoogaard P. M., Virge H., Thamsborg S. M., Lind P.** 2003. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the „porcine“ genotype. *Parasitology.* 126: 107-116.
- Farthing M. J.** 2006. Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 3: 436-445.
- Fayer R.** 2003. *Cryptosporidium*: From molecules to disease. In: Thompson R. C. A., Armson A., Ryan U. M.: *Cryptosporidium*: from molecules to disease. Elsevier. 11-18.
- Fayer R.** 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126: 37-56.
- Fayer R.** 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124: 90-97.
- Fayer R., Ellis W.** 1993. Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. *J. Parasitol.* 79: 771-774.
- 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.** 2009. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 164: 192-200.

- 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 A., Speer C. A., Dubey J. P.** 1990. General biology of *Cryptosporidium*. In: Dubey J. P., Speer C. A., Fayer R.: *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Press. Boca Raton. 2-29.
- Fayer R., Speer C. A., Dubey J. P.** 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R.: *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC Press. Boca Raton. 1-42.
- Fayer R., Phillips L., Anderson B. C., Bush M.** 1991. Chronic cryptosporidiosis in a bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J. Zoo. Wild. Med.* 22: 228-232.
- Fayer R., Trout J. M., Jenkins M. C.** 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 84: 1165-1169.
- Fayer R., Trout J. M., Nerad T.** 1996. Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Eukar. Microbiol.* 43: 64.
- Fayer R., Trout J. M., Xiao L., Morgan U. M., Lai A. A., Dubey J. P.** 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87: 1415-1422.
- 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 spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.* 127: 238-242.
- Feng Y., Yang W., Ryan U., Zhang L., Kváč M., Koudela B., Modrý D., Li N., Fayer R., Xiao L.** 2011. Development of a multilocus sequence tool for typing

- Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. J. Clin. Microbiol. 49: 34-41.
- Filippucci M. G., Macholán M., Michaux J. R.** 2002. Genetic variation and evolution in the genus *Apodemus* (Muridae: Rodentia). Biol. J. Linnean. Soc. 75: 395-419.
- Flanigan T. P., Soave R.** 1993. Cryptosporidiosis. [Review]. Prog. Clin. Parasitol. 3: 1-20.
- García-Preledo I., Pedraza-Díaz S., González-Warleta M., Mezo M., Gómez-Bautista M., Ortega-Mora L. M., Castro-Hermida J. A.** 2013. Presence of *Cryptosporidium scrofarum*, *C. suis* and *C. parvum* subtypes IIAA16G2R1 and IIAA13G1R1 in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*). Vet. Parasitol. 196: 497-502.
- Gargala G.** 2008. Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*. Parasite. 15: 275-281.
- Gargala G., Delaunay A., Li X., Brasseur P., Favennec L., Ballet J. J.** 2000. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide glucuronide against *Cryptosporidium parvum* development in sporozoite-infected HCT-8 enterocytic cells. J. Antimicrob. Chemother. 46: 57-60.
- Gemmeke H., Radtke M., Niethammer J.** 1987. Zur innerartlichen Protein variation bei der Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*). Z. Säugetierk. 52: 242-247.
- Giacometti A., Burzacchini F., Cirioni O., Barchiesi F., Dini M., Scalise G.** 1999. Efficacy of treatment with paromomycin, azithromycin, and nitazoxanide in a patient with disseminated cryptosporidiosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18: 885-889.
- Glaberman S., Moore J. E., Lowery C. J., Chalmers R. M., Sulaiman I., Elwin K., Rooney P. J., Millar B. C., Dooley J. S., Lal A. A., Xiao L.** 2002. Three drinking water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. Emerg. Infect. Dis. 8: 631-633.
- Gong C., Cao X. F., Deng L., Li W., Huang X. M., Lan J. C., Xiao Q. C., Zhong Z. J., Feng F., Zhang Y., Wang W. B., Guo P., Wu K. J., Peng G. N.**

2017. Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in cattle in China: a review. *Parasite*. 24: 1-8.
- Graczyk Z., Chomicz L., Kozłowska M., Kazimierczuk Z., Graczyk T. K.** 2011. Novel and promising compounds to treat *Cryptosporidium parvum* infections. *Parasitol. Res.* 109: 591-594.
- 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.
- Hajdušek O., Ditrich O., Šlapeta J.** 2004. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 122: 183-192.
- Hannah J., Riordan T.** 1988. Case to case spread of cryptosporidiosis, evidence from a day nursery outbreak. *Public. Health.* 102: 539-544.
- Harrison S. P., Yu G., Takahara H.** 2001. Palaeovegetation: diversity of temperate plants in East Asia. *Nature.* 413: 129-130.
- Healey M. C., Yang S., Rasmussen K. R., Jackson M. K., Du C.** 1995. Therapeutic efficacy of paromomycin in immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 81: 114-116.
- Heijbel H., Slaine K., Seigel B., Wall P., McNabb S. J., Gibbons W., Istre G. R.** 1987. Outbreak of diarrhea in a day care center with spread to household members: the role of *Cryptosporidium*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6: 532-535.
- Henriksen S. A., Pohlenz J. F.** 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta. Vet. Scand.* 22: 594-596.
- Higgins R. J.** 1999. Surveillance for cryptosporidiosis. *Pig. J.* 43: 88-91.
- 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.
- Hildebrand J., Paziewska-Harris A., Zalesny G., Harris P. D.** 2013. PCR characterization suggests that an unusual range of Bartonella species infect the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 5082-5084.
- Hlavsa M. C., Roberts V. A., Anderson A. R., Hill V. R., Kahler A. M., Orr M., Garrison L. E., Hicks L. A., Newton A., Hilborn E. D., Wade T. J., Beach M. J., Yoder J. S.** 2011 Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with recreational water-United States, 2007–2008. *MMWR Surveill. Summ.* 60: 1-32.
- Holubová N., Sak B., Horčíčková M., Hlásková L., Květoňová D., Menchaca S., McEvoy J., Kváč M.** 2016. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitol. Res.* 115: 2243-2251.
- Horčíčková M., Čondlová Š., Holubová N., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R., Sedláček F., Clark M., Giddings C., McEvoy J., Kváč M.** 2018. Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology.* 17: 1-14.
- Hussain G., Roychoudhury S., Singha B., Paul J.** 2017. Incidence of *Cryptosporidium andersoni* in diarrheal patients from southern Assam, India: a molecular approach. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36: 1023-1032.
- Chalmers R. M.** 2012. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 48: 429-446.
- Chalmers R. M., Davies A. P.** 2010. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.* 124: 138-146.
- Chalmers R. M., Robinson G., Elwin K., Hadfield S. J., Thomas E., Watkins J., Casemore D., Kay D.** 2010. Detection of *Cryptosporidium* species and sources of

contamination with *Cryptosporidium hominis* during a waterborne outbreak in north west Wales. J. Water. Health. 8: 311-325.

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., Bull S. A., Miller A. M. 1995. Rodent reservoirs of *Cryptosporidium*. In: Betts W. B, Casemore D., Fricker C., Smith H., Watkins J., (Eds.), Protozoan Parasites and Water. Roy. Soc. Chem. Spec. Publ. 168: 63-66.

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. Europ. J. Protistol. 30: 151-155.

Chelomina G. N., Atopkin D. M. 2010. Molecular genetic evidence of a deep phylogenetic discontinuity between the Asian and European races of pygmy wood mouse based on the mitochondrial cytochrome b gene variation. Mol. Biol. 44: 699-708.

Chen X. M., Keithly J. S., Paya C. V., LaRusso N. F. 2002. Cryptosporidiosis. N. Engl. J. Med. 346: 1723-1731.

Chiodini P. L., Moody A. H., Manser W. D. 2001. Atlas of medical helminthology and protozoology. Churchil livingstone. 42.

Imre K., Luca C., Costache M., Sala C., Morar A., Morariu S., Ilie M. S., Imre M., Darabus G. 2013. Zoonotic *Cryptosporidium parvum* in Romanian newborn lambs (*Ovis aries*). Vet. Parasitol. 191: 119-122.

Insulander M., Silverlas C., Lebbad M., Karlsson L., Mattsson J. G., Svenungsson B. 2013. Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. Epidemiol. Infect. 141: 1009-1020.

Iseki M. 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. Jpn. J. Parasitol. 28: 285-307.

- Iseki M.** 1986. Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. Jpn. J. Parasitol. 35: 521-526.
- Jeníková M., Němejc K., Sak B., Květoňová D., Kváč M.** 2011. New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. Vet. Parasitol. 176: 120-125.
- Jex A. R., Ryan U. M., Ng J., Campbell B. E., Xiao L., Stevens M.** 2007. Specific and genotypic identification of *Cryptosporidium* from a broad range of host species by nonisotopic SSCP analysis of nuclear ribosomal DNA. Electrophoresis 28: 2818-2825.
- Jex A. R., Pangasa A., Campbell B. E., Whipp M., Hogg G., Sinclair M. I.** 2008. Classification of *Cryptosporidium* species from patients with sporadic cryptosporidiosis by use of sequencebased multilocus analysis following mutation scanning. J. Clin. Microbiol. 46: 2252-2262.
- 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 Parasitol. 63: 35.
- 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.
- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Křížek J., Modrý D., Šlapeta J.** 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. Folia Parasitol. 55: 8194.
- Johnson E. H., Windsor J. J., Muirhead D. E., King G. J., Al-Busaidy R.** 2000. Confirmation of the prophylactic value of paromomycin in a natural outbreak of caprine cryptosporidiosis. Vet. Res. Commun. 24: 63-67.
- Kadappu K. K., Nagaraja M. V., Rao P. V., Shastry B. A.** 2002. Azithromycin as treatment for cryptosporidiosis in human immunodeficiency virus disease. J. Postgrad. Med. 48: 179-181.

- Kalinová J., Valenčáková A., Hatalová E., Danišová O., Trungelová M., Hromada R.** 2017. Occurrence of *Cryptosporidium* in the water basins of Nitra region, Slovakia. *Acta Trop.* 179: 36-38.
- Karamysheva T. V., Bogdanov A. S., Kartavtseva, I. V., Likhoshvay T. V., Bochkarev M. N., Kolcheva N. E., Marochkina V. V., Rubtsov N. B.** 2010. Comparative FISH Analysis of C-Positive Blocks of Centromeric Chromosomal Regions of Pygmy Wood Mice *Sylvaemus uralensis* (Rodentia, Muridae). *Russ. J. Genet.* 46: 712-724.
- Karanis P., Kourenti C., Smith H.** 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water. Health.* 5: 1-38.
- Kinross P., Beser J., Troell K., Silverlas C., Bjorkman C., Lebbad M., Wieniecka-Krusnell J., Lindh J., Lofdahl M.** 2015. *Cryptosporidium parvum* infections in a cohort of veterinary students in Sweden. *Epidemiol. Infect.* 143: 2748-2756.
- Klein P., Cirioni O., Giacometti A., Scalise G.** 2008. In vitro and in vivo activity of aurintricarboxylic acid preparations against *Cryptosporidium parvum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62: 1101-1104.
- Klesius P. H., Haynes T. B., Malo L. K.** 1986. Infectivity of *Cryptosporidium* ssp. isolated from wild mice for calves and mice. *J. Am. Vet. Med.* 189: 192-193.
- Koehler A. V., Whipp M. J., Haydon S. R., Gasser R. B.** 2014. *Cryptosporidium cuniculus*-new records in human and kangaroo in Australia. *Parasit. Vectors.* 30: 492.
- Koh H. S., Shaner P. J., Csorba G., Wang Y. J., Hee K., Hyek L. H.** 2014. Comparative genetics of *Apodemus agrarius* (Rodentia: mammalia) from Insular and continental eurasian populations cytochrome b sequences analyses. *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 66: 73-84.
- Kosek M., Alcantara C., Lima A. A., Guerrant R. L.** 2001. Cryptosporidiosis: an update. *Lancet. Infect. Dis.* 1: 262-269.

- Kuliš-Malkowska K.** 2007. The impact of nematode invasions on the pattern of *Cryptosporidium parvum* infection in wild rodents. *Wiad. Parazytol.* 53: 251-252.
- Kváč M., Havrdová N., Hlásková L., Daňková T., Kanděra J., Ježková J., Vítovec J., Sak B., Ortega Y., Xiao L., Modrý D., Chelladurai J. R., Prantlová V., McEvoy J.** 2016. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLoS one.* 11: e0147090.
- 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., Hofmannová L., Hlásková L., Květoňová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B.** 2014. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Vet. Parasitol.* 201: 9-17.
- Kváč M., Hromadová N., Květoňová D., Rost M., Sak B.** 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. *Vet. Parasitol.* 177: 378-382.
- Kváč M., Kestránová 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. *Exp. Parasitol.* 131: 107-110.
- Kváč M., Kestránová 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 (*Suis scrofa*). *Vet. Parasitol.* 31: 218-227.
- Kváč M., Kouba M., Vítovec J.** 2006: Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 137: 202-209.

- Kváč M., Květoňová D., Sak B., Ditrich O.** 2009. *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 982-983.
- 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.* 43: 805-817.
- 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., Vlnatá G., Ježková J., Horčíčková M., Konečný R., Hlásková L., McEvoy J., Sak B.** 2018. *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *Eur. J. Protistol.* 63: 96-104.
- Kváč M., Vítovec J.** 2003. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 50: 451-457.
- Laakkonen J., Soveri T., Henttonen H.** 1994. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in peak density *Microtus agrestis*, *Microtus oeconomus* and *Clethrionomys glareolus* populations. *J. Wild. Dis.* 30: 110-111.
- Lee M. B., Greig J. D.** 2010. A review of gastrointestinal outbreaks in schools: effective infection control interventions. *J. Sch. Health.* 80: 588-598.
- 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. *J. Med. Microbiol.* 55:703-707.
- Levine N. D.** 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66: 830-834.
- Li N., Xiao L., Alderisio K., Elwin K., Cebelinski E., Chalmers R., Santin M., Fayer R., Kváč M., Ryan U., Sak B., Stanko M., Guo Y., Wang L., Zhang L., Cai J., Roelling D., Feng Y.** 2014. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zootonic pathogen emerging in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 20: 217-224.

- Li X., Pereira M. D., 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.* 24: 343-350.
- Libois R. M., Michaux J. R., Ramalhino M. G., Maurois C., Sara M.** 2001. On the origin and systematics of the North African wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations. A comparative study of mtDNA restriction patterns. *Can. J. Zool.* 79: 1503-1511.
- Lindsay D. S., Blagburn B. L.** 1990. Cryptosporidiosis in birds In: Dubey J. P., Speer C. A., Fayer R.: *Cryptosporidiosis in man and animals*. CRC Press. Boca Raton. 133-148.
- Lindsay D. S., Upton S. J., Owens D. S., Morgan U. M., Mead J. R., Blagburn B. L.** 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle *Bos taurus*. *J. Eukar. Microbiol.* 47: 91-95.
- Liu A., Jia Z., Zhao J., Wei Z., Wang R., Zhang L.** 2015. The first report of *Cryptosporidium andersoni* in horses with diarrhea and multilocus subtype analysis. *Parasit. Vectors.* 8: 1-4.
- 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.
- Liu Q., Chen P., He K., Kilpatrick C. W., Liu S. Y., Yu F. H., Jiang X.** 2012. Phylogeographic study of *Apodemus ilex* (Rodentia: Muridae) in Southwest China. *PLoS one.* 7: e31453.
- Liu X., Zhou X., Zhong Z., Deng J., Chen W., Cao S., Fu H., Zuo Z., Hu Y., Peng G.** 2014. Multilocus genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium andersoni* derived from a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasitol. Res.* 113: 2129-2136.
- Liu X., Wei F., Li M., Jiang X., Feng Z., Hu J.** 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of wood mice (genus *Apodemus* Kaup, 1829) based on complete mtDNA cytochrome b sequences, with emphasis on Chinese species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33: 1-15.

- 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.
- Mac Kenzie 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. *N. Engl. J. Med.* 331: 161-167.
- Mancassola R., Reperant J. M., Naciri M., Chartier C.** 1995. Chemoprophylaxis of *Cryptosporidium parvum* infection with paromomycin in kids and immunological study. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 75-78.
- 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.
- Meuten D. J., Van Kruiningen H. J., Kein D. H.** 1974. *Cryptosporidiosis* in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165: 914-917.
- Michaux J. R., Bellinva E., Lymberakis P.** 2005b. Taxonomy, evolutionary history and biogeography of the broad-toothed field mouse (*Apodemus mystacinus*) in the eastern Mediterranean area based on mitochondrial and nuclear genes. *Biol. J. Linn. Soc.* 85: 53-63.
- Michaux J. R., Chevret P., Filippucci M. G., Macholán M.** 2002. Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis on the subgenus *Sylvaemus* using nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: cytochrome b and 12S rRNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23: 123-136.
- Michaux J. R., Libois R., Filippucci M. G.** 2005. So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the Yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Heredity.* 94: 52-63.

- Michaux J. R., Libois R., Paradis E., Filippucci M. G.** 2004. Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. *Mol. Phyl. Evol.* 32: 788-798.
- Michaux J. R., Libois R., Ramalhinho M. G., Maurois C.** 1998. On the mtDNA restriction patterns variation of the Iberian wood mouse (*Apodemus sylvaticus*), comparison with other west Mediterranean populations. *Hereditas.* 129: 187-194.
- Michaux J. R., Magnanou E., Paradis E., Neiberding C., Libois R.** 2003. Mitochondrial phylogeography of the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Mol. Ecol.* 12: 685-697.
- Miláček P., Vitovec J.** 1985. Differential staining of Cryptosporidia by aniline-carbolmethyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32: 50.
- Miyaji S., Tanikawa T., Shikata J.** 1989. Prevalence of *Cryptosporidium* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus* in Japan. *Jpn. J. Parasitol.* 38: 368-372.
- Monge R., Arias M. L.** 1996. Presence of various pathogenic microorganism in fresh vegetable in Costa Rica. *Arch. Latinoam. Nutr.* 46: 192-294.
- Morgan-Ryan U. M., Fall A., Ward L. A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R. C., Olson M., Lal A., Xiao L.** 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 433-440.
- Morse T. D., Nichols R. A., Grimason A. M., Campbell B. M., Tembo K. C., Smith H. V.** 2007. Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiol. Infect.* 135: 1307-1315.
- 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.* 196: 184-188.
- Musser G., Carleton M., Wilson D., Reeder D.** 1993. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. Family Muridae, 2nd ed. Smithsonian Institution Press. Washington DC. 501-756.

- Muthusamy D., Rao S. S., Ramani S., Monica B., Banerjee I., Abraham O. C., Mathai D. C., Primrose B., Muliyl J., Wanke C. A., Ward H. D., Kang G.** 2006. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *J. Clin. Microbiol.* 44: 632-634.
- Nemirov K., Henttonen H., Vaheeri A., Plyusnin A.** 2002. Phylogenetic evidence for host switching in the evolution of hantaviruses carried by *Apodemus* mice. *Virus Res.* 90: 207-215.
- Ng J. S. Y., Pingault N., Gibbs R., Koehler A., Ryan U.** 2010. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* outbreaks in Western and South Australia. *Exp. Parasitol.* 125: 325-328.
- 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.*, 16: 5-12.
- 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.
- 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. *J. Infect. Dis.* 180: 1275-1281.
- Okhuysen P. C., Rich S. M., Chappell C. L., Grimes K. A., Widmer G., Feng X., Tzipori S.** 2002. Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* isolate of cervine origin for healthy adults and interferon-gamma knockout mice. *J. Infect. Dis.* 185: 1320-1325.
- Ondráčková Z., Kváč M., Sak B., Květoňová D., Rost M.** 2009. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South Bohemia, the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 165: 141-144.
- Ondriska F., Vrabcová I., Brind'áková S., Kváč M., Ditrich O., Boldiš V., Bastlová M.** 2013. The first reported cases of human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium hominis* in Slovak Republic. *Folia Microbiol.* 58: 69-73.

- Palmieri F., Cicalini S., Froio N., Rizzi E. B., Goletti D., Festa A., Macri G., Petrosillo N.** 2005. Pulmonary cryptosporidiosis in an AIDS patient: successful treatment with paromomycin plus azithromycin. *Int. J. Std. AIDS.* 16: 515-517.
- Pancieria R. J., Thomassen R. W., Garner F. M.** 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 479-484.
- Pavlásek I., Ryan U.** 2008. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. *Exp. Parasitol.* 118: 434-437.
- Pedraza-Diaz S., Amar C., Nichols G. L., McLauchlin J.** 2001. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 49-56.
- Perec-Matysiak A., Buńkowska-Gawlik K., Zaleśny G., Hildebrand J.** 2015. Small rodents as reservoirs of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in south-western Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 22: 1-5.
- Pereira S. J., Ramirez N. E., Xiao L., Ward L. A.** 2002. Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *J. Infect. Dis.* 186: 715-718.
- 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.
- Petrincová A., Valenčáková A., Luptáková L., Ondriska F., Kalinová J., Halánová M., Danišová O., Jarčuška P.** 2015. Molecular characterization and first report of *Cryptosporidium* genotypes in human population in the Slovak Republic. *Elektrophoresis.* 36: 1-6.
- Plutzer J., Karanis P.** 2007. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Vet. Parasitol.* 146: 357-362.
- Pohjola S., Oksanen H., Jokipii L., Anssi M., Jokipii M.** 1986. Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. *Scand. J. Infect. Dis.* 18: 173-178.
- Portnoy D., Whiteside M. E., Buckley E., MacLeod C. L.** 1984. Treatment of intestinal cryptosporidiosis with spiramycin. *Ann. Intern. Med.* 101: 202-204.

- Pospischil A., Stiglmeier M. T., Hegel G., Wiener H.** 1987. Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Vet. Rec.* 112: 379-380.
- Power M. L., Ryan U. M.** 2008. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J. Parasitol.* 94: 1114-1117.
- Preiser G., Preiser L., Madeo L.** 2003. An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. *J. Am. Coll. Health.* 51: 213-215.
- 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. Parasitol.* 51: 360-362.
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning C. H., 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.
- Reutter B. A., Hausser J., Vogel P.** 1999. Discriminant analysis of skull morphometric characters in *Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, and *A. alpicola* (Mammals: Rodentia). *Acta. Theriol.* 44: 299-308.
- Reutter B. A., Petit E., Brunner H., Vogel P.** 2003. Cytochrome b haplotype divergences in West European *Apodemus*. *Mamm. Biol.* 68: 153-164.
- Robertson L. J., Gjerde B.** 2001. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *J. Food. Prot.* 64: 1793-1798.
- Robinson G., Elwin K., Chalmers R. M.** 2008. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 1174-1176.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S. J., Katzer F., Bartley P. M., Hunter P. R., Nath M., Innes E. A., Chalmers R. M.** 2010. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* 40: 1539-1548.

- Russell T. S., Lynch J., Ottolini M. G.** 1998. Eradication of *Cryptosporidium* in a child undergoing maintenance chemotherapy for leukemia using high dose azithromycin therapy. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 20: 83-85.
- Ryan U. M., Monis P., Enemark H. L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R. C., Xiao L.** 2004. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* 90: 769-773.
- Ryan U. M., Papparini A., Tonq K., Yanq R., Gibson-Kueh S., O'Hara A., Lymbery A., Xiao L.** 2015. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp. Parasitol.* 150: 31-35.
- Ryan U. M., Power M., Xiao L.** 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the red kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eucar. Microbiol.* 55: 22-26.
- Ryan U. M., Xiao L., Read C., Sulaiman I. M., Monis P., Lal A. A., Fayer R., Pavlasek I.** 2003. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J. Parasitol.* 89: 809-813.
- Rzezutka A., Nichlos R. A., Connelly L. Kaupke A., Kozyra I., Cook N., Birrell S., Smith H. V.** 2010. *Cryptosporidium* oocysts on fresh produce from areas of high livestock production in Poland. *Int. J. Food. Microbiol.* 39: 96-101.
- Saez-Llorens X., Odio C. M., Umana M. A., Morales M. V.** 1989. Spiramycin vs. placebo for treatment of acute diarrhea caused by *Cryptosporidium*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8: 136-140.
- Sakka H., Quéré J. P., Kartavtseva I., Pavlenko M., Chelomina G., Atopkin D., Bogdanov A., Michaux J. R.** 2010. Comparative phylogeography of four *Apodemus* species (Mammalia: Rodentia) in the Asian Far East: evidence of Quaternary climatic changes in their genetic structure. *Biol. J. Linn. Soc.* 100: 797-821.
- Santín M., Trout J. M., Xiao L., Zhou L., Greiner E., Fayer R.** 2004: Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* 122: 103-117.

- Silverlas C., Björkman C., Egenvall A.** 2009. Systematic review and meta-analyses of the effects of halofuginone against calf cryptosporidiosis. *Prev. Vet. Med.* 91: 73-84.
- Silverlas C., Bosaeus-Reineck H., Naslund K., Bjorkman C.** 2013. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? *Int. J. Parasitol.* 43: 155-161.
- Simpson V. R.** 2002. Wild animals as reservoirs of infectious diseases in the UK. *Vet. J.* 163: 128-146.
- Siński E., Bednarska M., Bajer A.** 1998. The role of wild rodents in ecology of Cryptosporidiosis in Poland. *Folia Parasitol.* 45: 173-174.
- Sinski 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: 2662-2270.
- Smith H. V., Nichols R. A., Grimason A. M.** 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends. Parasitol.* 21: 133-142.
- 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.
- Spano F., Putignani L., McLauchlin J., Casemore D. P., Crisanti A.** 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 150: 209-217.
- Sprinz E., Mallman R., Barcellos S., Silbert S., Schestatsky G., Bem David D.** 1998. AIDS-related cryptosporidial diarrhoea: an open study with roxithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 41: 85-91.
- Stefanogiannis N., McLean M., Van Mil H.** 2001. Outbreak of cryptosporidiosis linked with a farm event. *N. Z. Med. J.* 114: 519-521.

- Stenger B. L. S., Horčíčková M., Clark M. E., Kváč M., Čondlová Š., Khan E., Widmer G., Xiao L., Giddings C. W., Pennil C., Stanko M., Sak B., McEvoy J. M.** 2018. *Cryptosporidium* infecting wild cricetid rodents from the subfamilies Arvicolinae and Neotominae. *Parasitology*. 145: 326-334.
- Strahler A. H., Strahler A. N.** 1989. *Elements of physical geography*. John Wiley and sons. New York. 560 s.
- Suárez-Luengas L., Clavel A., Quílez J., Goñi-Cepero M. P., Torres E., SánchezAcedo C., del Cacho E.** 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 30: 231-235.
- Sulaiman I. M., Hira P. R., Zhou L., Al-Ali F. M., Al-Shelahi F. A., Shweiki H. M., Iqbal J., Khalid N., Xiao L.** 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2805-2809.
- 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.
- 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.
- Tali A., Addebous A., Asmama S., Chabaa L., Zougaghi L.** 2011. Respiratory cryptosporidiosis in two patients with HIV infection in a tertiary care hospital in Morocco. *Ann. Biol. Clin.* 69: 605-608.
- Templeton T. J., Enomoto S., Chen W., Huang Ch., Lancto Ch. A., Abrahamsen M. S., Zhu G.** 2010. A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a *Gregarina* and *Cryptosporidium*. *Mol. Biol. Evol.* 27: 235-248.
- Theodos C. M., Griffiths J. K., D'Onfro J., Fairfield A., Tzipori S.** 1998. Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42: 1959-1965.

- Thompson R. C. A., Olson M. E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M. S., Hijawi N. S.** 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporiosis. *Adv. Parasitol.* 59: 77-158.
- 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.
- Tosini F., Drumo R., Elwin K., Chalmers R. M., Pozio E., Caccio S. M.** 2010. The CpA135 gene as a marker to identify *Cryptosporidium* species infecting humans. *Parasitol. Int.* 59: 606-609.
- Traversa D.** 2010. Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Parasit. Vectors.* 3: 21.
- Tyzzar E. E.** 1907. Asporozoan found in the peptic flanda of the common mouse. *Proc. Doc. Exp. Biol. Med.* 5: 12-13.
- Tyzzar E. E.** 1910. An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Research.* 23: 394-414.
- Tyzzar E. E.** 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394-414.
- Tzipori S.** 1983: Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbio. Rev.* 47: 84-96.
- Tzipori S., Griffiths J., Theodus C.** 1995. Paromomycin treatment against cryptosporidiosis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 171: 1069-1070.
- Umejiego N. N., Gollapalli D., Sharling L., Volftsun A., Lu J., Benjamin N. N., Stroupe A. H., Riera T. V., Striepen B., Hedstrom L.** 2008. Targeting a prokaryotic protein in a eukaryotic pathogen: identification of lead compounds against cryptosporidiosis. *Chem. Biol.* 15: 70-77.
- Valigurová A., Hofmannová L., Koudela B., Vávra J.** 2007. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *J. Eucaryot. Microbiol.* 54: 495-510.

- Vargas S. L., Shenep J. L., Flynn P. M., Pui C. H., Santana V. M., Hughes W. T.** 1993. Azithromycin for treatment of severe *Cryptosporidium* diarrhea in two children with cancer. *J. Pediatr.* 123: 154-156.
- Vetterling J. M., Takeuchi A., Madden P. A.** 1971. Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. *J. Protozool.* 18: 248-60.
- Viu M., Quilez J., Sanchez-Acedo C., del Cacho E., Lopez-Bernad F.** 2000. Field trial on the therapeutic efficacy of paromomycin on natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Vet. Parasitol.* 90: 163-170.
- 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.* 53: 239-243.
- Vohralík V., Frynta D., Mikulová P., Benda P., Nová P.** 2002. Multivariate morphometrics of *Apodemus mystacinus* in the Near East and its divergence from European *A. m. epimelas* (Mammalia: Rodentia). *Isr. J. Zool.* 48: 135-148.
- Waldron L. S., Cheung-Kwok-Sang C., Power M. L.** 2010. Wildlife-associated *Cryptosporidium fayeri* in human, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 2006-2007.
- Webster J. P., Macdonald R. W.** 1995. Parasites of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Parasitology.* 111: 247-255.
- Widmer G., Klein P., Bonilla R.** 2007. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology.* 134: 1583-1588.
- Wittenberg D. F., Miller N. M., van den Ende J.** 1989. Spiramycin is not effective in treating *Cryptosporidium* diarrhea in infants: results of a double-blind randomized trial. *J. Infect. Dis.* 159: 131-132.
- Wójcik J. M., Wójcik A. M., Macholán M., Piálek J., Zima J.** 2004. The mammalian model for population studies of B chromosomes: the wood mouse (*Apodemus*). *Cytogenet. Genome. Res.* 106: 264-270.
- Xiao L., Fayer R.** 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* 38: 1239-1255.

- Xiao L., Feng Y.** 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52: 309-23.
- 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 four U.S. states in 2007: the wide occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and a case report of an infection with the *Cryptosporidium* horse genotype. *J. Clin. Microbiol.* 47: 3017-3020.
- Xiao L., Limor J., Morgyn U. M., Sulaiman I. M., Thompson R. C. A., Lal A. A.** 2000. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 5499-5502.
- Xiao L., Ryan U. M.** 2008. Molecular epidemiology. In: Fayer R., Xiao L.: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton. 119-172.
- Xiao L., Ryan U. M., Fayer R., Bowman D. D., Zhang L.** 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium pestis*: which name is valid. *Exp. Parasitol.* 130: 308-309.
- 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.
- 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.
- Yorder J. S., Beach M. J.** 2007. Cryptosporidiosis surveillance-United States, 2003-2005. *MMWR Surveill. Summ.* 56: 1-10.
- Yoder J. S., Harral C., Beach M. J.** 2010. Cryptosporidiosis surveillance: United States, 2006-2008. *MMWR Surveill. Summ.* 59: 1-14.

- Yoder J. S., Wallace R. M., Collier S. A., Beach M. J., Hlavsa M. C.** 2012. Cryptosporidiosis surveillance: United States, 2009-2010. *MMWR Surveill. Summ.* 61: 1-12.
- Yu J. R., Park W. Y.** 2003. The Effect of γ -Irradiation on the viability of *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 89: 639-642.
- Zahedi A., Durmic Z., Gofton A. W., Kueh S., Austen J., Lawson M., Callahan L., Jardine J., Ryan U.** 2017. *Cryptosporidium homai* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Vet. Parasitol.* 245: 92-101.
- 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: 1247-54.
- Zhang H., Yan J., Zhang G., Zhou K.** 2008. Phylogeography and demographic history of Chinese black-spotted frog populations (*Pelophylax nigromaculata*): evidence for independent refugia expansion and secondary contact. *BMC Evol. Biol.* 6: 8-21.
- Zhao G. H., Du S. Z., Wang H. B., Hu X. F., Deng M. J., Yu S. K., Zhang L. X., Zhu X. Q.** 2015. First report of zoonotic *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in golden takins (*Budorcas taxicolor bedfordi*). *Infect. Genet. Evol.* 34: 394-401.
- Zhou L., Fayer R., Trout J. M., Ryan U. M., Schaefer F. W., Xiao L.** 2004b. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7574-7577.
- Zhou S. Z., Jijun L., Zhang S. Q., Zhao J. D., Cui J. X.** 2004a. Quaternary glaciations in China. In: Ehlers J., Gibbard P. L., eds. Quaternary glaciations – extent and chronology. part III. Chinese Academy of Sciences. Beijing. 105-113.
- 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: 176-18.

Zintl A., Ezzaty-Mirashemi M., Chalmers R. M., Elwin K., Mulcahy G., Lucy F. E. 2011. Longitudinal and spatial distribution of GP60 subtypes in human cryptosporidiosis cases in Ireland. *Epidemiol. Infect.* 139: 1945-1955.