

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

---

**BIOLOGIE A DIVERZITA KRYPTOSPORIDIÍ  
INFIKUJÍCÍCH MYŠI DOMÁCÍ  
(*MUS MUSCULUS*)**

**Disertační práce**

**Ing. Bc. Veronika Prantlová**

**Vedoucí disertační práce: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.**

---

České Budějovice

2021

## **DISERTAČNÍ PRÁCE**

Prantlová V., 2021: Biologie a diverzita kryptosporidií infikujících myši domácí (*Mus musculus*). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2021; 160 s.

## **ROZVRŽENÍ, FORMÁTOVÁNÍ A STYL PRÁCE**

V souladu s bodem 9.2 Opatření děkana Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích k zajištění studia v doktorském studijním program č. 17 z 8. listopadu 2017 je tato disertační práce zpracována formou souboru publikací studenta již uveřejněných nebo k uveřejnění přijatých a opatřených komentářem.

Předložená disertační práce shrnuje výsledky týkající se diverzity a biologických vlastností kryptosporidií parazitujících u myši domácí, které byly získané na základě multidisciplinárního přístupu zahrnujícího zoologii, parazitologii, molekulární biologii, histologii a experimentální infekce a byly publikovány ve třech vědeckých impaktovaných časopisech.

## **PROHLÁŠENÍ**

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě disertační práci zpracovanou na závěr doktorského studia na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a zdrojů uvedených v seznamu literatury, 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 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 VÝSLEDCÍCH PRÁCE**

Tato disertační práce je založena na výsledcích vědeckých publikací, které vznikly za účasti spoluautorů. Na tomto místě prohlašuji, že jsem v rámci studia diverzity a biologie kryptosporidií, parazitujících u myši domácí provedla většinu původního výzkumu a že jsem hlavní autorkou jeho výsledků.

V Českých Budějovicích dne 15. 12. 2021

---

Ing. Bc. Veronika Prantlová

## SEZNAM IMPAKTOVANÝCH PUBLIKACÍ

Dizertační práce vychází z těchto publikací:

Kváč M, McEvoy J, Loudová M, Stenger B, Sak B, Květoňová D, Ditrich O, **Rašková V**, Moriarty E, Rost M, Macholán M, Piálek J. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). Int. J. Parasitol. 2013; 43(10): 805–817.

Kváč M, Havrdová N, Hlásková L, Daňková T, Kanděra J, Ježková J, Vítovec J, Sak B, Ortega Y, Xiao LH, Modrý D, Chelladurai JRJJ, **Prantlová V**, McEvoy J. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. PLoS One 2016; 11, 1–24.

**Rašková V**, Květoňová D, Sak B, McEvoy J, Edwinston A, Stenger B, Kváč M. Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. J. Clin. Microbiol. 2013; 51(1): 360–362.

## PROHLÁŠENÍ SPOLUAUTORŮ

Prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D. jako hlavní autor dvou publikací prohlašuje v zastoupení dalších spoluautorů, že se Ing. Bc. Veronika Prantlová podstatným způsobem podílela na publikacích, přiložených k této disertační práci.

Kváč M, McEvoy J, Loudová M, Stenger B, Sak B, Květoňová D, Ditrich O, **Rašková V**, Moriarty E, Rost M, Macholán M, Piálek J. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). Int. J. Parasitol. 2013; 43(10): 805–817.

Kváč M, Havrdová N, Hlásková L, Daňková T, Kanděra J, Ježková J, Vítovec J, Sak B, Ortega Y, Xiao LH, Modrý D, Chelladurai JRJJ, **Prantlová V**, McEvoy J. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. PLoS One 2016; 11, 1–24.

V zastoupení spoluautorů

---

prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

## DALŠÍ PUBLIKACE

Na následujících impaktovaných publikacích jsem spolupracovala, ale přímo se netýkají tématu disertační práce:

**Rašková V**, Čítek J. Incidence of insect bite hypersensitivity in a small population of warmblood horse breed in the Czech Republic. *J. Eq. Vet. Sci.* 2019; 33: 427–432.

Čítek J, Vostrý H, Vostrá-Vydrová H, Brzáková M, **Prantlová V**. Genetic parameters of insect bite hypersensitivity in the Old Grey Kladruher horse. *J. Anim. Sci.* 2017; 95(1): 53–58.

Ribas A, Saijuntha W, Agatsuma T, **Prantlová V**, Poonlaphdecha S. Rodents as a source of *Salmonella* contamination in Wet markets in Thailand. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016; 16(8): 537–540.

## SEZNAM PŘÍSPĚVKŮ NA KONFERENCÍCH

**Rašková V**, Stanko M, Vávra J, Sak B, Květoňová D, Kváč M. Druhá variabilita kryptosporidií infikujících hlodavce čeledi myšovitých v České a Slovenské republice – předběžné výsledky. X. české a slovenské parazitologické dny. Brno, Česká Republika, 28. 5. – 1. 6. 2012 (přednáška).

**Rašková V**, Stanko M, Vávra J, Sak B, Květoňová D, Kváč M. The variability of *Cryptosporidium* spp. infecting rodents of family Muridae in the Czech Republic and Slovakia. The 12<sup>th</sup> International Workshops on Opportunistic Protists, New York, USA, 5. – 8. 8. 2012 (poster).

Kváč M, McEvoy J, Loudová M, Stenger B, Sak B, Květoňová D, Ditrich O, **Rašková V**, Moriarty E, Rost M, Macholán M, Piálek J. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the House Mouse. 43. Jírovcovy protozoologické dny, Nový Dvůr u Týna nad Vltavou, Česká republika, 6. – 10. 5. 2013 (přednáška).

Kváč M, McEvoy J, Loudová M, Stenger B, Sak B, Květoňová D, Ditrich O, **Rašková V**, Moriarty E, Rost M, Macholán M, Piálek J. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the House Mouse. *Mus studenticus* (workshop), Mohelský mlýn, Česká republika, 5. – 6. 6. 2014 (přednáška).

**Prantlová V**, Sak B, Květoňová D, McEvoy J, Ortega Y, Albrecht T, Piálek J, Rost M, Kváč M. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* in two European House Mice (*Mus musculus musculus* and *Mus m. domesticus*): Preliminary results. 45. Jírovcovy protozoologické dny, Dublovice, Česká republika, 11. – 15. 5. 2015 (přednáška).



## GRANTY

Práce vznikla za podpory následujících grantů:

GAJU 022/2010/Z – Využití genetických a biotechnologických postupů při upevňování zdraví zvířat (2010 – 2012; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

GAJU 011/2013/Z – Zdraví hospodářských zvířat a zdravotní bezpečnost potravin – genetické, parazitární a nutriční aspekty (2013 – 2015; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

MŠMT LH11061 – Diverzita, biologie a fylogenetika kryptosporidií parazitujících u hlodavců (2011–2014; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

GAČR 15-01090S – Rozkrývání rozmanitosti kryptosporidií: propojení studia genetické variability a biologie parazitů (2015 – 2017; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

GAČR 206/08/0640 – Imunogenetické studium hybridní zóny myši domácí (2008 – 2012; řešitel: prom. Biol. Jaroslav Piálek, CSc., prof. RNDr. Miloš Macholán, CSc.).

Grantový projekt, jehož byla autorka řešitelkou, ale nemá vztah k tématu disertační práce:

FRVŠ 700/2013 – Příprava trvalých parazitologickým preparátů a učebních textů pro praktickou výuku (2013; řešitelky: Ing. Bc. Veronika Prantlová a Ing. Pavla Wagnerová, Ph.D.).

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na prvním místě bych chtěla srdečně poděkovat svému školiteli a vedoucímu práce panu prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, znalosti a zkušenosti, které mi trpělivě předával, vstřícnost, trpělivost a za čas, který mi věnoval během celého doktorského studia.

Dále děkuji všem zaměstnancům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie za veškerou pomoc a skvělou pracovní atmosféru, a Parazitologickému ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i., na jehož půdě se výše uvedená laboratoř nachází, za poskytnutí inspirativního prostředí a zázemí pro můj výzkum.

Děkuji všem spoluautorům publikací za vynikající spolupráci, a zejména pak výzkumnému kolektivu Ústavu biologie obratlovců AVČR, v.v.i. za jejich obětavou pomoc při odchytu myší a získávání materiálu k mé práci

V neposlední řadě patří obrovský dík mé rodině, manželovi a přátelům za pomoc, trpělivost a podporu během mého studia.

## ANOTACE

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření jednobuněční parazitičtí prvoci z kmene Apicomplexa, kteří infikují široké spektrum obratlovců včetně člověka. Exogenní vývojová stádia kryptosporidií jsou odolná vůči většině desinfekčních prostředků a do současné doby nebyla vyvinuta účinná léčiva. Za posledních 30 let intenzivního studia těchto organismů byly velmi dobře prostudovány kryptosporidiové infekce lidí i řady hospodářských zvířat, ale naše znalosti o kryptosporidiích u drobných savců byly nedostatečné. V posledních letech byly provedeny podrobné studie kryptosporidií u řady hlodavců, zejména myšic, hrabošů, potkanů nebo stromových a zemních veverek. Tato práce si klade za cíl doplnit do mozaiky našich znalostí údaje o prevalenci, diverzitě a biologických vlastnostech kryptosporidií myši domácí (*Mus musculus*), která je nejběžnějším nevídaným návštěvníkem lidských sídel.

### **Klíčová slova:**

*Cryptosporidium* spp.; *Mus musculus*; prevalence; diverzita; morfologie oocyst; experimentální infekce; molekulární analýza; genotypizace.

## **ANNOTATION**

*Cryptosporidium* spp. are globally distributed unicellular parasitic protozoa of the phylum Apicomplexa that infect a wide range of vertebrates, including humans. Their exogenous developmental stages are resistant to most disinfectants and no effective drugs have been developed to date. *Cryptosporidium* infections of humans and many livestock have been well studied over the past 30 years, but our knowledge of *Cryptosporidium* spp. in small mammals has been inadequate. Recently, detailed studies of cryptosporidia have been carried out in a number of rodents, especially mice, voles, rats or tree and ground squirrels. This thesis aims to add to our mosaic of knowledge data on the prevalence, diversity and biological characteristics of cryptosporidia in the house mouse (*Mus musculus*), the most common unwelcome visitor to human settlements.

### **Keywords:**

*Cryptosporidium* spp.; *Mus musculus*; prevalence; diversity; oocyst morphology; experimental infections; molecular analysis; genotyping.

## SOUHRN

V této disertační práci byla prostudována diverzita a biologie kryptosporidií, parazitujících u myši domácí (*Mus musculus*). V letech 2007 – 2014 probíhaly odchyt myší domácích v oblasti hranice západních Čech a severovýchodního Bavorska, v části takzvané hybridní zóny myši domácí. Získané vzorky byly mikroskopickými a molekulárními metodami vyšetřeny na přítomnost kryptosporidií. Prevalence kryptosporidií ve sledované populaci byla celkem 23 %, u myší bylo v přirozené infekci nalezeno pět druhů/genotypů kryptosporidií: *Cryptosporidium muris*, *C. tyzzeri*, *C. parvum*, *C. hominis* a *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II. U 13 vzorků byla detekována smíšená infekce dvou druhů kryptosporidií. U myší, přirozeně infikovaných *C. tyzzeri*, byl molekulárními metodami a fylogenetickou analýzou prokázán mechanismus koevoluce: subtyp *C. tyzzeri* IXa se přirozeně vyskytuje u poddruhu myši domácí *Mus musculus musculus*, zatímco subtyp *C. tyzzeri* IXb u *M. m. domesticus*. Zároveň bylo pomocí experimentální infekce ověřeno, že oba subtypy *C. tyzzeri* jsou infekční pro oba poddruhy myši domácí. Žádné z přirozeně ani experimentálně infikovaných zvířat nevykazovalo klinické příznaky kryptosporidiózy. Dále byla zdokumentována případová studie lidské kryptosporidiózy, způsobené smíšenou infekcí *C. parvum* a obou subtypů *C. tyzzeri*, a to včetně podrobného popisu průběhu patentní periody nákazy. Jedná se o jeden z nejlépe zmapovaných případů přirozené kryptosporidiové infekce u člověka. V neposlední řadě byl popsán nový druh kryptosporidie, který byl pojmenován *Cryptosporidium proliferans*. Tento druh byl dříve považován za *C. muris*. Pomocí experimentální infekce, morfometrické, fylogenetické a histopatologické analýzy bylo prokázáno, že se *C. proliferans* od *C. muris* výrazně liší. *Cryptosporidium proliferans* způsobuje na rozdíl od *C. muris* klinické a patologické změny, včetně úbytku hmotnosti a masivní proliferace žaludeční sliznice, která je spojena s téměř šestinásobným zvýšením hmotnosti žaludku.

## SUMMARY

In this thesis, the diversity and biology of *Cryptosporidium* spp. in the house mouse (*Mus musculus* sp.) was studied. Between 2007 and 2014, trapping of house mice took place in the area of the border between western Bohemia and north eastern Bavaria, in part of the so-called house mouse hybrid zone. The collected samples were examined by microscopic and molecular methods for the presence of cryptosporidia. The prevalence of cryptosporidia in the studied population was 23% in total, and five species/genotypes were found in natural infection in mice: *Cryptosporidium muris*, *C. tyzzeri*, *C. parvum*, *C. hominis* and *Cryptosporidium* sp. apodemus genotype II. Mixed infection of two *Cryptosporidium* species was detected in 13 samples. In mice naturally infected with *C. tyzzeri*, a mechanism of coevolution was demonstrated by molecular methods and phylogenetic analysis: the *C. tyzzeri* IXa subtype occurs naturally in the domestic mouse subspecies *Mus musculus musculus* while the *C. tyzzeri* IXb subtype occurs naturally in *M. m. domesticus*. At the same time, it was verified by experimental infection that both subtypes of *C. tyzzeri* are infectious to both subspecies of the house mouse. None of the naturally or experimentally infected animals showed clinical signs of cryptosporidiosis. Furthermore, a case study of human cryptosporidiosis caused by mixed infection with *C. parvum* and both subtypes of *C. tyzzeri* was documented, including a detailed description of the course of the patent period. This is one of the best mapped cases of natural cryptosporidial infection in humans. Finally, a new species of *Cryptosporidium* has been described and named *Cryptosporidium proliferans*. This species was previously considered to be *C. muris*. Using experimental infection, morphometric, phylogenetic and histopathological analysis, this species was shown to be significantly different from *C. muris*. In contrast to *C. muris*, *C. proliferans* clinical and pathological changes, including weight loss and massive proliferation of the gastric mucosa that is associated with an almost sixfold increase in stomach weight.

# OBSAH

1. Úvod .....	16
2. Cíl práce.....	19
3. Literární přehled.....	20
3.1 Kryptosporidie a kryptosporidióza .....	20
3.1.1 Taxonomie.....	20
3.1.2 Vývojový cyklus.....	21
3.1.3 Zdroj a přenos infekce .....	24
3.1.4 Hostitelská specifita.....	26
3.1.5 Klinické projevy infekce .....	27
3.1.6 Prevence a terapie onemocnění .....	28
3.2 Myš domácí ( <i>Mus musculus</i> ).....	29
3.2.1 Původ myši domácí a vznik hybridní zóny .....	29
3.3 Kryptosporidie myši domácí .....	32
3.3.1 Žaludeční kryptosporidie myši domácí.....	32
3.3.2 Střevní kryptosporidie myši domácí .....	36
4. Materiál a metodika.....	41
4.1 Materiál .....	41
4.1.1 Odchyt zvířat .....	41
4.1.2 Manipulace se zvířaty .....	42
4.1.3 Biologický materiál .....	42
4.1.4 Experimentální infekce – laboratorní modely .....	43
4.1.5 Případová studie .....	43
4.2 Metodika .....	44
4.2.1 Koprologické vyšetření a určení intenzity infekce .....	44
4.2.2 Morfometrická analýza oocyst .....	44
4.2.3 Purifikace oocyst .....	44
4.2.4 Test životaschopnosti oocyst.....	45
4.2.5 Experimentální infekce zvířat .....	45
4.2.6 Histopatologická analýza .....	46
4.2.7 Molekulární analýza .....	46
4.2.8 Sekvence.....	48

4.2.9	Fylogenetická analýza.....	48
4.2.10	Vyhodnocení výsledků a statistické analýzy.....	49
5.	Shrnutí výsledků a diskuze .....	50
5.1	Prevalence a diverzita kryptosporidií u myši domácí.....	50
5.1.1	Kryptosporidie u myši ve sledované populaci .....	50
5.1.2	Fylogenetická analýza detekovaných kryptosporidií.....	52
5.2	Koevoluce <i>C. tyzzeri</i> a myši domácí.....	67
5.2.1	Fylogenetická analýza vzorků z hybridní zóny .....	67
5.2.2	Experimentální infekce .....	68
5.3	Popis nového druhu <i>Cryptosporidium proliferans</i> .....	70
5.3.1	Fylogenetická analýza <i>C. proliferans</i> .....	70
5.3.2	Biologické vlastnosti <i>C. proliferans</i> .....	71
5.4	Případová studie lidské kryptosporidiózy .....	73
6.	Závěry.....	75
7.	Publikace 1 .....	77
8.	Publikace 2 .....	91
9.	Publikace 3 .....	116
10.	Reference .....	120



# 1. ÚVOD

Kryptosporidie jsou jednobuněčná parazitická protista, jež infikují celou řadu obratlovců včetně člověka. Tyto kosmopolitní a ubikvitní organismy byly poprvé popsány již na počátku 20. století (Tyzzer 1907). U řady druhů a genotypů kryptosporidií je intenzita vylučování infekčních stádií poměrně nízká (Kváč *et al.* 2013a). Oocysty střevních, respektive žaludečních druhů a genotypů kryptosporidií jsou často morfologicky a morfometricky identické a nelze je od sebe klasickými parazitologickými metodami odlišit (Morgan *et al.* 1998a). Z tohoto důvodu nám zůstávala obrovská druhová diverzita rodu *Cryptosporidium* po dlouho dobu skryta. Po zavedení metody PCR (polymerase chain reaction, Mullis 1985) do rutinní diagnostiky se znalosti o diverzitě kryptosporidií rychle prohlubovaly. Metoda PCR je natolik citlivá, že dokáže ve vzorku odhalit i DNA několika málo oocyst (Minarovičová *et al.* 2007). Následná sekvenace umožnila detekovat i nepatrné odchylky v genomu jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií a snadno je tak rozlišit. Díky tomu bylo možné začít studovat do hloubky diverzitu a variabilitu mezi těmito organismy i v prostředí (Zhou *et al.* 2003).

Patogenita kryptosporidií se liší v závislosti na druhu a genotypu. Některé druhy a genotypy kryptosporidií jsou specifické pro jednoho hostitele (např. *C. wrairi* u morčat, Vetterling *et al.* 1971), nebo pro určitou skupinu hostitelů, jako jsou například *C. muris* u hlodavců (Lv *et al.* 2009), nebo *C. bailey* u ptáků (Current *et al.* 1986). Jiné druhy kryptosporidií, například *C. parvum* a *C. ubiquitum*, mohou infikovat široké spektrum hostitelů (DuPont *et al.* 1995; Fayer *et al.* 2010; Guk *et al.* 2004; Torres *et al.* 2000). Průběh infekce u hostitele se liší dle věku, kondice, imunitní zralosti organismu a dalších faktorů (Cacciò *et Putignani* 2014; Desai *et al.* 2012). Onemocnění, zvané kryptosporidióza, má různý průběh v závislosti na hostiteli a druhu kryptosporidie, například u myši a dospělých prasat probíhá bezpříznakově (Kváč *et al.* 2013a; Němejc *et al.* 2013; Tarazona *et al.* 1998), naproti tomu nákaza *C. parvum* telat se typicky projevuje silnými vodnatými průjmy (Al Mawly *et al.* 2015; Faubert *et Litvinsky* 2000).

U imunokompetentních lidí způsobují kryptosporidie obvykle mírné infekce, které jsou často inaparentní a samy spontánně vymizí (Shahiduzzaman *et Dauschies* 2012), vyjimečněji je provázejí vodnaté průjmy, křeče v břiše, někdy i zvracení (Desai *et al.*

2012; **publikace 3**). U imunodeficientních nebo imunosuprimovaných osob, děti s nedostatečně vyvinutou imunitou, či v horším výživovém stavu, mohou naproti tomu infekce probíhat velmi bouřlivě a někdy končit i smrtí (Desai *et al.* 2012; Dillingham *et al.* 2002; Guk *et al.* 2004; Sunnotel *et al.* 2006).

Za posledních třicet let intenzivního studia kryptosporidií byla prozkoumána jejich diverzita i biologie u řady různých zvířecích hostitelů, například u hospodářských zvířat (Kváč *et al.* 2008a; Laatumna *et al.* 2015; Němejc *et al.* 2012; Ryan *et al.* 2005, Wagnerová *et al.* 2015), nebo hlodavců (Čondlová *et al.* 2018, 2019; Horčíčková *et al.* 2019; Ježková *et al.* 2021a, 2021b; Kváč *et al.* 2018; Lv *et al.* 2009; Ng-Hublin *et al.* 2013; Paparini *et al.* 2012; Ren *et al.* 2012, Stenger *et al.* 2018, **publikace 1**). A právě hlodavci hrají vzhledem ke svému značnému reprodukčnímu potenciálu významnou roli v mnoha ekosystémech. Vedle důležitého zdroje potravy pro predátory jsou významnými škůdci a přenašeči celé řady onemocnění nejen na hospodářská zvířata, ale také na člověka (Elsheikha *et al.* 2009; Hunter *et Thomson* 2005; Mackenstedt *et al.* 2015; **publikace 3**).

Co se týká znalostí problematiky výskytu kryptosporidiových infekcí u hlodavců z čeledi Muridae, byla na konci dvacátého a počátku jednadvacátého století provedena řada studií, v nichž byla identifikace oocyst kryptosporidií založena pouze na morfologických či morfometrických znacích oocyst, a nalezené kryptosporidie byly popsány jako *Cryptosporidium muris*-like a *C. parvum*-like (Bajer *et al.* 2001, 2002; Bednarska 2003; Chalmers *et al.* 1997; Laakkonen *et al.* 1994; Torres *et al.* 2000). To je z pohledu současných znalostí nedostatečný metodický přístup, na jehož základě nelze vyvozovat relevantní závěry. V řadě případů se pravděpodobně jednalo o infekce různými druhy a genotypy kryptosporidií (Xiao *et Fayer* 2008). Navíc takto získané výsledky mohou být vzhledem k nízké senzitivitě mikroskopického vyšetření podhodnocené a neodráží skutečný stav promořenosti populací hostitelů kryptosporidii. Je zřejmé, že bez molekulárních analýz na úrovni druhů a genotypů kryptosporidií není možné porozumět jejich diverzitě, epidemiologii, ani zoonotickému potenciálu (Xiao *et Fayer* 2008).

Podčeleď pravých myší (Murinae) se řadí k hospodářsky nejdůležitějším skupinám hlodavců. Mezi nejvýznamnější zástupce této podčeledi patří myš domácí (*Mus musculus*), která se také ze všech evropských hlodavců nejčastěji vyskytuje

v bezprostřední blízkosti člověka (Berry 1981). U myši domácí byly do současnosti celosvětově popsány a molekulárně doloženy přirozené infekce různými druhy a genotypy rodu *Cryptosporidium*, mimo jiné druhy *C. muris*, *C. andersoni*, *C. parvum*, *C. tyzzeri*, *C. meleagridis* a *C. ubiquitum*, přičemž všechny uvedené druhy jsou infekční také pro člověka (Feng 2010; Kváč *et al.* 2009; **publikace 3**).

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je rozšířit a prohloubit dosavadní poznatky o kryptosporidiích, které se vyskytují u myši domácí. Význam práce spočívá v komplexním řešení problematiky biologie, diverzity a fylogeneze kryptosporidií u obou poddruhů myši domácí, které žijí na území střední Evropy. K tomuto studiu budou použity metody mikroskopické, experimentální, histologické i molekulárně-biologické.

Díličimi cíli jsou:

- (1) analýza diverzity kryptosporidií myši domácí pomocí multilokusové genotypizace,
- (2) studium koevoluce kryptosporidií v rámci hybridní zóny myši domácí, která se vyskytuje na území Evropy,
- (3) charakteristika průběhu kryptosporidiové infekce myši domácí,
- (4) posouzení role hlodavců jako možného zdroje zoonotických kryptosporidií, potenciálně ohrožujících člověka.

## 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Kryptosporidie a kryptosporidióza

#### 3.1.1 Taxonomie

Kryptosporidie jsou jednobuněční protozoární paraziti z čeledi Cryptosporidiidae, kmene Apicomplexa. Pro všechny zástupce kmene Apicomplexa je typický tzv. apikální komplex, ne u všech však obsahuje všechny orgány. Tento komplex umožňuje proniknutí parazita do hostitelské buňky. U kryptosporidií se dále podílí na výstavbě parazitiformního saku, jehož vznik je součástí vývojového cyklu (Haussmann *et* Hülsmann 2003). Většina organismů kmene Apicomplexa má životní cyklus složený ze sexuální a asexuální fáze. Z důvodu podobné morfologie a lokalizace vývoje v gastrointestinálním traktu hostitele, byly kryptosporidie dříve řazeny mezi kokcidie (Fayer *et al.* 1997; Chacín-Bonilla 2007; Xiao *et* Fayer 2008). Existuje však řada významných rozdílů mezi kryptosporidiemi a kokcidiemi (Ryan *et* Xiao 2014):

- 1) endogenní stádia kryptosporidií jsou přichycena na apikální povrch hostitelské buňky (epiplazmatická lokalizace),
- 2) v místě připojení vzniká multimembránová feeder organela, jíž se parazit vyživuje,
- 3) vznikají dva typy oocyst – exogenní silnostěnné oocysty a endogenní tenkostěnné oocysty, které jsou následně schopné vyvolat autoinfekci,
- 4) oocysty jsou menší než u kokcidí a postrádají morfologické struktury vlastní kokcidiím (sporocysta, mikropyle, polární tělísko),
- 5) kryptosporidie není možno detekovat testy na kokcidie,
- 6) pravděpodobně jsou ve vývojovém cyklu kryptosporidií přítomna extracelulární stádia, podobná gamontu v životním cyklu gregarin.

Molekulárními studiemi bylo následně prokázáno, že kryptosporidie mají nejen z biologického, ale i z fylogenetického hlediska blíže ke gregarinám (Carreno *et al.* 1999).

Na základě rozdílů v morfologii oocyst, lokalizaci vývojového cyklu, hostitelské specifitě a infektivitě bylo do současnosti popsáno 49 platných druhů kryptosporidií. Řada genotypů je pojmenována podle hostitele, ve kterém byly nalezeny

(např. *Cryptosporidium* sp. horse genotyp u koní), environmentální genotypy jsou pak často odlišeny pouze kódy (např. *Cryptosporidium* sp. SV30). Dá se předpokládat, že i tyto genotypy budou v budoucnu důkladně popsány a následně potvrzeny jako samostatné druhy (Xiao *et al.* 2004a).

### 3.1.2 Vývojový cyklus

Nejlépe je vývojový cyklus prozkoumán u druhů *C. parvum* a *C. muris* (O'Donoghue 1995; O'Hara *et al.* 2005; Riggs *et al.* 1997; Tyzzer 1910; Upton *et al.* 1985; Valigurová *et al.* 2008), které jsou také považovány za referenční druhy střevních, respektive žaludečních kryptosporidií. Ve většině případů probíhá vývojový cyklus v gastrointestinálním traktu, či v kloace ptáků, méně častěji v traktu respiratorním a dalších orgánech (Current *et al.* 1986; Fayer 2010; Goodstein *et al.* 1989; Guselle *et al.* 2003; O'Donoghue 1995; Xiao *et al.* 2004a). Lokalizace cyklu je druhově specifická. Kryptosporidie byly nalezeny také mimo gastrointestinální trakt, například v játrech (Kahn *et al.* 1987), žlučníku (Hinnant *et al.* 1989), lymfatických uzlinách, močovém měchýři, děloze a varlatech (Fleta *et al.* 1995), tracheji (Sponseller *et al.* 2014) nebo v oku (Baskin 1996).

Dlouho se předpokládalo, že ve vývojovém cyklu dalších druhů rodu *Cryptosporidium* se vyskytují pouze nepatrné odchylky. V žaludečních žlázách živorožky duhové však byl popsán nový druh kryptosporidie, *C. huwi*, který původní domněnku zpochybňuje. Tento druh je lokalizován nejen na povrchu žaludečního epitelu, ale také uvnitř mukózy, a má mírně odlišný životní cyklus ve srovnání s ostatními druhy kryptosporidií (Ryan *et al.* 2015).

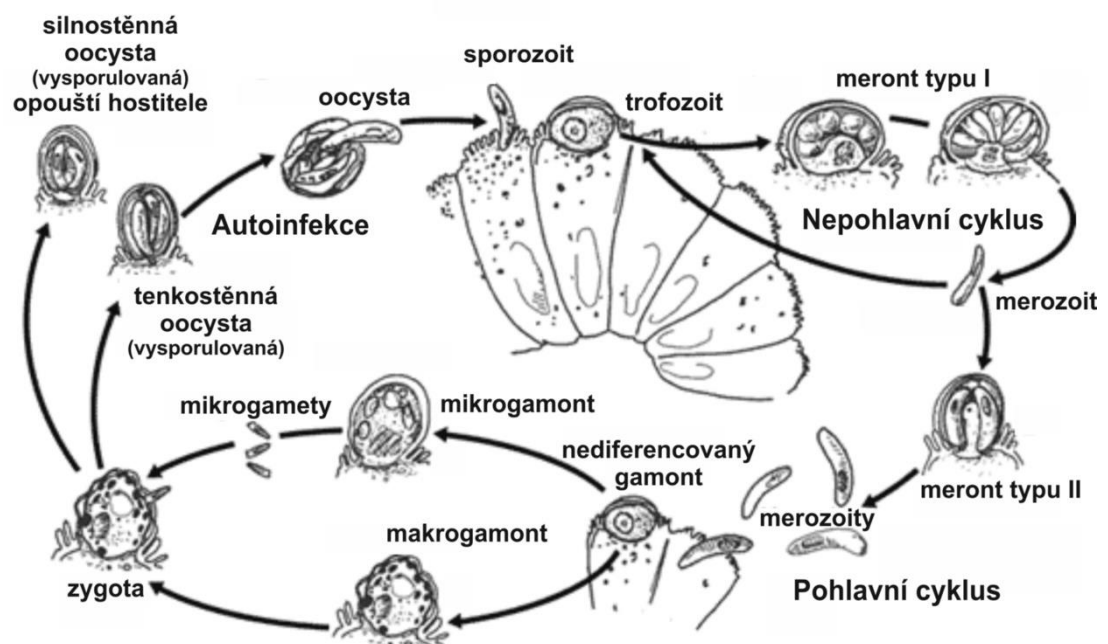
Vývojový cyklus kryptosporidií (Obr. 1) je jednohostitelský a dělí se do pěti hlavních fází: excystace, invaze hostitelské buňky, merogonie, gametogonie a sporogonie (Fayer *et al.* 1997; Thompson *et al.* 2005).

#### 3.1.2.1 Excystace

Oocysty jsou velmi odolná infekční stádia kryptosporidií. Obsahují čtyři volně uložené sporozoity a relativně velké reziduální tělísko. V okamžiku pozření nebo vdechnutí oocysty hostitelem začíná endogenní fáze vývojového cyklu. Když se oocysta dostane do těla hostitele, dochází k otevření stěny oocysty v místě zvaném sutura a k uvolnění sporozoitů – excystaci (Fayer *et al.* 1986). Ta je u většiny

žaludečních kryptosporidií podmíněna narušením stěny oocysty kyselým prostředím žaludku, u střevních pak pankreatickými enzymy nebo žlučovými solemi v duodenu. Experimentálně však bylo prokázáno, že k excystaci může dojít i při vyšší teplotě ve vodním prostředí (Widmer *et al.* 2007). Žaludeční kryptosporidie excystují výhradně v žlázaté části žaludku. Jejich sporozoity jsou adaptovány na nízké pH žaludku, jež by u sporozoitů střevních druhů vedlo k inaktivaci (Widmer *et al.* 2007).

**Obrázek 1:** Vývojový cyklus kryptosporidií (Centers for Disease Control and Prevention 2010, www.cdc.gov, upraveno autorkou).



### 3.1.2.2 Invaze hostitelské buňky

Excystované sporozoity jsou velmi pohyblivé a schopné přichytit se na povrch epiteliální buňky a aktivně ji napadnout (Wetzel *et al.* 2005). K tomu jim pomáhá přítomnost sekrečních organel i apikálního komplexu (O'Hara *et al.* 2005). Jeho součástí je i glykoprotein CSL, obsahující ligandy, jež v průběhu invaze napomáhají přichycení sporozoitů k epiteliálním buňkám (Langer *et Riggs* 1999; Riggs *et al.* 1997). Dalšími významnými faktory, které se podílejí na invazi hostitelské buňky, jsou mucin (Cevallos *et al.* 2000) a trombospondin (Spano *et al.* 1998). Po přichycení sporozoitu dochází ke vzniku parazitoformního saku (Current *et Garcia* 1991), následně se změní tvar sporozoitu z měsíčkovitého na kulovitý. Parazit je obklopen cytoplazmatickou membránou mikrovillů hostitelské buňky (Umemiya *et al.* 2005).

Po dokončení tohoto procesu dochází k přeměně na trofozoit. Jeho jádro se dělí a následuje nepohlavní rozmnožování – merogonie.

### 3.1.2.3 Merogonie

Při merogonii dochází k dělení jádra trofozoitu. U kryptosporidií obecně probíhá nepohlavní rozmnožování ve dvou cyklech. Nejprve se vytváří meront typu I, který obsahuje šest až osm merozoitů, což jsou vývojová stádia podobná sporozoitům. Zralé merozoity opouští meront, infikují další hostitelské buňky a vyvíjí se opět v meront typu I, případně v meront typu II. Meronty typu II vytváří čtyři merozoity (Aydin 1997; Melicherová *et al.* 2014). U druhu *C. bailey* se následně vytváří ještě meronty typu III, které obsahují osm merozoitů (Current *et al.* 1986). Poslední generace merozoitů vstupuje do pohlavní fáze vývojového cyklu – gametogonie (Valigurová *et al.* 2008).

### 3.1.2.4 Gametogonie

Pohlavní fáze vývojového cyklu je zahájena, když merozoity poslední generace infikují hostitelskou buňku a přemění se ve vícejaderný samčí mikrogamont nebo jednojaderný samičí makrogamont (O'Donoghue 1995). Z mikrogamontů jsou uvolňovány pohyblivé mikrogamety, které splývají s makrogametami za vzniku zygot. Proces vzájemného rozpoznání samčích a samičích buněk nebyl zatím zcela prozkoumán. Pouze oplozené makrogamonty se však mohou dále vyvíjet v oocystu. Po oplození se vytváří trilaminární stěna a následuje sporogonie (Current *et al.* 1987).

### 3.1.2.5 Sporogonie

Zygota, vzniklá po oplození, prochází sporogonií, při které se endogenní sporulací ve zralé oocystě vytvářejí čtyři sporozoity (Fayer 1997). Mohou vznikat dva typy oocyst: tenkostěnné oocysty, které excystují ještě v hostitelském organismu a podílí se na autoinfekci, nebo silnostěnné oocysty, které opouští hostitele spolu s trusem (v případě kryptosporidií z respiračního traktu jsou zralé oocysty vylučovány se slizničním sekretem), a slouží k přenosu infekce na další vnímavé hostitele (Fayer 2004). U druhu *C. parvum* vzniká přibližně 20 % tenkostěnných oocyst a 80 % silnostěnných oocyst, které jsou zodpovědné za infekci dalších hostitelů (Current 1985, 1988).



### 3.1.3 Zdroj a přenos infekce

Kryptosporidie se šíří fekálně-orální cestou prostřednictvím velmi rezistentních oocyst (Cacciò *et Putignani* 2014; Chalmers *et Davies* 2010; Smith *et al.* 2006). Vysoká odolnost oocyst je zajištěna přítomností trilaminární ochranné vrstvy ve stěně oocysty, díky níž dokáží přežít i v nepříznivém vnějším prostředí. Oocysty mohou být přenášeny buď přímým kontaktem s infikovaným jedincem (člověk–člověk, člověk–zvíře, zvíře–zvíře), kontaktem s výkaly nakaženého jedince, případně vdechnutím, nebo požitím fekálně kontaminované vody nebo potravy (Cacciò 2005; Gait *et al.* 2008). Experimentálně bylo prokázáno, že k propuknutí infekce stačí i jediná oocysta kryptosporidií (Benamrouz *et al.* 2012; Huang *et al.* 2003).

Přenos kontaminovanou vodou patří mezi nejčastější způsoby nákazy kryptosporidii (Domenéch-Sánchez *et al.* 2008; Mac Kenzie *et al.* 1994). Oocysty kryptosporidií byly nalezeny v pitné, užitkové, surové, povrchové i odpadní vodě (Johnson *et al.* 2000; Rose 1997). Kontaminace vody kryptosporidii je často způsobena silnými dešti a záplavami, které vyplaví úpravny vody, způsobí prosakování odpadních vod, nebo strhnou svrchní vrstvu půdy, hnojenou výkaly (Bringman *et al.* 1995; Yamamoto *et al.* 2000). Zdrojem nákazy může být také voda na koupalištích (Causer *et al.* 2006; Jones *et al.* 2006). V minulosti byla popsána řada významných epidemií kryptosporidiózy, způsobených kontaminovanou vodou. Dosud nejznámější je případ z Millwaukee (Wisconsin, USA), kde se v roce 1993 vlivem kontaminované pitné vody nakazilo více než 400 tisíc lidí (Mac Kenzie *et al.* 1994). Velmi často je původcem masivních infekcí u člověka, způsobenými kontaminovanou pitnou vodou, druh *C. hominis* (Fayer 2004; Widerström *et al.* 2014; Zahedi *et al.* 2016).

Přenos infekce potravou je méně častý, než přenos vodou. Mezi nejběžnější zdroje nákazy u lidí se řadí mořské plody, ovoce a zelenina, zřejmě proto, že snadno přijdou do kontaktu s kontaminovanou vodou (případně hnojivem vyrobeným z trusu infikovaných zvířat), a jsou často konzumovány nedostatečně tepelně upravené (Cacciò *et Putignani* 2014; Dawson 2005; Duhain *et al.* 2012; Robertson *et al.* 2005). Méně častější je nákaza nepasterizovanými mléčnými výrobky (Djuretic *et al.* 1997). Jedním z výrazných faktorů, který napomáhá šíření nákazy, jsou v některých

případech i nevyhovující hygienické podmínky farmářů, kteří s potravinami pracují (Fayer *et al.* 2000).

Přenos kryptosporidií ze zvířat na člověka probíhá přímým kontaktem s infikovaným zvířetem, nebo jeho výkaly. Nejvíce ohroženi jsou chovatelé zvířat, zaměstnanci farem a veterináři (Mahdi *et al.* 2002; Preiser *et al.* 2003; Rahman *et al.* 1985). Řada druhů kryptosporidií se vyznačuje širokou hostitelskou specifitou a zoonotickým potenciálem, mezi nimi i kryptosporidie, které infikují myši domácí (Fayer *et al.* 2000).

Největší zoonotický potenciál má *C. parvum*, jehož hlavním rezervoárem jsou přežvýkavci, zejména telata (Cacciò *et al.* Putignani 2014; Tanriverdi *et al.* 2006; Wielinga *et al.* 2008). Mezi další zoonotické druhy se řadí *C. ubiquitum*, které se vyskytuje u většiny savců, včetně člověka (Fayer *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2005; Liu *et al.* 2011; Nichols *et al.* 2010; Van Dyke *et al.* 2012). Za zoonotické a potenciálně rizikové pro člověka jsou považovány mimo jiné i kryptosporidie, vyskytující se u dometikovaných šelem – psů a koček – *C. canis*, respektive *C. felis* (Iseki *et al.* 1979; Xiao *et al.* Fayer 2008), dále *C. meleagridis*, které se vyskytuje primárně u ptáků, ale infikuje i savce (Akiyoshi *et al.* 2003a; Darabus *et al.* Olariu 2003), *C. cuniculus*, které je nejčastěji popisováno u zajícovitých, ale bylo nalezeno i u člověka a klokana (Koehler *et al.* 2014; Puleston *et al.* 2014), a také obě typicky hlodavčí kryptosporidie – *C. muris* a *C. tyzzeri* (Gatei *et al.* 2002; Kastumata *et al.* 2000; Palmer *et al.* 2003; **publikace 3**). *Cryptosporidium hominis*, které je typickou kryptosporidií člověka, je přirozeně či experimentálně infekční pro řadu druhů hospodářských zvířat (Deng *et al.* 2017; Giles *et al.* 2001; 2009; Jian *et al.* 2016; Laamama *et al.* 2015; Ryan *et al.* 2005), bylo nalezeno také u hlodavců (Danišová *et al.* 2017) nebo opic (Chen *et al.* 2019). Zvířata ale nejsou přirozenými hostiteli tohoto druhu a zoonotický přenos *C. hominis* není tak rizikový ve srovnání s přenosem z člověka na člověka (Robertson *et al.* 2014).

Horizontální přenos fekálně-orální cestou je běžný mezi zvířaty stejného i různých druhů. U lidí byl horizontální přenos zaznamenán v rodinách, školách, školkách, nemocnicích i domech s pečovatelskou službou, a také u homosexuálních mužů (Griffiths 1998; Hannah *et al.* Riordan 1988; Pedersen *et al.* 1996; Ribeiro *et al.* Palmer 1986).

Možnost vertikálního přenosu byla studována například u krav a ovcí (Faubert *et al.* 2000; Ye *et al.* 2013). Obě studie se shodují na tom, že v období porodu se zvyšuje množství vylučovaných oocyst, vertikální transmise však nepotvrdily a rozvoj infekce u novorozenečků mláďat přisuzují zátěži prostředí. Neexistují záznamy o vertikálním přenosu kryptosporidií u člověka.

### 3.1.4 Hostitelská specifita

Hostitelská specifita znamená, že určitý druh parazita je adaptovaný pouze na některé druhy hostitelů, které je schopen infikovat. Je jedním z typických znaků, které od sebe odlišují jednotlivé druhy kryptosporidií (Xiao *et al.* 2004). S rostoucí adaptací kryptosporidií se dle některých autorů zmírňují klinické příznaky a roste množství vylučovaných oocyst (Power *et al.* 2008). Jiní autoři však prokázali, že u vysoce hostitelsky specifických druhů kryptosporidií je intenzita vylučování oocyst jejich přirozenými hostiteli často velice nízká (Čondlová *et al.* 2018, 2019; Horčičková *et al.* 2019; Kváč *et al.* 2013a; Němejc *et al.* 2013; Tanriverdi *et al.* 2003; Tilley *et al.* 1991; **publikace 1**). Hostitelská specifita se ověřuje pomocí experimentálních infekcí, kdy oocystami, získanými z určitého zvířete (nebo člověka), jsou infikována zvířata jiného druhu. Pokud je dokončen životní cyklus, a zvíře vylučuje oocysty geneticky shodné s původním izolátem, je možné daný izolát považovat za infekční pro daný (experimentálně infikovaný) druh zvířete (Fayer 2008).

Zatímco některé druhy jsou schopny infikovat širokou škálu hostitelů (například druhy *C. ubiquitum* nebo *C. parvum*), jiné jsou specifické jen pro úzký okruh hostitelů (např. *C. wrairi* se typicky vyskytuje u morčat, *C. macropodum* u klokanů, *C. huwi* u některých druhů akvarijních ryb), nebo se omezují na jednu skupinu obratlovců, jako *C. muris* u hlodavců (Power *et al.* 2008; Ryan *et al.* 2015; Vetterling *et al.* 1971). Obecně se předpokládá, že většina kryptosporidií se vyznačuje úzkou hostitelskou specifitou (Xiao *et al.* 2004).

Kromě druhově specifických kryptosporidií jsou často nalézány u různých zvířat druhy nespecifické. U masožravců je často detekován výskyt netypických druhů kryptosporidií, kdy se pravděpodobně jedná pouze o pasáž infekce, kterou v sobě nesla jejich potrava nebo kořist (Kváč *et al.* 2021). Již byl popsán u lišek a kojetů (Kváč *et al.* 2021, Trout *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2004), či sov (Ng *et al.* 2006) výskyt *C. tyzzeri*, *C. muris* a *Cryptosporidium* sp. muscrat genotypu I, tedy druhů a genotypů, obvykle

infikujících jejich přirozenou potravu (hlodavce). Obvyklá je tato situace také u studenokrevných živočichů (plazů, želv a ještěrek), u nichž jsou také často nalézány specifické hlodavčí kryptosporidie (Pedraza-Díaz *et al.* 2019; Xiao *et al.* 2004b). Předpokládá se ale, že tyto netypické druhy kryptosporidií v nespecifickém hostiteli nevyvolají patentní infekci, ale že se jedná pouze o mechanickou pasáž oocyst (Xiao *et al.* 2004b).

### 3.1.5 Klinické projevy infekce

Projev infekce záleží na druhu kryptosporidie, lokalizaci infekce a imunitním stavu hostitele (Cacciò *et Putignani* 2014; Desai *et al.* 2012). Stav imunitního systému je jedním z nejdůležitějších faktorů, ovlivňujících průběh, ale i léčbu nákazy (Current *et Garcia* 1991; Nimri *et Batchoun* 1994). U imunodeficitních hostitelů probíhá mnohem závažněji a může vést až k život ohrožujícímu stavu (Dillingham *et al.* 2002; Guk *et al.* 2004; Sunnotel *et al.* 2006). Nejčastějším projevem nákazy u člověka je silný vodnatý průjem, který může být doprovázený bolestmi břicha, nevolností, zvracením, anorexií, zvýšenou teplotou a celkovou slabostí (Current *et Garcia* 1991; Mac Kenzie *et al.* 1994; Mathieu *et al.* 2004; **publikace 3**).

U hospodářských zvířat (prasata, skot, koně) a jejich mláďat jsou klinické příznaky často vyvolány infekcí *C. parvum*, u ovcí pak *C. xiaoi* (Diaz *et al.* 2015, 2018; Majeed *et al.* 2018). Naopak u divoce žijících zvířat je infekce velmi často inaparentní (Chalmers *et al.* 1997; Laakkonen *et al.* 1994; Němejc *et al.* 2013; Song *et al.* 2015). Bez klinických příznaků probíhá také například infekce *C. scrofarum* u prasat nebo *C. bovis* a *C. ryanae* u skotu (Fayer *et al.* 2005, 2008; Kváč *et al.* 2013a). I u hlodavců je nákaza často inaparentní (Čondlová *et al.* 2018, 2019; Horčíčková *et al.* 2019; nepublikované závěry této práce, viz Kap. 5.1 a 5.2).

Prepatentní perioda je doba od požití infekce schopné oocysty, přes dokončení vývojového cyklu, po vyloučení nově zmnožené oocysty (Fayer 2008). Experimentálně byla stanovena prepatentní perioda pro *C. parvum* 2 – 7 dní u telat (Tzipori *et al.* 1983), a 4 – 22 dní u člověka (DuPont *et al.* 1995), pro *C. muris* 6 – 21 dní u myši domácí (Matsui *et al.* 1999) a pro *C. tyzzeri* 4 – 6 dní u myši domácí (Ren *et al.* 2012).

Patentní perioda je doba, po kterou infikovaný jedinec vylučuje infekční oocysty. Liší se mezi jednotlivými druhy kryptosporidií a v rámci druhu je často odlišná u různých druhů hostitelů. Patentní perioda *C. parvum* byla 1 – 12 dní u telat a 1 – 20 dní u člověka (Fayer 2008), patentní perioda *C. tyzzeri* trvala u myši domácí 6 – 14 dní (**publikace 1**), ale také až 29 dní (Fayer 2008) a u člověka 14 dní (**publikace 3**).

### 3.1.6 Prevence a terapie onemocnění

Z hlediska prevence je třeba na prvním místě dodržovat základní hygienické návyky (Feng 2010). Oocysty kryptosporidií jsou velmi odolné a ve vodním prostředí přežívají velmi dlouho. K devitalizaci oocyst je nutné je vystavit teplotě minimálně 65 °C do dobu 20 minut, nebo vroucí vodě po dobu jedné minuty (Fayer 2004), spolehlivě jsou také inaktivovány zmrazením při teplotě -70 °C (Fayer *et al.* 1991, 1996, 1998). Oocysty dále poškozují UV záření (Bukhari *et al.* 1999), případně v kombinaci s ozonizací (Betancourt *et al.* 2004). Naopak jsou oocysty odolné vůči řadě desinfekčních prostředků, včetně těch na bázi chlóru (Duhain *et al.* 2012).

Na rozdíl od jiných parazitóz není léčba kryptosporidiózy pomocí antiparazitik efektivní. Ani látky, které se používají proti ostatním zástupcům kmene Apicomplexa, nejsou u kryptosporidií účinné (Abrahamsen *et al.* 2004). V posledních 20 letech byla testována řada terapeutik, která se ukázala jako částečně, nebo zcela neúčinná (Pinto *et al.* 2021, Shahiduzzaman *et al.* 2012; Valigurová *et al.* 2018), případně byla v dostatečně účinném množství zároveň toxická pro hostitelský organismus (Armson *et al.* 1999). Jediný v humánní medicíně schválený lék, nitazoxanid, je v omezené míře účinný u dětí, ale imunokompromitovaných pacientů byl bez efektu (Amadi *et al.* 2002; 2009), u zvířat je schválen lék halofuginon, který byl testován například u infekce *C. parvum* v chovech telat (de Waele *et al.* 2010; Villacorta *et al.* 1991).

## 3.2 Myš domácí (*Mus musculus*)

Myši hrají zásadní roli při distribuci zoonotických onemocnění. Snadno se adaptují, mají ohromnou reprodukční schopnost a žijí v těsné blízkosti člověka (García-Livia *et al.* 2020). Pojednání o jejich významu by svým rozsahem dalece přesáhly rozsah této publikace. Zde je nutné pojednat alespoň o původu myši domácí, neboť ten úzce souvisí se zaměřením našeho výzkumu.

### 3.2.1 Původ myši domácí a vznik hybridní zóny

Předek myši domácí pochází ze střední Asie před asi 1 miliónem let a před zhruba 0,5 miliónem let začaly divergovat jednotlivé poddruhy (Auffray *et* Britton-Davidian 2012; Bonhomme *et* Searle 2012; Duvaux *et al.* 2011; Geraldès *et al.* 2008). Jeden z těchto poddruhů, myš domácí východoevropská (*Mus musculus musculus*, dále v textu MMM), se následně rozšířil na rozsáhlé území Eurasie, sahající od střední a východní Evropy až na Dálný Východ. Podruh myš domácí západoevropská (*Mus musculus domesticus*, dále v textu MMD) migroval přes Malou Asii a severní Afriku do západní Evropy a později byl zavlečen i na americký kontinent (Auffray *et* Britton-Davidian 2012; Bonhomme *et* Searle 2012; Boursot *et al.* 1993; Cucchi *et al.* 2012; Duvaux *et al.* 2011; Guénet *et* Bonhomme 2003; Rajabi-Maham *et al.* 2008). V místě sekundárního kontaktu MMM a MMD se zformovala tzv. hybridní zóna.

Hybridní zóna je oblast, kde se setkávají dva blízkce příbuzné živočišné druhy nebo poddruhy, které jsou schopné se spolu křížit, tedy produkovat plodné potomky (Macholán *et al.* 2003). Na území České republiky se vyskytuje několik hybridních zón, například mezi ježkem východním (*Erinaceus roumanicus*) a západním (*E. europaeus*), vránou obecnou černou (*Corvus corone*) a vránou obecnou šedou (*C. cornix*), nebo mezi slepýšem křehkým (*Anguis fragilis*) a slepýšem východním (*Anguis colchica*) (Haas *et* Brodin 2005; Jablonski *et al.* 2021; Randler 2009; Zolotareva *et al.* 2020).

Evropská hybridní zóna myši domácí (HMHZ, Obr. 2) je úzký geografický areál, přibližně 2500 km dlouhý a 20 km široký, který prochází Evropou severojižním směrem a sahá od Severního k Černému moři (Albrechtová *et al.* 2012; Ďureje *et al.* 2012; Jones *et al.* 2011; Macholán *et al.* 2003). Mimo jiné protíná i nejzápadnější výběžek České republiky. Stabilita HMHZ je udržována rovnováhou mezi migrací

jednotlivých zvířat a selekcí proti hybridním jedincům. Tato selekce je způsobena například i nižší plodností hybridů (Albrechtová *et al.* 2012; Ďureje *et al.* 2012). Díky relativní rovnováze, která se v průběhu času vytvořila, může hybridní zóna sloužit jako přírodní laboratoř pro lepší pochopení mechanismů evolučních procesů a vzniku nových druhů (Albrechtová *et al.* 2012; Macholán *et al.* 2007, 2008, 2011; Teeter *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011).

**Obrázek 2:** Průběh hybridní zóny myši domácí na území Evropy (silná čára) a odhad jejího průběhu v Norsku (šrafovaná čára). Studované transekty (tmavé obdélníky): A – Dánsko, B – východní Holštýnsko (DE), C – Sasko a Thüringen (DE), D – východní Bavodsko (DE) a západní Česko (ČR), E – jichovýchodní Bavorsko (DE), F – východní Bulharsko. Tečkovaná čára značí hranice humidní kontinentální klimatické zóny na východě s čtyřmi dalšími zónami (shora proti směru hodinových ručiček): subarktickou (Skandinávie), humidní oceánskou (na západě), humidní a suchou subtropickou (na jihu) a semiaridní (na východě). Pro přehlednost není vyznačena nivální oblast Alp. (Baird *et Macholán* 2012).



V rámci HMHZ byli již detailně prostudovány dva organismy, roup myši (*Syphacia obvelata*) a kvasinka *Pneumocystis murina*. U obou z nich byla popsána tzv. matrjošková hybridní zóna, kdy tyto parazité kopírují genetickou strukturu svých hostitelů a vytváří svou vlastní hybridní zónu s hybridními (rekombinantními) jedinci, která geograficky odpovídá HZ jejich hostitelů (Goüy de Bellocq *et al.* 2018). Právě rekombinantní jedinci mohou mít velký epidemiologický význam: být příčinou vzniku nových onemocnění (King *et al.* 2015), rezistence bakterií k určitým lékům (Perron *et al.* 2012), nebo propuknutí náhlých epidemií. Příkladem je virus španělské chřipky, kde došlo podobným mechanismem k rekombinaci dvou různých kmenů (Gibbs *et al.* 2001). V rámci této práce byl podobný mechanismus studován i u kryptosporidií, specifických pro myši domácí (**publikace 1**).



### 3.3 Kryptosporidie myši domácí

Myšovití hlodavci jsou kosmopolitně rozšířeni a žijí v těsném kontaktu s hospodářskými a zájmovými zvířaty i s člověkem (García-Livia *et al.* 2020). Jsou důležitou součástí epidemiologie většiny zoonóz, včetně kryptosporidiózy (Kimura *et al.* 2007). Slouží jako hlavní rezervoáry a významní přenašeči původců onemocnění lidí a domácích zvířat (Kruse *et al.* 2004) a celosvětově jsou proto sledováni z hlediska ochrany veřejného zdraví. Často jsou také příčinou kontaminace vodních zdrojů (Jellison *et al.* 2002; Xiao *et al.* 2000a). Hlodavci hrají důležitou roli ve většině suchozemských ekosystémů jako zdroj potravy pro predátory (Feng 2010). Rapidně se množí a v rámci svého habitatu cyklicky migrují. Myši domácí i některé další druhy hlodavců na podzim ve větší míře osidlují lidská sídla, zejména hospodářské usedlosti (Berry 1981). Díky rozmanitosti a dynamice populací představují velmi vhodný studijní model (Bajer 2008). Ze všech těchto důvodů jsou také zajímavým objektem pro studium kryptosporidiových infekcí.

U divokých myši domácích byly v přirozené infekci do současnosti popsány následující druhy a genotypy kryptosporidií: *C. muris* (Chalmers *et al.* 1994), *C. tyzzeri* (Morgan *et al.* 1998b), *C. parvum* (Lv *et al.* 2009; Morgan *et al.* 1999a), *C. ubiquitum* (Fayer *et al.* 2010) a *Cryptosporidium* sp. mouse genotyp II (Foo *et al.* 2007), které jsou popsány v dalších kapitolách. Bohužel, řada starších studií, zaměřená na detekci kryptosporidií u hlodavců, využívala pouze mikroskopické diagnostiky těchto parazitů, popisuje je dle morfologie jako *C. muris*-like a *C. parvum*-like (Bajer *et al.* 2001, 2002; Bednarska 2003; Chalmers *et al.* 1997; Laakkonen *et al.* 1994; Torres *et al.* 2000), a nemá tedy v současnosti dostatečnou výpovědní hodnotu (Matos 2008).

#### 3.3.1 Žaludeční kryptosporidie myši domácí

Infekce žaludečními kryptosporidii není u zvířat obvykle provázena klinickými příznaky ani zánětlivými procesy v žaludeční sliznici (Iseki *et al.* 1989, Özkul *et al.* 1994). I přes to za charakteristické histopatologické změny, zjištěné například u mastomysí, skotu či opic, lze považovat hypertrofii, atrofii a metaplazii žláznatého epitelu a dilataci infikovaných žláz (Anderson 1987; Dubey *et al.* 2002; Kváč *et al.* Vítovec 2003; **publikace 2**).

Dosud byly u hlodavců popsány tři druhy žaludečních kryptosporidií, *C. muris*, *C. andersoni* a *C. proliferans*, které se liší svou hostitelskou specifitou (Morgan *et al.* 2000; Xiao *et al.* 2004, **publikace 2**). *Cryptosporidium muris* se typicky vyskytují u myšovitých hlodavců (Aydin *et al.* 1996; Chalmers *et al.* 1997; Iseki *et al.* 1989), zatímco *C. andersoni* je typickou kryptosporidií přežvýkavců (Enemark *et al.* 2002; Lindsay *et al.* 2000). *Cryptosporidium proliferans* je relativně recentně popsáný druh a je nalézán převážně u savců v Africe (Feng *et al.* 2007; Kodádková *et al.* 2010; Kváč *et al.* 2008a; Sak *et al.* 2013; **publikace 2**), typický hostitel zatím popsán není. V rámci obou druhů byly nalézány izoláty, které se mírně lišily svými morfologickými a biologickými vlastnostmi (Hikosaka *et al.* 2005; Kváč *et al.* 2003; Upton *et al.* 1985, **publikace 2**) a vyvstala potřeba vyvinout vhodný nástroj pro jejich bližší určení.

Prohloubení studia variability žaludečních kryptosporidií umožnila metodika MLST (multilocus sequence tool for typing, Feng *et al.* 2011a). V celém genomu žaludečních kryptosporidií bylo vytipováno několik mikro- a minisatelitních oblastí (MS1, MS2, MS3 a MS16), jejichž fylogenetická analýza identifikovala řadu subtypů v rámci těchto druhů kryptosporidií. Díky dalšímu využití této metody došlo k popsání řady nových subtypů a ukazuje se, že genetická divezita zejména u *C. muris* je velmi rozmanitá (Wang *et al.* 2012). I když u některých izolátů se může jednat pouze o vnitrodruhovou variabilitu (Xiao *et al.* 2004a), v současnosti převládá názor, že tyto druhy představují komplex dosud nepopsaných druhů, tak jak to bylo dříve prokázáno u skupiny střevních kryptosporidií (Feng *et al.* 2011a; Kváč *et al.* 2008a). Dá se předpokládat, že některé z těchto subtypů budou popsány jako samostatné druhy kryptosporidií (**publikace 2**).

#### 3.3.1.1 *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907

*Cryptosporidium muris* infikuje žláznatou část žaludku hlodavců. Poprvé byla tato kryptosporidie popsána Tyzzerem v roce 1907 a již byla detekována u široké škály hostitelských druhů. Kromě MMM, MMD, a myši střeozemní (*M. spretus*) (Chalmers *et al.* 1994, 1997; Kváč *et al.* 2012; Tores *et al.* 2000) byla přirozená infekce popsána například u potkana obecného (*Rattus norvegicus*), u krysy obecné (*Rattus rattus*) a u asijské krysy druhu *R. tanezumi* (García-Livia *et al.* 2020; Iseki 1986; Ng-Hublin *et al.* 2013; Silva *et al.* 2013). Výskyt tohoto druhu byl dále potvrzen

například u myšice lesní (*Apodemus flavicollis*), myšice křovinné (*A. sylvaticus*), myšice temnopásé (*Apodemus agrarius*), norníka rudého (*Clethrionomys glareolus*), hlodouna čínského (*Rhizomys sinensis*) a křečika Roborovského (*Phodopus roborovskii*) (Čondlová *et al.* 2018; Chalmers *et al.* 1997; Liu *et al.* 2015; Pavlásek *et al.* 1995; Perec-Matysiak *et al.* 2015; Torres *et al.* 2000). U myšice východní (*Apodemus speciosus*) v Japonsku byl identifikován nový genotyp *C. muris* (Hikosaka *et al.* 2005). Lv *et al.* (2009), kteří provedli v Číně studii na divokých, laboratorních a zájmových hlodavcích; našli *C. muris* pouze v obchodech se zvířaty u křečka zlatého (*Mesocricetus auratus*), křečika džungarského (*Phodopus sungorus*), křečika Campbellova (*Phodopus campbelli*) a burunduka (*Tamias sibiricus*) jak v monoinfekci, tak ve smíšené infekci s jinými druhy kryptosporidií.

V přirozených i experimentálních podmínkách je tento druh infekční pro širokou řadu dalších savců, mimo jiné například pro primáty (Dubey *et al.* 2002; Sak *et al.* 2013), kočky (Iseki 1989; Pavlásek *et al.* 2007), psy (Itoh *et al.* 2014), damany skalní (*Procavia capensis*), pískomily mongolské (*Meriones unguiculatus*), morčata a králíky (Aydin *et al.* 2008a; Rhee *et al.* 1998; Ryan *et al.* 2005) nebo tuleně kroužkovaného (*Phoca hispida*, Santín *et al.* 2005) a pro řadu dalších zvířecích druhů z třídy savců i ptáků (viz Zahedi *et al.* 2016).

U lidí byla přirozená infekce *C. muris* poprvé popsána v Indonésii u dvou zdravých dívek bez klinických příznaků (Katsumata *et al.* 2000). *Cryptosporidium muris* bylo nalezeno u dětí, imunokompetentních i imunodeficitních a HIV pacientů (Gatei *et al.* 2002, 2006; Guyot *et al.* 2001; Hasajová *et al.* 2014; Palmer *et al.* 2003; Tiangtip *et al.* 2002). Infekce zdravého dospělého člověka byla potvrzena také experimentálně (Chappell *et al.* 2015).

Plně vysporulované oocysty mají velikost průměrně 8,4×6,3 μm (7,5 – 9,8×5,5 – 7,0 μm) (Iseki *et al.* 1986), Palmer *et al.* (2003) uvádí rozměry 8,4×6,1 μm (8,0 – 9,0×5,6 – 6,4), Chalmers *et al.* (1994) popsala u myši ve Velké Británii oocysty o velikosti 7,0×5,5 μm (6,5 – 8,0×5,0 – 6,5). Prepatentní perioda u myši domácí činí dle Matsui *et al.* (1999) 6 – 21 dní, Aydin *et al.* (1996) i Iseki *et al.* (1989) uvádí 5 dní. Patentní perioda může být dlouhá i několik měsíců (Matsui *et al.* 1999), naproti tomu Taylor *et al.* (1999) uvádí 18 dní.

V rámci druhu bylo rozlišeno několik běžně se vyskytujících izolátů, které se liší nejen geneticky, ale také mírou infekivity hostitelů, nejpodrobněji jsou prostudovány dva izoláty: *C. muris* CB03 nalezený v České republice u velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) v zoologické zahradě v Plzni (Kváč *et al.* 2008a) a později také u žirafy síťované (*Giraffa camelopardalis reticulata*) v zoologické zahradě ve Dvoře Králové nad Labem (Kodádková *et al.* 2010) a *C. muris* RN66 z potkana obecného (*Rattus norvegicus*; Iseki 1986). Na základě metody MLST bylo u druhu *C. muris* do současnosti popsáno 13 subtypů na lokusu MS1 a 6 subtypů na lokusu MS2, MS3 i MS16 (Feng *et al.* 2011a; Wagnerová *et al.* 2015; Wang *et al.* 2012, 2021).

### 3.3.1.2 *Cryptosporidium andersoni* Lindsay *et al.*, 2000

*Cryptosporidium andersoni* není považováno za druh specifický pro hlodavce, typicky se vyskytuje u přežvýkavců. Poprvé bylo popsáno ve slezu skotu (Upton *et al.* 1985), přirozené infekce byly nalezeny také u velblouda dvouhrbého, zubra evropského (*Bison bonasus*), sviště stepního (*Marmota bobak*), křečka zlatého a křečička Campbellova (*Phodopus campbelli*), takina čínského (*Budorcas taxicolor bedfordi*), pandy velké (*Ailuropoda melanoleuca*), makaka rhesus (*Macaca mulata*) a norka amerického (*Mustela vison*) (Du *et al.* 2015; Lv *et al.* 2009; Mastubayashi *et al.* 2005; Stuart *et al.* 2013; Wang *et al.* 2008, 2015; Zhao *et al.* 2015a). Dlouho se předpokládalo, že *C. andersoni* není schopno infikovat myšovitě hlodavce, ale bylo experimentálně prokázáno, že některé jeho kmeny jsou infekční pro laboratorní myši (Koyama *et al.* 2005; Masuno *et al.* 2013; Matsubayashi *et al.* 2005; Satoh *et al.* 2003) i krysu malou (*Mastomys coucha*, Kváč *et al.* 2007), ale přirozená infekce *C. andersoni* u myši domácí dosud nebyla popsána. Pro dlouhodobé udržování izolátu *C. andersoni* je vhodným laboratorním modelem pískomil saharský (*Gerbillus gerbillus*) (Kváč *et al.* 2013b).

V rámci *C. andersoni* byly u skotu popsány dva typy, které se lišily velikostí oocyst. Upton *et al.* (1985) uvádějí průměrné rozměry 7,4×5,6 μm, naproti tomu později jsou oocysty *C. andersoni* charakterizovány velikostí 8,4×6,2 μm, jež se spíše blíží rozměrům *C. muris* (Kváč *et al.* 2003; Lindsay *et al.* 2000). Na základě metody MLST bylo dosud u *C. andersoni* popsáno 6 subtypů na lokusu MS1, 5 subtypů na lokusu MS2, 4 subtypy na lokusu MS3 a 2 subtypy na lokusu MS16 (Feng *et al.* 2011a; Wang *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2013).

Infekce je typická, stejně jako u *C. muris*, absencí klinických příznaků, nicméně u skotu byla prokázána souvislost se snížením produkce mléka a váhových přírůstků, uvádí se také až trojnásobné zvýšení hmotnosti abomasa (Anderson 1998; Esteban *et al.* 1995, 1997). Lindsay *et al.* (2000) se domnívá, že patentní perioda může u skotu dosahovat až 2,5 roku.

*Cryptosporidium andersoni* není druhem typicky infikujícím člověka, přesto existují studie, popisující výskyt této kryptosporidie u lidí (Ehsan *et al.* 2015; Guyot *et al.* 2001; Jiang *et al.* 2014; Leoni *et al.* 2006).

### 3.3.2 Střevní kryptosporidie myši domácí

Střevní kryptosporidie se považují za geneticky variabilnější ve srovnání s žaludečnými kryptosporidii. Také u nich se využívá metoda MLST, která ke stanovení variability druhů a genotypů často využívá současné analýzy několika genů, například genu pro 70 kDa heat shock protein (HSP70), mucin, actin, *Cryptosporidium*-oocyst wall protein (COWP), trombospondin-related protein of *Cryptosporidium* (TRAP-C1) a zejména velmi variabilní gen, kódující glykoprotein o velikosti 60 kDa (GP60) (Alves *et al.* 2003; Del Coco *et al.* 2014; Gatei *et al.* 2007; Hijjawi *et al.* 2010; O'Brien *et al.* 2008; Pedraza-Díaz *et al.* 2001; Spano *et al.* 1997; Stensvold *et al.* 2014; Zintl *et al.* 2011, **publikace 1, publikace 3**).

Infekce střevními kryptosporidii u divoce žijících hlodavců probíhá bezpříznakově (Čondlová *et al.* 2018, 2019; Horčíčková *et al.* 2019; Sturdee *et al.* 1999). U myši domácí byly v přirozené infekci dosud popsány *C. tyzzeri* (Morgan *et al.* 1999a), *C. parvum* (Lv *et al.* 2009), *C. ubiquitum* (Fayer *et al.* 2010) a *Cryptosporidium* sp. mouse genotyp II (Foo *et al.* 2007).

#### 3.3.2.1 *Cryptosporidium tyzzeri* Ren *et al.*, 2012

*Cryptosporidium tyzzeri*, dříve nazývané *Cryptosporidium* sp. mouse genotyp I, je specifické pro myš domácí, u které bylo také poprvé popsáno. Tento druh byl nalezen i u hraboše polního (*Microtus arvalis*), normíka rudého, krysy obecné, nebo bizonů (*Bison bison*) (Alves *et al.* 2006; Bajer *et al.* 2003; Foo *et al.* 2007; García-Livia *et al.* 2020; Morgan *et al.* 1999a; Xiao *et al.* 2008; Xiao *et al.* 2008). V experimentálních podmínkách však *C. tyzzeri* nebylo infekční pro pískomila mongolského, krysu malou, myšici lesní, ani morče domácí (**publikace 1**). Existují

záznamy o výskytu tohoto druhu také u různých druhů divokých zvířat, například u levharta skvrnitého (*Panthera pardus*), takina indického (*Budorcas taxicolor*), paovce hřivnaté (*Ammotragus lervia*), pandy červené (*Ailurus fulgens*), bažanta praděšského (*Crossoptilon crossoptilon*), jeřába černokrkého (*Grus nigricollis*) a u netopýra hnědého (*Eptesicus fuscus*) (Dubey *et al.* 1998, Karanis *et al.* 2007). Infekce *C. tyzzeri* byla detekována u některých studenokrevných obratlovců (hadů, ještěrek a želv) poté, co byli krmeni infikovanými myšmi (Pedraza-Díaz *et al.* 2009), mohlo se tedy jednat o pasáž kryptosporidiové infekce zažívacím traktem (Xiao *et al.* 2004b).

Jednotliví autoři se mírně rozcházejí ve výsledcích morfometrické analýzy oocyst *C. tyzzeri*. Morgan *et al.* (1999a) uvádí průměrné rozměry 4,5×4,0 μm, Lv *et al.* (2009) udává 4,83×4,07 μm. Ren *et al.* (2012) při popisu nového druhu specifikoval rozměry 4,64×4,19 μm a index tvaru 1,11. V naší práci jsme dokonce detekovali variabilitu ve velikosti oocyst u jednotlivých subtypů tohoto druhu kryptosporidií, kdy průměrné rozměry subtypu *C. tyzzeri* Ixa se u různých poddruhů přirozeně i experimentálně infikovaných myší pohybovaly v rozmezí 4,47 – 4,49×3,88 – 3,91 μm, a rozměry subtypu *C. tyzzeri* Ixb byly 4,24 – 4,26×3,64 – 3,70 μm (**publikace 1**). Oocysty *C. tyzzeri* jsou však vždy menší, než u *C. parvum*.

Prepatentní perioda je dle Rena *et al.* (2012) u myši domácí 6 – 7 dní, v **publikaci 1** byla 4 – 6 dní. Patentní perioda se také liší, Ren *et al.* (2012) uvádí 24 – 28 dní u neonatální myši a 28 – 29 dní u dospělé myši, my jsme zjistili u různých poddruhů myši domácí 6 – 14 dní; nejkratší patentní perioda byla u BALB/c myši (průměrně 6,17 ± 3,37 dní), nejdelší u myši poddruhu *Mus m. domesticus* kmene STUS (14,17 ± 3,19 dní) a u SCID myši (nad 26 dní). Tento druh kryptosporidie obvykle nevyvolává žádné zjevné klinické příznaky, množství vylučovaných oocyst je často nízké (**publikace 1**).

*Cryptosporidium tyzzeri* je infekční také pro člověka. První popsanou infekcí byl případ dítěte v Kuwaitu, původce byl chybně označen za druh *C. parvum* (Sulaiman *et al.* 2005), ale pozdější porovnání publikované sekvence s dalšími záznamy v databázi GenBank potvrdilo, že se jednalo o smíšenou infekci druhu *C. parvum* a *C. tyzzeri* (**publikace 3**). V roce 2007 byl popsán pravděpodobný výskyt *C. tyzzeri* u dětí v Indii (Ajampur *et al.* 2007). Vzorčky však byly vyšetřovány metodou PCR-

RFLP genu pro malou podjednotku rRNA (SSU) a produkt, získaný touto metodou pro *C. tyzzeri* je shodný s produktem druhu *C. meleagridis*, který je po *C. parvum* a *C. hominis* třetí nejčastější kryptosporidií u člověka (Pedraza-Diaz *et al.* 2000; Xiao *et al.* 2004a). Nedá se tedy jednoznačně říci, zda se skutečně jednalo o *C. tyzzeri*, i když to autor uvádí.

### 3.3.2.2 *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912

*Cryptosporidium parvum* je kosmopolitně rozšířený druh s nízkou hostitelskou specifitou. Je pravidelně nalézán u většiny savců a předpokládá se, že je pro ně přirozeně infekční. Nejčastěji bývá popisován u skotu (de Graaf *et al.* 1999) a telat do dvou měsíců, u nichž je často vysoká morbidita, ale nízká mortalita (Santín *et al.* 2008). Vzhledem k množství vylučovaných oocyst jsou právě telata považována za významný zdroj infekce *C. parvum* v prostředí (Xiao 2010). *Cryptosporidium parvum* bylo mimo jiné nalezeno u celé řady hlodavců a drobných savců – myši domácích, potkanů, krys, myšic lesních i křovinných, hrabošů, čipmanka východního, křečka bělonohého (*Peromyscus leucopus*), mývala severního (*Procyon lotor*), nutrie říční (*Myocastor coypus*), ondatry pižmové (*Ondatra zibethicus*), ježka západního (*Erinaceus europaeus*), veverka obecné (*Sciurus vulgaris*) a skunka pruhovaného (*Mephitis mephitis*) (Bajer *et al.* 2003; Hofmannová *et al.* 2016; Chalmers *et al.* 1997; Iseki 1986; Ježková *et al.* 2021b; Kváč *et al.* 2008b; Ng-Hublin *et al.* 2013; Torres *et al.* 2000; Yamura *et al.* 1990). Bylo prokázáno, že *C. parvum* je ve srovnání s *C. tyzzeri* méně infekční pro imunokompetentní dospělé laboratorní myši (Abdou *et al.* 2013; Rasmussen *et al.* 1992; Xiao 2004a), ale řada autorů uvádí, že drobní hlodavci jsou častým rezervoárem infekce pro hospodářská zvířata i pro člověka (Feng *et al.* 2011b; Foo *et al.* 2007; Morgan *et al.* 2000; Ziegler *et al.* 2007). Je tedy možné, že v některých případech mohou být oocysty, detekované u myši, jen pasáží kryptosporidií z prostředí.

Velikost oocyst je u telat 5,0×4,5 μm (Upton *et al.* 1985), dle Hijjawi *et al.* (2001) je 4,8×4,2 μm. Kváč *et al.* (2013b) uvádí rozměry u telat i u SCID myši 5,5 × 4,95 μm. Prepatentní perioda byla experimentálně zjištěna 2 – 7 dní u telat (Tzipori *et al.* 1983) a 4 – 22 dní u člověka (DuPont *et al.* 1995). Chappel *et al.* (1996) uvádí prepatentní periodu v délce 5 – 6,43 dní u dvou skupin dobrovolníků, u nichž se objevily klinické příznaky, a 10,7 dní u asymptomatických osob, patentní perioda byla v této studii

maximálně 14 dní. Fayer (2008) uvádí delku patentní periody u telat 1 – 12 dní a u člověka 1 – 20 dní.

Společně s *C. hominis* je *C. parvum* druhem nejčastěji infikujícím člověka (Xiao *et al.* 2004a). Byl popsán i u lidí v České republice (Hajdušek *et al.* 2004; Kváč *et al.* 2009, **publikace 3**). I když je životní cyklus *C. parvum* lokalizován převážně v gastrointestinálním traktu, může pronikat i do jiných orgánů, jako například plic, jater a sleziny (Meamar *et al.* 2006). U imunodeficitních pacientů končí diseminované infekce většinou smrtí (Nimri *et Batchoun* 1994). Jelikož byl stejný subtyp *C. parvum* nalezen u člověka i u drobných hlodavců, mohou hlodavci sloužit jako rezervoár infekce, potenciálně nebezpečné pro člověka (Zhao *et al.* 2015b; **publikace 3**).

### 3.3.2.3 *Cryptosporidium ubiquitum* Fayer *et al.*, 2010

*Cryptosporidium ubiquitum* (dříve *Cryptosporidium* sp. cervine genotyp) je, jak už název napovídá, všudypřítomný druh. Společně s *C. parvum* a *C. meleagridis* je považován za druh s nejnižší hostitelskou specifitou (García-Livia *et al.* 2020). Často je součástí spektra kryptosporidií, nacházených ve vzorcích rekreační, pitné a odpadní vody (Galván *et al.* 2014; Nichols *et al.* 2010; Robinson *et al.* 2011; Ruecker *et al.* 2012). Oocysty měří 5,0×4,7 μm (Fayer *et al.* 2010).

Vyskytuje se u všech věkových kategorií ovcí (*Ovis aries*, Ryan *et al.* 2005; Santín *et al.* 2007; Wang *et al.* 2010), a dalších přežvýkavců, jako jsou srnec obecný (*Capreolus capreolus*), jelen sika (*Cervus nippon temnick*), jelenec běloocasý (*Odocoileus virginianus*), bulovec běločelý (*Damaliscus pygarnus phillipsi*), nyala jižní (*Tragelaphus angasii*), kozorožec horský (*Capra ibex*), jak domácí (*Bos grunniens*), ale také u dalších savců, například mývala severního (*Procyon lotor*), veverky popelavé (*Sciurus carolinensis*), nutrie říční, norka amerického nebo činčily vlnaté (*Chinchilla lanigera*) (Feng *et al.* 2007; Ježková *et al.* 2021b; Karanis *et al.* 2007; Kellnerová *et al.* 2017; Ma *et al.* 2014; Perz *et Le Blancq* 2001; Prediger *et al.* 2017; Robinson *et al.* 2011; Ryan *et al.* 2003; Wang *et al.* 2008). V přirozené infekci byl popsán u řady hlodavců, primátů i u člověka (da Silva *et al.* 2003; Fayer *et al.* 2010).

*Cryptosporidium ubiquitum* se u hostitelů často vyskytuje ve smíšené infekci s jinými druhy nebo genotypy kryptosporidií, například u čipmanka východního (*Tamias*



*striatus*) bylo detekováno společně s *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I (Feng *et al.* 2007). V naší práci bylo u myši domácí východoevropské nalezeno v přirozené infekci s *C. parvum* (nepublikováno, viz Kap. 5.1 a 5.2). U hlodavců je tento druh popisován ve smíšené infekci s celou řadou různých druhů a genotypů kryptosporidií (Xiao *et Feng* 2008).

Existuje překvapivě málo studií, popisujících výskyt *C. ubiquitum* u přirozeně, případně laboratorně infikovaných myší (Fayer *et al.* 2010). Vzhledem k všudypřítomnému výskytu *C. ubiquitum* ve vodě a v prostředí je možné, že v řadě případů byl tento druh u myši sice nalezen, ale mohl být chybně popsán jako *C. parvum*-like (Bajer *et al.* 2001, 2002; Bednarska 2003; Chalmers *et al.* 1997, Torres *et al.* 2000). Je pravděpodobné, že nejen myši, ale i další divoce žijící savci budou v budoucnu popsáni jako přirození hostitelé *C. ubiquitum* (Jiang *et al.* 2005).

#### 3.3.2.4 *Cryptosporidium* sp. mouse genotyp II

Genotyp *Cryptosporidium* sp. mouse II byl popsán pouze v jedné studii v 10 případech u myši západoevropské (MMD) v Queenslandu v Austrálii a na ostrovech Macquaire a Thevenard, které leží jihozápadně od pobřeží Austrálie (Foo *et al.* 2007) a následně v jednom případě u MMM v Brazílii (Silva *et al.* 2013).

Tento genotyp je fylogeneticky nejvíce příbuzný k druhu *C. suis* (Foo *et al.* 2007). Jeho další výzkum je velmi komplikovaný z důvodu nízké intenzity vylučování a obtížnosti získání dostatku izolátu pro experimentální práci.

## 4. MATERIÁL A METODIKA

Materiál a metodika jednotlivých studií, které jsou nedílnou součástí této disertační práce, jsou uvedeny v kapitolách Materiál a metodika příslušných studiích v příloze této práce. V následujícím textu jsou souhrnně uvedeny všechny metody, používané při práci na již vyšlých publikacích, tak i dosud nepublikovaných výsledcích.

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Odchyt zvířat

Divoce žijící myši domácí byly chytány do kovových nebo dřevěných živochytných pastí. Nejčastější návnadou byly ovesné vločky s rybím olejem. Zvířata byla odchyťována za účelem studia prevalence kryptosporidií u myši domácích a nashromáždění potřebného množství živých, infekce schopných oocyst kryptosporidií pro další experimentální infekce. Zvířata byla individuálně transportována do laboratoře za podmínek splňujících jak bezpečnost práce s potenciálně infekčním materiálem, tak i příslušnou legislativu na ochranu zdraví zvířat.

##### 4.1.1.1 Lokality odchyty

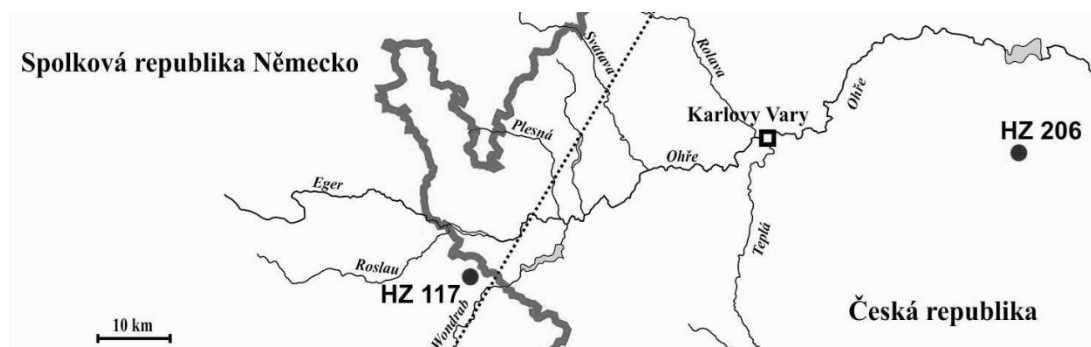
Odchyty probíhaly v oblasti hranice západních Čech (Česká republika) a severovýchodního Bavorska (Spolková republika Německo), v části takzvané hybridní zóny myši domácí. Na základě předchozích terénních sledování byly v této oblasti prováděny pravidelné odchyty myši domácí v podzimních měsících (září a říjen) v letech 2007 – 2014. Pro tuto práci byly následně použity vzorky, získané v období 2007 – 2011 z celkem 125 lokalit.

##### 4.1.1.2 Izoláty pro experimentální infekce

Pro experimentální infekci byly použity dva odlišné izoláty *C. tyzzeri* (Obr. 3), označené HZ117 pocházející z myši MMD (lokalita Münchenreuth) a HZ206 pocházející z myši MMM (lokalita Buškovice). Oba izoláty *C. tyzzeri* HZ206 i HZ117 byly nalezeny ve smíšené infekci společně s *C. muris*, od které musely být experimentálně odděleny (Kap. 4.2.5.4).

Izolát *C. proliferans* pocházel z přirozeně infikovaného hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*), odchyceného v Kakamega v Keni v roce 2003.

**Obrázek 3:** Původ izolátů *Cryptosporidium tyzzeri*, použitých pro experimentální infekce (upraveno dle Loudová 2011).



#### 4.1.2 Manipulace se zvířaty

Všechna živě odchycená i pokusná zvířata byla chována individuálně za standardních podmínek odpovídajících druhu a kategorii zvířat. Měla k dispozici sterilizované krmivo ve formě pelet (Velaz, Praha) a sterilizovanou vodu *ad libitum*. Se zvířaty bylo nakládáno a manipulováno dle Zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání a dle Vyhlášky č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat v pozdějším znění. Všechna zvířata byla chována a držena ve zvěřinci Parazitologického ústavu BC AV ČR, v. v. i.

Divoké myši, odchycené za účelem screeningu, byly drženy ve standardizovaných podmínkách v dočasné terénní laboratoři, zbudované v odchyťové oblasti. Následující den po odchytu byla zvířata usmrcena v souladu s předpisy, byla provedena pitva a odebrán biologický materiál.

#### 4.1.3 Biologický materiál

Vzorky trusu přirozeně nebo experimentálně infikovaných zvířat byly sbírány denně a uchovávány při teplotě 4 °C v 2,5% vodném roztoku dichromanu draselného ( $K_2Cr_2O_7$ ) po dobu maximálně čtyř týdnů. Při tomto způsobu uchování zůstávají oocysty kryptosporidií ve vzorku schopné další infekce.

Vzorky trusu a části zažívacího traktu (žaludek, duodenum, jejunum, ileum, cékum a kolon) zvířat pro dlouhodobé uchování byly individuálně odebírány a skladovány v 70% alkoholu pro následné molekulární analýzy, případně byly histopatologicky zpracovány (Kap. 4.2.6).

#### **4.1.4 Experimentální infekce – laboratorní modely**

Pro experimentální infekce byla použita komerčně dostupná, dobře definovaná laboratorní zvířata (SCID a BALB/c myši, pískomilové mongolští, morčata), a dále krysy malé, myšice lesní a andulky vlnkovaté. Kromě nich byly použity divoké kmeny myši které byly v laboratorních podmínkách odvozeny od původních divokých myši, odchycených ve zkoumané oblasti hybridní zóny (Albrechtová *et al.* 2012, Piálek *et al.* 2008). Tyto kmeny se nazývaly STUS (MMM), 24. – 26. generace příbuzenského křížení a SCHEST (MMD), 8. – 10. generace křížení. Oba kmeny pocházely z chovu Ústavu biologie obratlovců AVČR v. v. i. Ve Studenci (Česká republika).

#### **4.1.5 Případová studie**

Na podzim roku 2011 byl podrobně studován případ výskytu kryptosporidiózy u zdravé 25leté ženy, která rutinně pracovala s laboratorními i divoce žijícími hlodavci. U této osoby byla denně zaznamenávána frekvence vylučování a mikroskopicky byla vyšetřována intenzita vylučování oocyst ve stolici. Studie byla schválena Etickou komisí Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i. (protokol č. 1/2012).

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Koprologické vyšetření a určení intenzity infekce

Vzorky trusu a stolice byly vyšetřeny na přítomnost kryptosporidií pomocí specifického barvení aniline-carbol-methyl violetí (Miláček *et* Vítovec 1985). Intenzita infekce byla zjišťována u experimentálních hlodavců i u sledované pacientky pomocí nátěrů v průběhu infekčního období dle Kváče *et al.* (2007). Po odebrání vzorku trusu či stolice, vytvoření a obarvení nátěru aniline-carbol-methyl violetí bylo sklíčko prohlédnuto světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Oocysty byly počítány na celé sklo. Hmotnost trusu byla zjištěna na základě váhového rozdílu skla a skla s nátěrem trusu. Intenzita infekce byla pak vyjádřena jako počet oocyst na gram trusu (OPG).

### 4.2.2 Morfometrická analýza oocyst

Morfometrická analýza byla provedena a) s vitálními oocystami kryptosporidií, purifikovanými pomocí sacharózového a cesium chloridového gradientu (Kap. 4.2.3), b) z nátěru na sklo, obarveného metodou barvení aniline-carbol-methyl violetí (Miláček *et* Vítovec 1985), c) metodou diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC), d), barvením auramin-fenolem (Casemore 1991), e) pomocí imunofluorescenční mikroskopie za použití FITC-značených *Cryptosporidium*-specifických protilátek (Crypto Cel Reagent, Cellabs). Při zvětšení 1000× byla měřena délka a šířka minimálně 100 oocyst z každého izolátu a byl vypočten index tvaru. Pro morfometrickou analýzu byla použita digitální analýza snímků (M.I.C. Quick Photo Pro v.1.2; Optical Service), pořízených fotoaparátem Olympus Camedia C-5060 WIDEZOOM, 5.1 megapixelů (Optical Service).

Velikost oocyst byla porovnána s referenční velikostí oocyst *C. parvum*, získaných z přirozeně infikovaného telete. Variabilita ve velikosti oocyst byla statisticky vyhodnocena (viz Kap. 4.2.11).

### 4.2.3 Purifikace oocyst

Před purifikací oocyst byly vzorky zbaveny  $K_2Cr_2O_7$  pomocí opakovaného promytí ve fosfátovém pufru (PBS), homogenizovány a zbaveny větších částic trusu protlačením přes plastové sítko. Následně byly purifikovány kombinací sacharózového (Arrowood *et* Sterling 1987) a cesium chloridového gradientu (Kilani

*et Sekla 1987*). V případě malého množství trusu byl takový vzorek čištěn přímo na cesium chloridovém gradientu, aby se minimalizovaly ztráty, vzniklé v průběhu čištění.

#### **4.2.4 Test životaschopnosti oocyst**

Před experimentálními infekcí byla ověřena životaschopnost oocyst pomocí barvení propidium iodidem (Sauch *et al.* 1991). Životaschopnost oocyst byla posouzena jako poměr mrtvých (barví se červeně) k živým (nebarví se – jeví se zeleně) oocystám ve třech až pěti nezávislých opakováních. V každém opakování bylo počítáno celkem 100 oocyst na jamkovém sklíčku fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX70) při vlnové délce 420 nm.

#### **4.2.5 Experimentální infekce zvířat**

##### **4.2.5.1 Zahájení experimentu**

Pokusná zvířata byla infikována perorálně pomocí jícní sondy 200  $\mu$ l suspenze s dávkou  $10^6$  životaschopných oocyst kryptosporidií. Velikost infekční dávky byla vypočítána pomocí Bürkerovy komůrky.

##### **4.2.5.2 Průběh experimentu**

Infekce byla sledována po dobu 30 dnů po infekci (DPI). Vzorky trusu infikovaných zvířat byly od 3. dne po infekci denně odebírány a koprologicky vyšetřovány. Část vzorku trusu byla uchována pro případnou molekulární analýzu v mikrozkumavce při  $-20$  °C. Pokud byly u daného hostitele koprologickým vyšetřením nalezeny oocysty v trusu, molekulární analýzou byla potvrzena identita izolátu, který byl zvířeti podán (viz Kap. 4.2.8 a 4.2.9).

##### **4.2.5.3 Ukončení experimentu**

Po ukončení experimentu byla všechna zvířata usmrcena cervikální dislokací páteře. Po usmrcení bylo provedeno histopatologické vyšetření orgánů gastrointestinálního traktu. S kadávery bylo naloženo dle příslušných legislativních předpisů.

#### 4.2.5.4 Oddělení izolátů v případě smíšené infekce

Izoláty *C. tyzzeri*, používané pro experimentální infekce v publikaci 1, byly z divoké myši získané ve smíšené infekci s *C. muris*. Před experimentální infekcí bylo nutné tyto dva druhy kryptosporidií oddělit s využitím jejich různé délky prepatentní periody u myši domácí. Prepatentní perioda *C. tyzzeri* je 4 – 5 dní (publikace 1), prepatentní perioda *C. muris* je průměrně 7 dní (Wang *et al.* 2021a).

Přečištěné suspenze oocyst (200 µl) byly podány myším SCID (pro každý izolát byla použita jedna myš), 4 – 7. DPI byl těmto myším 2× denně odebrán ve sterilní nádobě trusu. Část trusu byla natřena na sklo a vyšetřena mikroskopicky na přítomnost oocyst kryptosporidií (barvení aniline-carbol-methyl violetí), část byla použita pro izolaci DNA a molekulární analýzu (Kap. 4.2.7 a 4.2.8) a zbylý trus z každého odběru byl uchováván v individuálních mikrozkuvkách v roztoku dichormanu draselného. Vzorky z těch odběrů, ve kterých byla mikroskopicky i molekulárně prokázána přítomnost *C. tyzzeri* a zároveň vyloučena přítomnost *C. muris*, byly následně smíchány, přečištěny (Kap. 4.2.3) a použity pro experimentální infekci (Kap. 4.2.5.1-3).

#### 4.2.6 Histopatologická analýza

U hostitelů, u nichž byla prokázána vnímavost na základě mikroskopického vyšetření trusu, bylo po ukončení experimentu provedeno histopatologické vyšetření žaludku a střeva dle metodiky popsané v publikaci Kváč *et Vítovec* 2003.

Vývojová stádia kryptosporidií byla detekována pomocí a) barvení hematoxylin-eosinem, b) Wolbachovou metodou, c) alcianovou modří, d) PAS reakcí (periodic acid Schiff) a e) specifickými FITC-značenými monoklonálními protilátkami proti stěně oocysty kryptosporidií (Crypto Cell Reagent, Cellabs).

#### 4.2.7 Molekulární analýza

##### 4.2.7.1 Izolace DNA

Vzorek trusu o hmotnosti cca 200 mg byl mechanicky homogenizován účinkem skleněných kuliček pomocí FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals) po dobu 60 s při rychlosti 5,5 m/s. Izolace celkové DNA byla provedena za použití komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex) dle přiloženého manuálu výrobce. Vzorky z Nového Zélandu byly zpracovány metodou fenol-chloroformové izolace

a přečištěny kitem QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Získaná DNA byla skladována při -20 °C.

#### 4.2.7.2 PCR – polymerázová řetězová reakce

Z vyzolované DNA byla provedena amplifikace specifických úseků DNA za použití metody polymerázové řetězové reakce – PCR. Pro všechny PCR analýzy byla použita dvoukroková (nested) PCR.

Charakterizace byla zaměřena na geny kódující část malé podjednotky rRNA (SSU) (Jiang *et al.* 2005), 60 kDa glykoprotein (GP60, Alves *et al.* 2003), GP60 specifický pro druh *C. ubiquitum* (GP60ubi, Li *et al.* 2014), actin (Sulaiman *et al.* 2002), *Cryptosporidium* oocysts wall protein (COWP, Pedraza-Díaz *et al.* 2001), thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1, Spano *et al.* 1997) a 70 kDa Heat Shock Protein (HSP70, **publikace 2**).

Fragment SSU genu byl amplifikován ze všech druhů a genotypů získaných izolátů kryptosporidií. Na základě výsledků analýzy genu SSU byly v případě studie diverzity populace kryptosporidií následně ostatní geny amplifikovány jen u vybraných izolátů tímto způsobem: u všech vzorků, které byly na genu SSU pozitivní na žaludeční kryptosporidie, byl amplifikován gen GP60; všechny vzorky, které obsahovaly DNA střevních kryptosporidií, byly znovu amplifikovány na SSU za použití primerů specifických pouze pro žaludeční kryptosporidie (Němejc *et al.* 2013). Tímto způsobem bylo možné ve vzorcích odhalit i smíšené infekce několika druhů kryptosporidií, které by při amplifikaci pouze genu SSU zůstaly skryté. U vzorků, které byly fylogeneticky příbuzné k *C. ubiquitum*, byl následně amplifikován gen GP60 za použití *ubiquitum*-specifických primerů GP60ubi. Pro amplifikaci genů TRAP-C1, COWP a HSP70 u žaludečních kryptosporidií při popisu druhu (**publikace 2**) byly navrženy pomocí programu PrimerQuest (IDT, <http://www.idtdna.com/>) a testovány pomocí softwaru Serial Cloner v 2.6.1. ([http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)). U žaludečních kryptosporidií byla dále použita subtypizace pomocí MLST (multilocus sequence typing) pro detekci čtyř mikrosatelitů a minisatelitů, konkrétně MS1: kódující hypotetický protein CMU\_036310 (XM\_002141771), MS2: kódující 90 kDa heat shock protein (XM\_002141007), MS3: kódující hypotetický protein CMU\_020660



(XM\_002142635) a MS16: kódující protein bohatý na leucin CMU\_035650 (XM\_002141705) (Feng *et al.* 2011a).

U všech reakcí byla vždy použita negativní kontrola pro vyloučení kontaminace a pozitivní kontrola, pro potvrzení spolehlivosti reakce. Pozitivní kontrolou byl u genů SSU, actin, HSP70, COWP, TRAP-C1, MS1, MS2, MS3 a MS16 vzorek obsahující DNA *C. andersoni*, případně *C. hominis*, u genu GP60 vzorek obsahující DNA *C. hominis*, pro gen GP60ubi byla použita kontrolní DNA *C. ubiquitum*.

#### 4.2.7.3 Gelová elektroforéza a izolace z gelu

Po sekundární PCR byla provedena separace PCR produktu pomocí elektroforézy na 1 nebo 2% agarózovém gelu s přídavkem ethidium-bromidu nebo SYBR Green. Tento krok umožňuje detekci a vizualizaci pozitivních vzorků a oddělení případných vedlejších produktů. Pozitivní fragmenty DNA byly následně vyříznuty z gelu a přečištěny pomocí QIAquick Gel Extraction kitu (Qiagen) dle manuálu výrobce. Koncentrace DNA získaného produktu byla změřena přístrojem Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

#### 4.2.8 Sekvenace

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány za použití sekundárních primerů a ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitu (Applied Biosystems) ABI3130 Genetic Analyzerem (Applied Biosystems). Identita získaných sekvencí byla ověřována pomocí vyhledávání BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

U případové studie lidské nákazy kryptosporidii předcházelo výše popsanému procesu klonování PCR produktu za pomoci komerčního kitu pGEM-T easy vector system (Promega) dle přiloženého manuálu výrobce. Tento krok byl zařazen pro získání relevantního výsledku v případě možné smíšené infekce více druhů kryptosporidií.

#### 4.2.9 Fylogenetická analýza

Všechny získané sekvence byly uspořádány pomocí programu ChromasPro (Technelysium), případně Geneious Prime (<https://geneious.com>). Výsledný konsensus byl srovnán s referenčními sekvencemi uloženými v GenBank databázi pomocí programu ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>), nebo

MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp>), alignment všech sekvencí byl ručně editován v programu BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Ke zjištění fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií byly využity metody a) Neighbor-Joining (Saitou *et* Nei 1987) na základě Kimurových 2-parametrických vzdáleností (Kimura 1980), b) Maximum Likelihood (Saitou 1988) a c) Maximum Parsimony v programech Treecon (Van de Peer *et* De Wachter 1994) a Mega 5 (Tamura *et al.* 2011). Bootstrap analýza (1000 opakování) byla použita pro vyhodnocení statistické podpory získané typologie.

Sekvence *C. tyzzeri* GP60 při studiu koevolučních vztahů byly seskupeny podle zeměpisné polohy a evoluční divergence byla určena pomocí modelu Kimurových 2-parametrických vzdáleností pro výpočet počtu substitucí na jednu bázi zprůměrováním všech párů sekvencí mezi skupinami. Všechny nejednoznačné pozice byly pro každý pár sekvencí odstraněny. Analýzy byly provedeny pomocí MEGA5.

Fylogramy byly zobrazeny v programu FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) a editovány v programu CorelDrawX7 nebo Inkscape. Získané sekvence byly uloženy v GenBank pod přístupovými kódy, uvedenými v jednotlivých publikacích.

#### **4.2.10 Vyhodnocení výsledků a statistické analýzy**

Nejprve byla data sumarizována v tabulkách programu Excel (Microsoft Corporation) a následně statisticky analyzována programy EpiInfo v. 3.5.1 (Centers for Disease Control and Prevention), Statistica® 6.0 a v programovacím prostředí R 3.0.1 (Kelley 2007).

Efekt druhu a pohlaví byl analyzován Pearsonovým  $\chi^2$  testem. Z důvodu nenormálního rozdělení dat byl použit Kruskal–Wallisův neparametrický test. Intenzita infekce, průběh infekce, variabilita ve velikosti oocyst, klinické příznaky a patologické změny byly vyhodnoceny pomocí analýzy variance ANOVA. K porovnání dvou populací z hlediska morfometrie oocyst (obou subtypů *C. tyzzeri*, respektive *C. proliferans* a *C. muris*) byl použit Hotellingův T2 test. Wilcoxonův test byl použit jako post-hoc test po DunnSidakově úpravě. Homoskedasticita prepatentních a patentních period byla ověřena Barletovým testem.

## 5. SHRNUÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

Všechny dosažené výsledky (tabulky, obrázky) lze nalézt v příložených publikacích (Kap. 7-9 této práce), kromě souhrnných výsledků o prevalenci a diverzitě kryptosporidií u myši domácí (publikace se připravuje), které jsou shrnuté v Kap. 5.1.

Žaludeční druh *C. muris* a střevní druh *C. parvum* byly prvními popsány kryptosporidii (Tyzzer 1907, 1912). Až do konce 90. let 20. století byly mnohé střevní druhy kryptosporidií považovány za genotypy *C. parvum*; například *C. hominis* byl znám jako *C. parvum* genotyp I a *C. canis* jako *C. parvum* dog genotyp (Fayer *et al.* 1997; Xiao *et al.* 1999b). Hlubší poznání jednotlivých genotypů jako samostatných druhů umožnily studie, které prokázaly molekulární a biologické rozdíly mezi jednotlivými genotypy, respektive druhy (Fayer *et al.* 2001; Morgan-Ryan *et al.* 2002; Ren *et al.* 2012). V poslední letech byly přineseny důkazy pro popis dalších nových druhů i u hlodavců, kde již dříve řada studií naznačovala přítomnost kryptických druhů (Čondlová *et al.* 2018, Horčíčková *et al.* 2019; Ježková *et al.* 2021a, Kváč *et al.* 2018).

Myš domácí je hostitelem zoonotických druhů kryptosporidií se širokou hostitelskou specifitou (např. *C. ubiquitum*, *C. parvum* nebo *C. muris*), ale i druhů či genotypů, které jsou považovány za úzce hostitelsky specifické (*C. tyzzeri* či *Cryptosporidium* sp. mouse genotyp II). U jiných hlodavců, kde parazitují druhy adaptované a speciované na jednotlivé hostitele (Čondlová *et al.* 2018, 2019; Horčíčková *et al.* 2019; Prediger *et al.* 2017; Stenger *et al.* 2018), ale i tito autoři našli druhy zoonotické (např. *C. hominis* nebo *C. ubiquitum*). Výsledky této práce ukazují, že myši hostí druhy kryptosporidií, které mohou vyvolat infekci u jiných druhů zvířat a člověka.

### 5.1 Prevalence a diverzita kryptosporidií u myši domácí

#### 5.1.1 Kryptosporidie u myši ve sledované populaci

Cílem práce bylo zdokumentovat prevalenci a diverzitu u obou studovaných poddruhů myši domácí. Celkem bylo odchyceno 578 myši na 125 lokalitách (Tab. 1), z tohoto množství náleželo 245 myši (124 samic a 121 samců), odchycených na 54 lokalitách k poddruhu MMM a 333 myši (177 samic a 156 samců) ze 71 lokalit k poddruhu MMD. Kryptosporidie byly detekovány na celkem 60 (48,0 %) lokalitách, z nichž 22 (17,6 %) spadalo do oblasti MMM a 38 (30,4 %) do oblasti MMD.

**Tabulka 1:** Výskyt kryptosporidií v monoinfekci a smíšené infekci ve studované populaci myši domácí v závislosti na poddruhu myši a jejím pohlaví.

Poddruh hostitele	Pohlaví hostitele	Počet vyšetřených zvířat	Počet pozitivních zvířat	Monoinfekce <i>Cryptosporidium</i> spp.					Smíšená infekce <i>Cryptosporidium</i> spp.			
				<i>C. muris</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. hominis</i>	apodemus II	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. tyzzeri</i>
<i>Mus m. musculus</i>	Samice	124	14	3	2	8	0	0	0	1	0	
	Samec	121	16	3	3	8	1	0	0	0	1	
	<b>Celkem</b>	<b>245</b>	<b>30</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	
<i>Mus m. domesticus</i>	Samice	177	51	20	9	17	1	0	4	0	0	
	Samec	156	52	23	3	17	1	1	7	0	0	
	<b>Celkem</b>	<b>333</b>	<b>103</b>	<b>43</b>	<b>12</b>	<b>34</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>Celkem</b>	<b>578</b>	<b>133</b>	<b>49</b>	<b>17</b>	<b>50</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>1</b>		
<b>Druhy kryptosporidií</b>		<i>C. muris</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. hominis</i>	apodemus II						
Celkem v populaci		60	19	62	3	2						

Mikroskopické vyšetření odhalilo 71 pozitivních vzorků (prevalence 12,2 %), pomocí PCR bylo detekováno celkem 133 pozitivních myší. Prevalence byla 23,0 %, tedy téměř dvojnásobná. Stejně tak Čondlová *et al.* (2018) u myšic a hrabošů a Ježková *et al.* (2021a) u potkanů detekovali výrazně více pozitivních vzorků pomocí metody PCR ve srovnání s mikroskopií.

U žádné z odchycených myší nebyly patrné klinické příznaky kryptosporidie ani před usmrcením, ani při pitvě. Podobné závěry uvádí například studie, provedené na divoce žijících hlodavcích, a to u žaludečních i střevních kryptosporidií (Čondlová *et al.* 2018, 2019, Horčíčková *et al.* 2019), ale také u žaludečních kryptosporidií druhu *C. muris*, které byly experimentálně infikované laboratorním zvířatům (Aydin *et al.* 1996). Intenzita infekce byla u námi studovaných myší nízká, podobně jako to popisují ve svých pracích autoři u myšic, morčat, hrabošovitých, či prasat (Bajer 2008; Čondlová *et al.* 2018, 2019; Horčíčková *et al.* 2019; Kváč *et al.* 2013a; Němejc *et al.* 2013; Tilley *et al.* 1991). Nízkou intenzitu infekce uvádí studie na hlodavcích jak pro druhy úzce hostitelsky specifické, například *C. alticollis* nebo *C. microti* u čeledi Arvicolinae (Horčíčková *et al.* 2019), tak i u druhů s širokou hostitelskou specifiitou, například *C. parvum* u morčat (Tilley *et al.* 1991).

Řada studií kryptosporidiových infekcí nejen u myší (Feliu *et al.* 2012; Foo *et al.* 2007), ale i u dalších hlodavců (Bajer *et al.* 2002; Bednarska *et al.* 2007; Chalmers *et al.* 1997; Laakkonen *et al.* 1994; Sinski *et al.* 1993, 1998; Torres *et al.* 2000), byla založena pouze na mikroskopické detekci oocyst, případně byla analýza pomocí PCR

provedena pouze na vzorcích, které byly mikroskopicky pozitivní (Bajer *et al.* 2003), což ale může vést v důsledku nízké intensity vylučovaných oocyst k podhodnocení reálné prevalence kryptosporidiové infekce v populaci. Námi molekulárně detekovaná celková prevalence kryptosporidií v populaci myši domácí (23,0 %) přibližně odpovídá prevalenci, popsané u hrabošovitých v České republice (22,6 %) Horčíčkovou *et al.* (2019). U MMM jsme detekovali jen 12,2 %. Podobný údaj (13,7 %) publikovali u myšic Čondlová *et al.* (2019), kteří vzorkovali napříč řadou evropských států, a také García-Livia *et al.* (2020), kteří popsali kryptosporidie na Kanárských ostrovech u krysy obecné v 17,6 % případů a u MMD v 14,3 % (celková prevalence byla 15,4 %). Naproti tomu v naší studii byla prevalence u MMD byla 30,9 %. Perec-Matysiak *et al.* (2015), kteří studovali myšice a hraboše v severovýchodním Polsku, zjistili prevalenci kryptosporidií u *A. agrarius* 61,7 %, u *A. flavicollis* 68,3 % a u *M. glareolus* 68,1 %. Promořenost kryptosporidii se tedy může výrazně lišit i v rámci jednotlivých druhů či poddruhů hlodavců a mezi různými lokalitami.

Vliv pohlaví na výskyt kryptosporidiové infekce nebyl prokázán u celkového vzorku populace, ani u jednotlivých druhů detekovaných kryptosporidií. Naopak výsledky ukazují, že více parazitovány byly myši poddruhu MMD, a to jak kryptosporidii celkově, tak i druhem *C. muris* ( $p < 0,01$ ). U ostatních druhů kryptosporidií neměl poddruh myši výskyt kryptosporidií v populaci vliv. Vyšší promořenost MMD uvádí také Goüy de Bellocq *et al.* (2018), která studovala u myší v HMHZ výskyt *Pneumocystis murina*. Věková specifita nebyla pro nízký počet odchycených juvenilních jedinců sledována, nicméně Čondlová *et al.* (2019) i Horčíčková *et al.* (2019) v podobně koncipovaných studiích vliv pohlaví ani věku na promořenost populace drobných hlodavců neprokázali. Ani u fylogeneticky příbuzných eimerií nebyla prokázána pohlavní specifita nákazy u telat, ovcí či koz (Adeyemi *et al.* 2021; Damana *et al.* 2018).

### **5.1.2 Fylogenetická analýza detekovaných kryptosporidií**

Primárním nástrojem genotypizace kryptosporidií je obvykle amplifikace genu, kódujícího část malé podjednotky rRNA (SSU), často v kombinaci s *Cryptosporidium* oocyst wall proteinem (COWP) a následně sekvenace (Xiao 2010). Jelikož primery jsou obvykle specifické pro více druhů či genotypů kryptosporidií a během PCR se

nejčastěji amplifikuje druh/genotyp, který je ve vzorku zastoupený v největší koncentraci, typ a způsob použití metod molekulární diagnostiky, případně správné pořadí jednotlivých nástrojů, může zásadním způsobem ovlivnit výsledek detekované diverzity druhů či genotypů kryptosporidií v populaci (Xiao 2010). Používali jsme analýzu genů SSU, GP60 a u *C. muris* i mikrosatelitních lokusů MS1, MS2, MS3 a MS16 (viz kap. 5.2.8.2.). Ze všech myší pozitivních na kryptosporidie bylo pomocí sekvenční analýzy genotypizováno na genu SSU 104 vzorků, na genu GP60 74 vzorků, na MS1 23 vzorků, na MS2 33 vzorků, na MS3 13 vzorků a na MS16 18 vzorků. U zbývajících pozitivních vzorků se nepodařilo sledované lokusy amplifikovat, nebo byly získané sekvence z fylogenetické analýzy vyřazeny z důvodu nízkého počtu bází, nebo smíšeného signálu v elektroferogramu. Nalezli jsme celkem pět druhů/genotypů kryptosporidií, *C. muris*, *C. tyzzeri*, *C. parvum*, *C. hominis* a *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II. Nejčastěji se vyskytovaly *C. muris* a *C. tyzzeri*. Díky zvolené posloupnosti detekce různých genů jsme u 13 vzorků odhalili smíšené infekce dvou různých druhů kryptosporidií (Tab. 1).

Druh *C. muris* byl nalezen u 60 myší (10,4 %). Při porovnání získaných sekvencí genu SSU s referenčními sekvencemi v databázi GenBank byla zjištěna 100% shoda s kmenem *C. muris* RN66 (AB089284, nepublikováno) (Obr. 4). U 11 vzorků (1,9 %) byla nalezena smíšená infekce *C. muris* a *C. tyzzeri*. Ve všech případech se tato smíšená infekce vyskytla u poddruhu MMD, z nichž byly 4 samice a 7 samců. Tyto myši pocházely ze 7 různých lokalit (Tab. 2). Druh *C. muris* je specifický pro myši, nicméně byl izolován z řady dalších zvířecích druhů (viz kap. 2.3.1).

Prevalence *C. tyzzeri* byla 10,7 % (u 62 myší), z nich bylo 12 ve smíšené infekci s dalším druhem kryptosporidie, 11 s *C. muris* (viz výše) a 1 s *C. parvum* (Tab. 1). Všechny získané sekvence genu SSU byly 100% identické s referenčními sekvencemi č. AF112571 a AF108863, nalezenými u myší domácích (Morgan *et al.* 1999b; Xiao *et al.* 1999a) a se sekvencí EU553589, popsané ve studii, zabývající se plazy, chovanými v zajetí (Pedraza-Díaz *et al.* 2009) (Obr. 4). Na genu pro GP60 bylo získáno 54 sekvencí, které vytvořily monofyletickou skupinu, jež se dále rozčlenila na dvě větve, náležející k subtypům IXa a Ixb (Obr. 5A). Sekvence *C. tyzzeri* na genu GP60 vykazovaly největší variabilitu ze všech nalezených druhů kryptosporidií, vytvořily celkem 13 skupin, pro které většinou nebyla v databázi GenBank nalezena

žádná shoda, proto předpokládáme, že se jedná o nové modifikace genu GP60 (Obr. 5B). Všechny sekvence, náležející k subtypu Ixa byly získány z MMM, všechny sekvence subtypu Ixb náležely k MMD. Variabilita *C. tyzzeri* je podrobněji popsána v Kap. 5.2.

Druh *C. parvum* byl nalezen u 19 myší (3,3 %), z nichž 2 (0,3 %) byly ve smíšené infekci s druhem *C. tyzzeri*, respektive *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II. Ve všech případech jsme u *C. parvum* na genu SSU (Obr. 4) detekovali 100% shodu s izolátem ze skotu v Austrálii (AF093493, Xiao *et al.* 1999b). Při fylogenetické analýze genu GP60 se alignment zformoval ve dvě skupiny sekvencí, obě náležely k subtypu IIaA16G1R1 (Obr. 5A). Tento subtyp IIa byl již nalezen u skotu, zejména pak telat, a u lidí (Del Coco *et al.* 2014; Feltus *et al.* 2006; Herges *et al.* 2012; Silverlas *et al.* 2012; Soba and Logar 2008; Trotz-Williams *et al.* 2006; Valenzuela *et al.* 2014). Nízká prevalence *C. parvum* byla detekována i v dalších studiích na drobných hlodavcích (Čondlová *et al.* 2019; Horčíčková *et al.* 2019). Naše výsledky podporují teorii, že myši obvykle přijmou oocysty *C. parvum* s potravou, infikovanou výkaly skotu, a že hlodavci mohou v chovech skotu působit jako rezervoár kryptosporidiové infekce (Feng *et al.* 2011b; Foo *et al.* 2007; Morgan *et al.* 1999a; Ziegler *et al.* 2007).

Tři vzorky (0,5 %) obsahovaly druh *C. hominis*, jeden z nich z poddruhu MMM a dva z MMD. Všechny tyto vzorky byly na genu GP60 100% shodné se sekvencí, získanou z vody jezera Milwaukee (Zhou *et al.* 2003), v GenBank vedenou pod kódem AY262031 (Obr. 5A). Vzorky náležely k subtypu IbA10G2, který je ze všech subtypů nejběžnější v Evropě (Alves *et al.* 2006; Chalmers *et al.* 2008; Zintl *et al.* 2009), ačkoli ve studované oblasti dosud popsán nebyl. Tento subtyp se zdá být virulentnější, než jiné subtypy, které jsou spojované s kryptosporidiózou u lidí (Cama *et al.* 2008). Pokud je nám známo, jedná se o první popis přirozené infekce *C. hominis* u myši domácí.

Byly nalezeny také dva vzorky, které byly fylogeneticky příbuzné ke *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II (prevalence 0,3 %), jeden z MMM a druhý z MMD. Na genu SSU se obě sekvence se mírně liší, přičemž jedna je identická s referenční sekvencí č. MH913000, zatímco druhá vytváří samostatnou větev. Na genu GP60 jsou obě sekvence stejné a nebyla k nim v GenBank nalezena reference (Obr. 5A). Není neobvyklé, že v rámci jednoho druhu kryptosporidie mohou být některé geny

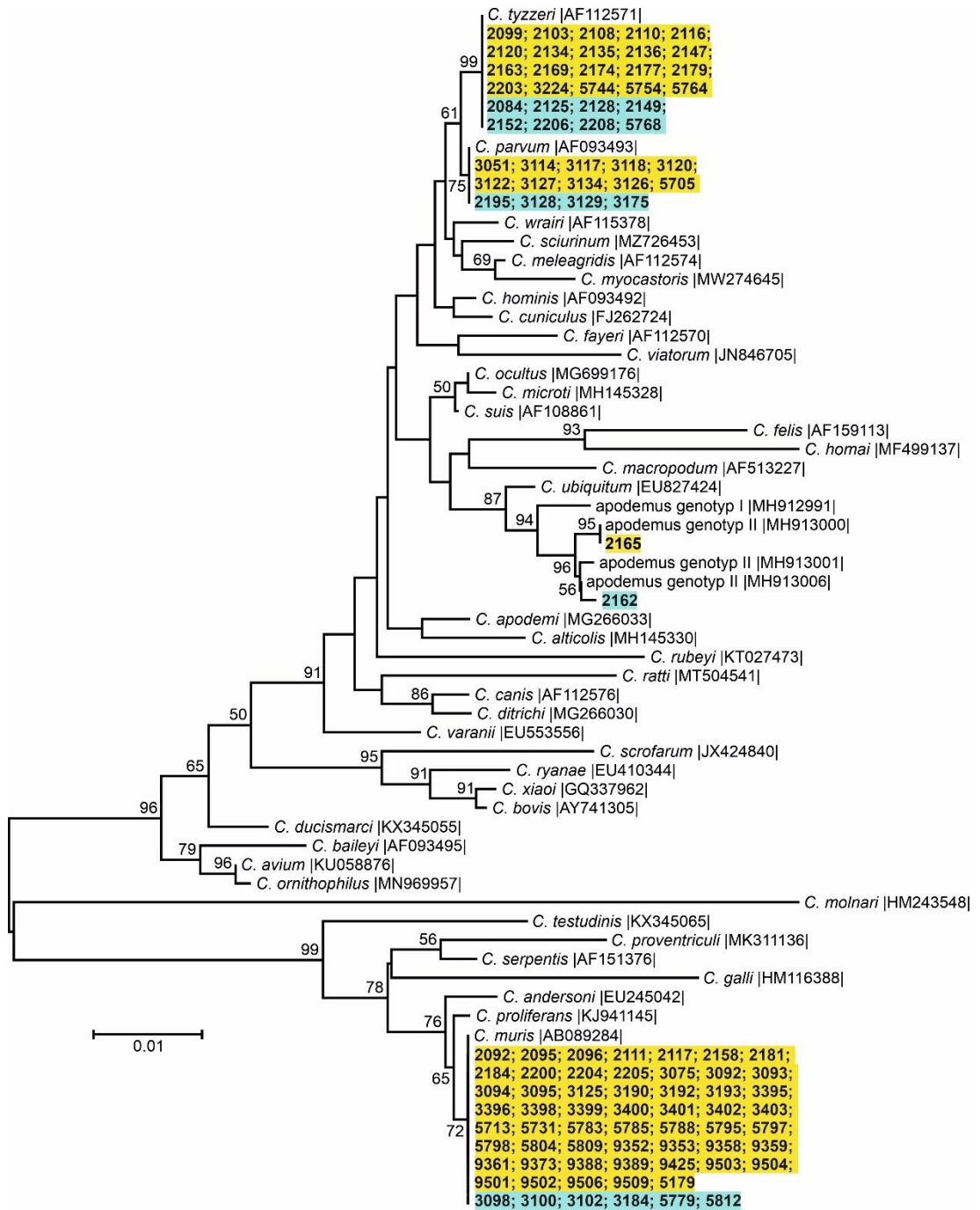
variabilní. Prediger *et al.* (2021) se domnívají, že divergentní genotypy jsou paralogy v konkrétním druhu/genotypu kryptosporidie. Podobně byly zaznamenány divergentní typy genu pro SSU u *C. andersoni*, *C. apodemi*, *C. ditrichi*, *C. parvum*, *C. ubiquitous*, *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp I a II, *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp II nebo *Cryptosporidium* sp. rat genotyp II a III (Čondlová *et al.* 2018, 2019; Deng *et al.* 2020; Le Blancq *et al.* 1997; Ng-Hublin *et al.* 2013; Stenger *et al.* 2015). Na genu SSU i GP60 klastrovaly námi nalezené vzorky s *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II, nedávno popsánému u myšic, pro něž se zdá být specifický (Čondlová *et al.* 2019). Díky sdílení habitatu myši a myšic, kdy se myšice před zimou stahují z volné přírody do větší blízkosti lidských sídel, může mezi těmito druhy docházet k přenosu kryptosporidiové infekce. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že v citované studii bylo u myšic poprvé popsáno *C. tyzzeri*, které je hostitelsky specifické pro myši domácí (Ren *et al.* 2012). Zatím není prostudováno, zda může *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II způsobovat u myši infekci (nebo naopak *C. tyzzeri* u myšic), či zda se jedná pouze o mechanickou pasáž oocyst, vyskytujících se v prostředí, kontaminovaném výkaly infikovaných zvířat, jak už bylo popsáno například u lišek (Kváč *et al.* 2021), norků a činčil (Kellnerová *et al.* 2017), prasat (Němejc *et al.* 2013), či ptáků (Holubová *et al.* 2020; Li *et al.* 2016).

Na základě metody MLST bylo u druhu *C. muris* dosud popsáno 13 subtypů na lokusu MS1 a 6 subtypů na lokusu MS2, MS3 i MS16 (Feng *et al.* 2011a; Wagnerová *et al.* 2015; Wang *et al.* 2012, 2021). V naší studii jsme u *C. muris* popsali na lokusu MS1 4 nové subtypy (Obr. 6) a na lokusech MS3 a MS16 dva nové subtypy (Obr. 7). Rozdíly na těchto lokusech spočívají pouze v kopiích mikrosatelitních a minisatelitních opakování (Feng *et al.* 2011a). Ze tří dosud popsáných žaludečních druhů kryptosporidií se *C. muris* jeví jako nejpolymorfnější druh, u *C. andersoni* bylo dosud na jednotlivých lokusech identifikováno maximálně 5 subtypů (Wang *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2014), a u nedávno popsané *C. proliferans* (**publikace 2**) byly na lokusech MS1, respektive MS16 identifikovány 3 subtypy a na lokusech MS2, respektive MS3 pouze jeden subtyp. Nižší genetická diverzita u *C. andersoni* se dá vysvětlit tím, že skot byl domestikován relativně nedávno a předpokládá se tedy, že pochází jen z několika málo míst v Evropě a na Blízkém Východě (Feng *et al.* 2011a). Naproti tomu hlodavci jsou hojně rozšíření a jejich široká škála druhů žije v různých ekologických nikách. Široká hostitelská specifita *C. muris* a geografická izolace

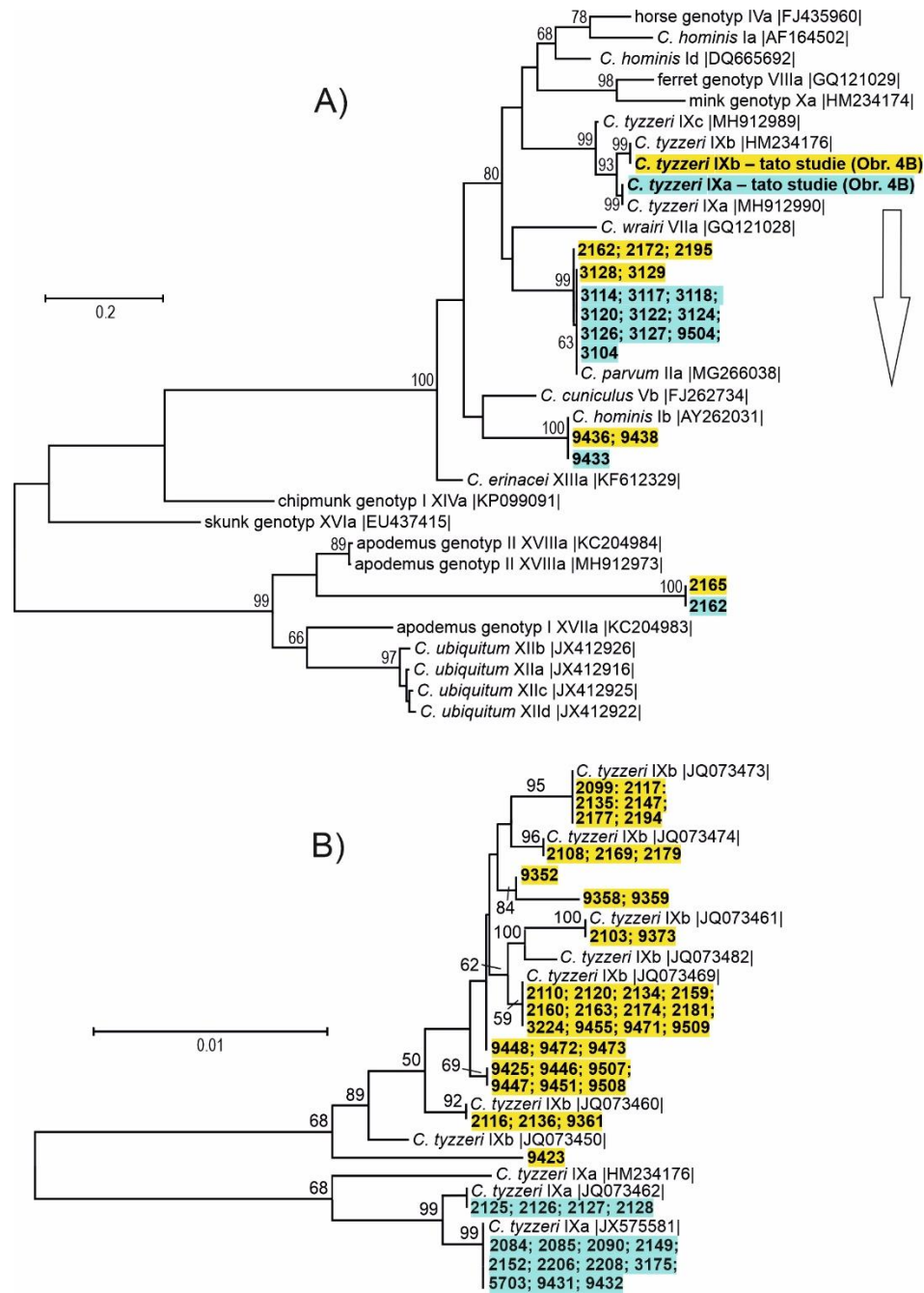


některých druhů hlodavců vedly pravděpodobně k vzniku hostitelsky adaptovaných subtypů, jak je tomu například v případě *C. parvum* (Xiao 2010).

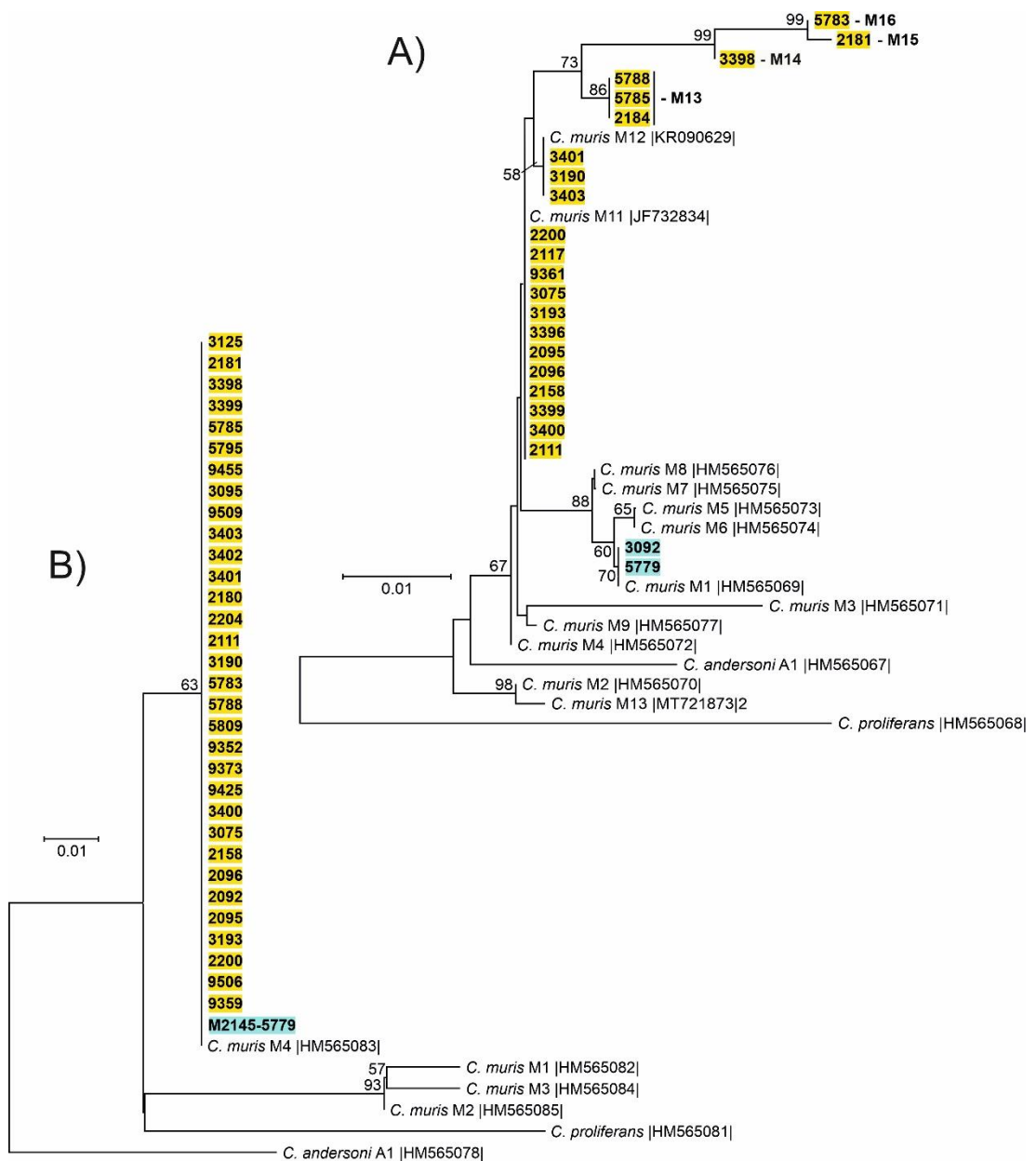
**Obrázek 4:** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z myši (*Mus musculus*) (tučně) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU) vytvořený metodou maximum likelihood v programu MEGA 6, 1000× bootstrap, znázorněny podpory větví více než 50 %. Vzorky z myši *Mus musculus domesticus* jsou znázorněny žlutě, z myši *M. m. musculus* modře.



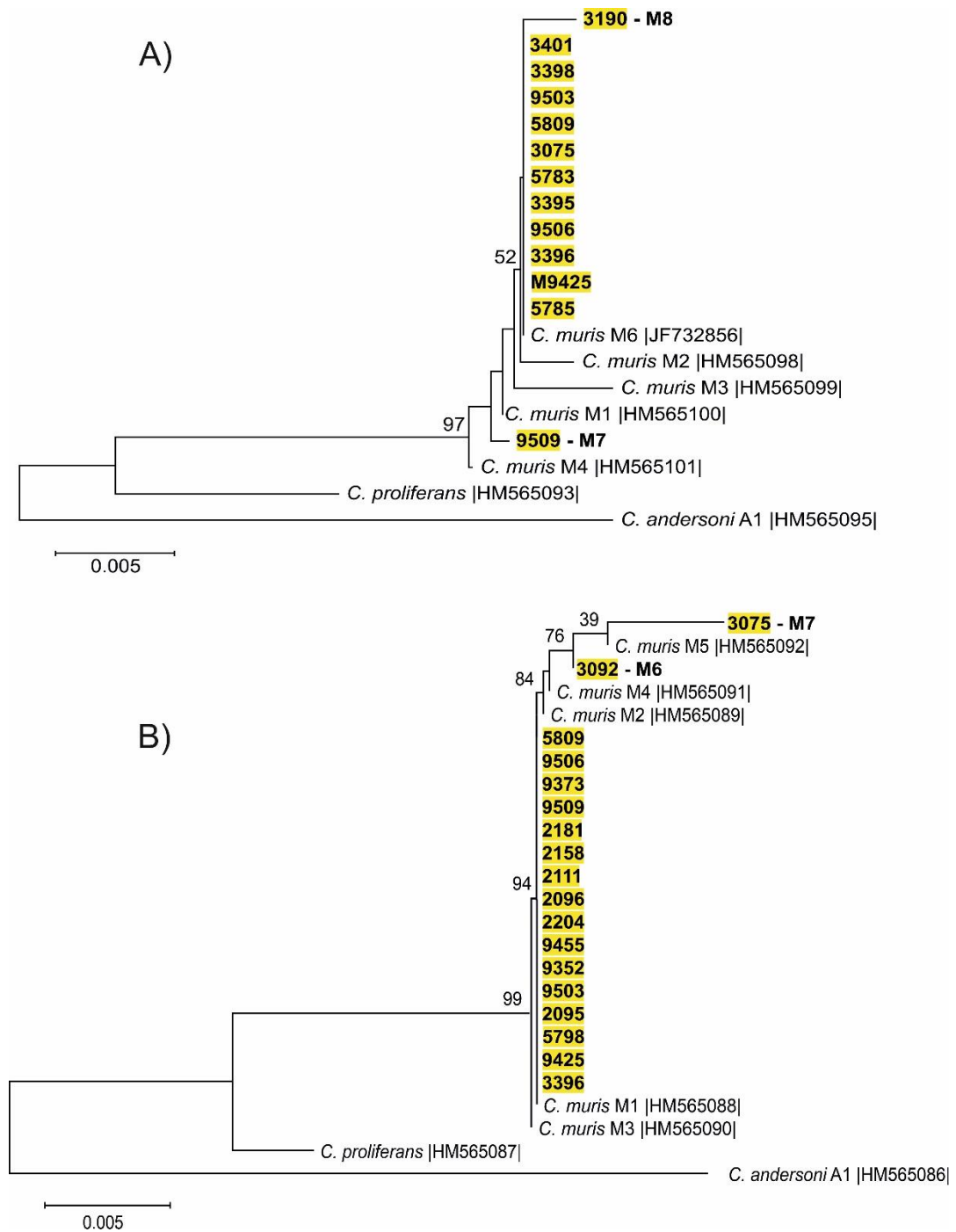
**Obrázek 5:** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z myši (*Mus musculus*) (tučně) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího 60 kDa glykoprotein (GP60) vytvořený metodou maximum likelihood v programu MEGA 6, 1000× bootstrap, znázorněny podpory větvi více než 50 %. Vzorky z myši *Mus musculus domesticus* jsou znázorněny žlutě, z myši *M. m. musculus* modře. Obr. A – všechny získané sekvence kromě druhu *C. tyzzeri*, ty jsou detailně zobrazeny na Obr. B.



**Obrázek 6:** Kladogram fylogenetických vztahů námi získaných izolátů *C. muris* (tučně) s popsányi subtypy žaludečních druhů kryptosporidií na základě nukleotidové sekvence mikrosatelitních lokusů MS1 (Obr. 6A) a MS2 (Obr. 6B) vytvořený metodou maximum likelihood v programu MEGA 6, 1000× bootstrap, znázorněny podpory větví více než 50 %. Vzorky z myši *Mus musculus domesticus* jsou znázorněny žlutě, vzorky z myši *M. m. musculus* modře.



**Obrázek 7:** Kladogram fylogenetických vztahů námi získaných izolátů *C. muris* (tučně) s popsányi subtypy žaludečních druhů kryptosporidií na základě nukleotidové sekvence mikrosatelitních lokusů MS3 (Obr. 7A) a MS16 (Obr. 7B) vytvořený metodou maximum likelihood v programu MEGA 6, 1000× bootstrap, znázorněny podpory větví více než 50 %. Na těchto lokusech se podařilo amplifikovat pouze vzorky z myši *Mus musculus domesticus* (pro přehlednost znázorněny žlutě, jako na předchozích obrázcích).



**Tabulka 2:** Přehled druhů a genotypů kryptosporidií, získaných na základě amplifikace genů pro malou podjednotku rRNA (SSU), 60 kDa glykoprotein (GP60) a u *C. muris* pro mikrosatelitní lokusy MS1, MS2, MS3 a MS16, u dvou poddruhů myši domácí a na jednotlivých lokalitách. Použité zkratky: CZ – Česká republika, D – Německo; MMM – *Mus m. musculus*, MMD – *M. m. domesticus*; M – samec, F – samice. Tučně jsou vyznačeny nově popsané druhy/genotypy/subtypy a lokality s výskytem smíšené infekce; *C. tyzzeri* a *C. parvum* byla nalezena na lokalitě Květná, *C. parvum* a *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II na lokalitě Obilná 2; na ostatních zvýrazněných lokalitách byly smíšené infekce *C. muris* a *C. tyzzeri*.

Stát	Lokalita	Poddruh myši	Počet celkem/ pozitivních	Číslo myši	Pohlaví	<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>C. muris</i> MS geny			
						SSU	GP60	MS1	MS2	MS3	MS16
CZ	Bezvěrov	MMM	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Blažim	MMM	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-
				2090	M	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
	Buškovice 2	MMM	18/3	2152	F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
				2172	M	-	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
	Ctiboř	MMM	5/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Děvín	MMD	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dolní Dvory	MMM	17/1	5779	M	<i>C. muris</i>	-	M1	M4	-	-
	Dolní Pelhřimov 2	MMD	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dolní Žandov 3	MMM	3/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hazlov 266	MMD	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hodovíz	MMM	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Horní Ves (Trstěnice)	MMM	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hranice 787	MMD	5/1	9447	M	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
	Hrzín 49	MMD	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-
				2147	F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
	Hůrka 1	MMD	7/3	2163	M	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2165	M	<b>apodemus II</b>	-	-	-	-	-
	Hůrka 3	MMD	6/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Chlum Svaté Máří 1	MMM	11/2	3128	M	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
				3129	F	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
	Chotíkov 2	MMM	8/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Chrašřany 11	MMM	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Chrašřany 39	MMM	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Jindřichov 31	MMD	4/1	3114	F	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
	Jindřichov 32	MMD	6/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Josefov 20	MMM	6/2	9431	M	-	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
				9432	F	-	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
	Kaceřov 2	MMM	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Kopanina 37	MMD	3/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Kopaniny	MMD	5/2	9436	F	-	<i>C. hominis</i> Ib	-	-	-	-
				9438	M	-	<i>C. hominis</i> Ib	-	-	-	-
Kozlov	MMM	6/0	-	-	-	-	-	-	-	-	
Krajková 20	MMM	2/1	3184	M	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	-	
Krajková, Windy Hill	MMM	3/0	-	-	-	-	-	-	-	-	
Krasíkov	MMM	5/0	-	-	-	-	-	-	-	-	

**Tabulka 2 (pokračování):** Přehled druhů a genotypů kryptosporidií, získaných na základě amplifikace genů pro malou podjednotku rRNA (SSU), 60 kDa glykoprotein (GP60) a u *C. muris* pro mikrosatelitní lokusy MS1, MS2, MS3 a MS16, u dvou poddruhů myši domácí a na jednotlivých lokalitách. Použité zkratky: CZ – Česká republika, D – Německo; MMM – *Mus m. musculus*, MMD – *M. m. domesticus*; M – samec, F – samice. Tučně jsou vyznačeny nově popsané druhy/genotypy/subtypy a lokality s výskytem smíšené infekce; *C. tyzzeri* a *C. parvum* byla nalezena na lokalitě Květná, *C. parvum* a *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II na lokalitě Obilná 2; na ostatních zvýrazněných lokalitách byly smíšené infekce *C. muris* a *C. tyzzeri*.

Stát	Lokalita	Poddruh myši	Počet celkem/ pozitivních	Číslo myši	Pohlaví	<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>C. muris</i> MS geny			
						SSU	GP60	MS1	MS2	MS3	MS16
CZ	Krásné Údolí	MMM	2/2	2084	M	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
				2085	M	-	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
	Kryry	MMM	2/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Křižovatka 79	MMD	5/2	9455	M	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	M4	-	M1
				9509	F	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	M4	<b>M7</b>	M1
	Křižovatka 2	MMD	5/2	3122	M	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
				5764	M	<i>C. tyzzeri</i>	-	-	-	-	-
	Květná	MMM	7/2	3175	F	<i>C. parvum</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
				5768	F	<i>C. tyzzeri</i>	-	-	-	-	-
	Květná 14	MMM	1/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Kyjov	MMM	5/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Libá 1	MMD	1/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Lipná 39 (Hazlov)	MMD	4/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Lipová	MMM	2/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Lom u Tachova	MMM	1/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Lomany	MMM	4/1	5812	M	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	
	Lužná	MMD	3/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Milhostov 3	MMD	2/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Mokřiny	MMD	4/2	9451	M	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				9471	F	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
	Mostov 10	MMM	9/1	3098	F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	
	Mostov 26	MMM	1/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Mýtinka 2	MMD	3/0	-	-	-	-	-	-	-	-
				3100	F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	
	Nebanice 3	MMM	13/3	3102	F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	
				9505	M	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	
	Nepomyšl 172	MMM	3/0	-	-	-	-	-	-		
	Nová Ves 1	MMD	4/0	-	-	-	-	-	-		
	Novosedly 177	MMD	6/3	9448	F	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	
				9472	M	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	
				9473	F	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	
	Nový Drahov	MMD	3/0	-	-	-	-	-	-		
Nový Drahov 14	MMD	5/1	3051	M	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-		
Nový Kostel 33	MMD	2/0	-	-	-	-	-	-			
Obilná 2	MMM	14/2	2162	M	<b>apodemus II</b>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-		
			2195	M	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-		
Odrava 26	MMM	7/0	-	-	-	-	-	-			
Pastuchovice	MMM	9/0	-	-	-	-	-	-			
Pernárec	MMM	2/0	-	-	-	-	-	-			

**Tabulka 2 (pokračování):** Přehled druhů a genotypů kryptosporidií, získaných na základě amplifikace genů pro malou podjednotku rRNA (SSU), 60 kDa glykoprotein (GP60) a u *C. muris* pro mikrosatelitní lokusy MS1, MS2, MS3 a MS16, u dvou poddruhů myši domácí a na jednotlivých lokalitách. Použité zkratky: CZ – Česká republika, D – Německo; MMM – *Mus m. musculus*, MMD – *M. m. domesticus*; M – samec, F – samice. Tučně jsou vyznačeny nově popsané druhy/genotypy/subtypy a lokality s výskytem smíšené infekce; *C. tyzzeri* a *C. parvum* byla nalezena na lokalitě Květná, *C. parvum* a *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II na lokalitě Obilná 2; na ostatních zvýrazněných lokalitách byly smíšené infekce *C. muris* a *C. tyzzeri*.

Stát	Lokalita	Poddruh myši	Počet celkem/ pozitivních	Číslo myši	Pohlaví	<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>C. muris</i> MS geny			
						SSU	GP60	MS1	MS2	MS3	MS16
CZ	Plesná 275	MMD	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Poustka 15	MMD	4/1	3127	F	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
	Poustka 5	MMD	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Poustka 2	MMD	4/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Přehořov	MMM	3/1	5703	F	-	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
					M	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
	Přílezy	MMM	11/4	2126	F	-	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
					M	-	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
					M	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
	Přílezy - Vepřín	MMM	2/1	2114	F	<i>C. parvum</i>	-	-	-	-	-
	Rudolec 4	MMM	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Stará Voda	MMM	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Starý Hrozňatov 7	MMD	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-
					F	<i>C. muris</i>	-	<b>M1</b>	-	-	<b>M6</b>
	Starý Rybník (vepřín)	MMD	4/4	3092	F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	-
					M	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	
					F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	
				3095	M	<i>C. muris</i>	-	<b>M4</b>	-	-	
	Střížov 36	MMD	4/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Šabina (koně)	MMM	4/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Teleč	MMM	2/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Týniště 2	MMM	6/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Úbočí (koně)	MMM	1/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Verušičky 1	MMM	4/2	2206	F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
					F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-	-
	Vrbice 7	MMM	6/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Vrbička	MMM	3/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Vrbička 23	MMM	6/0	-	-	-	-	-	-	-	
Ypsilonka	MMM	1/1	9433	M	-	<i>C. hominis</i> Ib	-	-	-		
Žebnice	MMM	4/0	-	-	-	-	-	-	-		
Žihle	MMM	4/0	-	-	-	-	-	-	-		
Žihle 133	MMM	1/0	-	-	-	-	-	-	-		
Žihle 50	MMM	5/0	-	-	-	-	-	-	-		
Žihle (statek)	MMM	1/1	2149	F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXa	-	-	-		
D	<b>Benk 1</b>	MMD	6/4	9358	F	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	
				9359	M	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	<b>M4</b>	-	
				9501	F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	
				9502	M	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	
Birk 4	MMD	2/0	-	-	-	-	-	-			



**Tabulka 2 (pokračování):** Přehled druhů a genotypů kryptosporidií, získaných na základě amplifikace genů pro malou podjednotku rRNA (SSU), 60 kDa glykoprotein (GP60) a u *C. muris* pro mikrosatelitní lokusy MS1, MS2, MS3 a MS16, u dvou poddruhů myši domácí a na jednotlivých lokalitách. Použité zkratky: CZ – Česká republika, D – Německo; MMM – *Mus m. musculus*, MMD – *M. m. domesticus*; M – samec, F – samice. Tučně jsou vyznačeny nově popsané druhy/genotypy/subtypy a lokality s výskytem smíšené infekce; *C. tyzzeri* a *C. parvum* byla nalezena na lokalitě Květná, *C. parvum* a *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II na lokalitě Obilná 2; na ostatních zvýrazněných lokalitách byly smíšené infekce *C. muris* a *C. tyzzeri*.

Stát	Lokalita	Poddruh myši	Počet celkem/ pozitivních	Číslo myši	Pohlaví	<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>C. muris</i> MS geny			
						SSU	GP60	MS1	MS2	MS3	MS16
D	Braunersgrün	MMD	8/4	2159	M	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2160	M	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2194	F	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2203	F	<i>C. tyzzeri</i>	-	-	-	-	-
	Eckartsreuth 1	MMD	4/1	3118	F	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
				Egerteich 7	MMD	2/0	-	-	-	-	-
	Emtmannsberg 6	MMD	3/3	3104	F	-	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
				3117	F	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
				3124	M	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
	Friedmannsdorf 9	MMD	4/3	3192	F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	-
				3399	F	<i>C. muris</i>	-	M11	M4	-	-
				3400	M	<i>C. muris</i>	-	M11	M4	-	-
	Grossweiglareuth	MMD	1/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Harsthaus 3	MMD	2/1	9423	M	<i>C. tyzzeri</i>	-	-	-	-	-
				2092	M	<i>C. muris</i>	-	-	M4	-	-
	Hebanz	MMD	6/3	2108	M	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2169	M	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
	Hiltershof 4	MMD	2/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Hohenberg 1	MMD	14/2	2103	M	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				5705	F	<i>C. parvum</i>	-	-	-	-	-
	Kemnath	MMD	1/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Kübelhof 1	MMD	5/3	5783	M	<i>C. muris</i>	-	<b>M14</b>	M4	M6	-
				5785	M	<i>C. muris</i>	-	<b>M13</b>	M4	M6	-
				9504	F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	-
				2184	M	<i>C. muris</i>	-	<b>M13</b>	-	-	-
				2204	F	<i>C. muris</i>	-	-	M4	-	M1
				2205	F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	-
				3125	F	<i>C. muris</i>	-	-	M4	-	-
				3190	F	<i>C. muris</i>	-	M12	M4	<b>M8</b>	-
				3398	M	<i>C. muris</i>	-	<b>M16</b>	M4	-	-
				<b>Kübelhof 2</b>	MMD	24/13	3401	F	<i>C. muris</i>	-	M12
	3403	M	<i>C. muris</i>	-			M12	M4	-	-	
	5798	F	<i>C. muris</i>	-			-	-	-	M1	
5809	F	<i>C. muris</i>	-	-			M4	M6	M1		
9352	M	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-			M4	-	M1		
9353	F	<i>C. muris</i>	-	-			-	-	-		
9503	M	<i>C. muris</i>	-	-			-	M6	M1		

**Tabulka 2 (pokračování):** Přehled druhů a genotypů kryptosporidií, získaných na základě amplifikace genů pro malou podjednotku rRNA (SSU), 60 kDa glykoprotein (GP60) a u *C. muris* pro mikrosatelitní lokusy MS1, MS2, MS3 a MS16, u dvou poddruhů myši domácí a na jednotlivých lokalitách. Použité zkratky: CZ – Česká republika, D – Německo; MMM – *Mus m. musculus*, MMD – *M. m. domesticus*; M – samec, F – samice. Tučně jsou vyznačeny nově popsané druhy/genotypy/subtypy a lokality s výskytem smíšené infekce; *C. tyzzeri* a *C. parvum* byla nalezena na lokalitě Květná, *C. parvum* a *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II na lokalitě Obilná 2; na ostatních zvýrazněných lokalitách byly smíšené infekce *C. muris* a *C. tyzzeri*.

Stát	Lokalita	Poddruh myši	Počet celkem/ pozitivních	Číslo myši	Pohlaví	<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>C. muris</i> MS geny			
						SSU	GP60	MS1	MS2	MS3	MS16
D	Lehsten	MMD	23/8	2095	F	<i>C. muris</i>	-	M11	M4	-	M1
				2096	F	<i>C. muris</i>	-	M11	M4	-	M1
				2110	M	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2111	M	<i>C. muris</i>	-	M11	M4	-	M1
				2120	F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2181	M	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	<b>M15</b>	M4	-	M1
				2200	F	<i>C. muris</i>	-	M11	M4	-	-
				3224	F	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
	Löschwitz 18	MMD	1/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Münchenreuth 31	MMD	3/1	3402	M	<i>C. muris</i>	-	-	M4	-	-
	Neuenreuth	MMD	1/1	2174	F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
	Neuenreuth 15	MMD	5/2	5744	F	<i>C. tyzzeri</i>	-	-	-	-	-
				5754	F	<i>C. tyzzeri</i>	-	-	-	-	-
	Neuenreuth 8	MMD	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Neuköslarn	MMD	5/0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ottmannsreuth	MMD	14/3	3120	F	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
				3193	M	<i>C. muris</i>	-	M11	M4	-	-
	Pilgramsreuth	MMD	9/0	5763	F	<i>C. tyzzeri</i>	-	-	-	-	-
				-	-	-	-	-	-	-	
	Plössberg 25	MMD	4/1	9506	M	<i>C. muris</i>	-	-	M4	M6	-
				9361	M	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	M11	-	-	-
	Plössberg 42	MMD	5/2	9389	F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	-
				-	-	-	-	-	-	-	
	Plössen 18	MMD	2/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Plössen 1	MMD	5/2	9507	F	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				9508	M	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
	Rieglersreuth	MMD	2/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Roslas 7	MMD	3/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Röthelbach	MMD	4/2	5795	M	<i>C. muris</i>	-	-	M4	-	-
				5797	M	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	-
	Selb North	MMD	2/0	-	-	-	-	-	-	-	
	Seybothenreuth	MMD	3/2	9425	M	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	M4	M6	M1
				9446	M	-	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
Schatzbach	MMD	1/0	-	-	-	-	-	-	-		
Schlömen 10	MMD	3/3	3075	M	<i>C. muris</i>	-	M11	M4	M6	<b>M7</b>	
			3395	M	<i>C. muris</i>	-	-	-	M6	-	
			3396	M	<i>C. muris</i>	-	M11	-	M6	-	

**Tabulka 2 (pokračování):** Přehled druhů a genotypů kryptosporidií u jednotlivých poddruhů myši domácí a na jednotlivých lokalitách. Použité zkratky: CZ – Česká republika, D – Německo; MMM – *Mus m. musculus*, MMD – *M. m. domesticus*; M – samec, F - samice. Tučně jsou vyznačeny nově popsané druhy/genotypy/subtypy a lokality s výskytem smíšené infekce; *C. tyzzeri* a *C. parvum* byla nalezena na lokalitě Květná, *C. parvum* a *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II na lokalitě Obilná 2; na ostatní zvýrazněných lokalitách byly smíšené infekce *C. muris* a *C. tyzzeri*.

Stát	Lokalita	Poddruh myši	Počet celkem/ pozitivních	Číslo myši	Pohlaví	<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>C. muris</i> MS geny			
						SSU	GP60	MS1	MS2	MS3	MS16
D	Straas 2	MMD	25/11	2099	F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2116	F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2117	F	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	M11	-	-	-
				2135	F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2136	M	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2158	F	<i>C. muris</i>	-	M11	M4	-	M1
				2177	M	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2179	F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-
				2180	M	<i>C. tyzzeri</i>	-	-	M4	-	-
				5788	M	<i>C. muris</i>	-	<b>M13</b>	M4	-	-
	5804	M	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	-			
	Unterschwarzach	MMD	1/0	9428	F	<i>C. tyzzeri</i>	-	-	-	-	
	Unterweissenbach	MMD	8/4	5713	F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	
				5731	F	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	
				9373	M	<i>C. muris</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	M4	-	M1
	9388	M	<i>C. muris</i>	-	-	-	-	-			
	Weickenreuth 22	MMD	3/1	3126	F	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> IIa	-	-	-	-
	Wolfsbühl	MMD	8/1	2134	F	<i>C. tyzzeri</i>	<i>C. tyzzeri</i> IXb	-	-	-	-

## 5.2 Koevoluce *C. tyzzeri* a myši domácí

### 5.2.1 Fylogenetická analýza vzorků z hybridní zóny

Celkem 32 vzorků z HMHZ, které byly pozitivní na přítomnost *C. tyzzeri*, bylo podrobena fylogenetické analýze na genech pro SSU, GP60, COWP, TRAP-C1 a actin (**publikace 1**). Vzorky ze západní části zóny byly získány z myši poddruhu MMD, vzorky z východní části zóny náležely k poddruhu MMM. Dále bylo analyzováno 12 vzorků, získaných z Christchurch na Novém Zélandu. Poddruh těchto myši nebyl explicitně určen, ale na základě studie Searle *et al.* (2009) bylo možno předpokládat, že se jedná o poddruh MMD.

Na genu SSU byly všechny získané sekvence identické a odpovídaly dříve publikovaným sekvencím z myši domácí (AF112571, AF108863), a krajty královské (EU553589) (Morgan *et al.* 1999b; Pedraza-Díaz *et al.* 2009; Xiao *et al.* 1999a). U posledně jmenované sekvence popsali autoři, že se nejspíš jednalo o pasáž oocyst trávicím traktem plaza při krmení infikovanými myšmi (Pedraza-Díaz *et al.* 2009). Při fylogenetické analýze na genu COWP se zformovaly dvě skupiny C1 a C2: skupina C1 obsahovala všechny vzorky z východní části zóny (poddruh MMM), C2 obsahovala vzorky ze západní části zóny z myši poddruhu MMD a všechny vzorky, získané z myši z Nového Zélandu. Na tuto větev fylogenetického stromu nasedly i dříve publikované sekvence z myši z USA (Xiao *et al.* 2000b). Obdobná situace nastala na genu TRAP-C1, kde skupina T1 obsahovala všechny vzorky MMM a T2 obsahovala vzorky MMD jak ze západní části zóny, tak z Nového Zélandu. Na genu pro actin se zformovaly tři skupiny. Skupina A1 obsahovala všechny vzorky MMM, A2 zahrnovala všechny vzorky MMD a do skupiny A3 spadaly všechny vzorky z Nového Zélandu.

Analýza genu GP60 zformovala monofyletickou skupinu, rozdělenou na dvě větve, které odpovídaly subtypům IXa a IXb. Do subtypu IXa spadaly vzorky z myši MMM a také referenční sekvence, získané z myši z Číny a z dítěte z Kuwaitu (Ren *et al.* 2012; Sulaiman *et al.* 2005). I když v Číně žijí dva poddruhy myši domácí, MMM a *M. castaneus*, z dřívější studie vyplývá, že tento konkrétní vzorek byl z myši poddruhu MMM (Tsuchiya *et al.* 1994). K subtypu IXb klastrovaly všechny vzorky z MMD ze západní části zóny, novozélandské vzorky, a také referenční sekvence z MMD z USA (Feng *et al.* 2011a). Všechny sekvence z Nového Zélandu byly

identické a v rámci subtypu IXb zformovaly samostatnou skupinu, zatímco vzorky z obou stran HMHZ byly více diverzifikované. Ve shodě s dříve publikovanými studiiemi (Alves *et al.* 2006, Feltus *et al.* 2006; Gatei *et al.* 2007) byly získané sekvence na genu GP60 mnohem variabilnější, než na jiných genech.

Asi 500 tisíc let dlouhá izolace dvou myších poddruhů, a jejich následný kontakt zformoval úzký pruh hybridní zóny (Macholán *et al.* 2003). Tento biologický jev nám umožnil zjistit, že se typicky myši kryptosporidie, *C. tyzzeri*, vyvíjela společně se svým hostitelem. Výsledky ukazují na evidentní asociaci jednotlivých myších poddruhů a jejich příslušných subtypů *C. tyzzeri*, které jsou geneticky odlišné. Koevoluční vzorec, popsáný v této práci, je v rozporu se studiiemi provedenými na mikrosporidiiích a *Helicobacter* spp. (Sak *et al.* 2011; Wasimuddin *et al.* 2012), kde nebyla inklinace některého ze studovaných parazitů k jednomu, či druhému myšimu poddruhu prokázána.

### 5.2.2 Experimentální infekce

Osmítýdenní myši SCID, BALB/c, STUS (laboratorně odvozený kmen MMM) a SCHEST (MMD), pískomilové, mastomyši, morčata a myšice lesní byly infikovány izoláty *C. tyzzeri*-MMD (izolát HZ117) a *C. tyzzeri*-MMM (HZ206). Oba izoláty byly infekční pro všechny imunokompetentní (BALB/c, STUS, SCHEST) i imunodeficientní (SCID) myši. Naopak u ostatních druhů zvířat nebyla infekce prokázána ani mikroskopicky, ani pomocí PCR. Prepatentní perioda byla nejkratší u SCID myši, infikované izolátem *C. tyzzeri*-MMD (4 dny), nejdelší pak byla u SCHEST myši, infikované *C. tyzzeri*-MMM. Patentní perioda byla výrazně kratší u imunokompetentních myši (průměrně 12,6 dní), než u SCID myši (více než 26 dní). Zároveň izolát *C. tyzzeri*-MMM vykazoval významně delší patentní periodu, než *C. tyzzeri*-MMD u SCHEST myši. Oocysty *C. tyzzeri*-MMD byly významně menší ( $4,24 \times 3,69 \mu\text{m}$ ), než oocysty *C. tyzzeri*-MMM ( $4,49 \times 3,90 \mu\text{m}$ ) a oba izoláty měly výrazně menší oocysty, než druh *C. parvum* (Upton *et al.* 1985). Jejich velikosti odpovídaly dříve popsaným *C. tyzzeri* z divokých i laboratorních myši, myšic lesních, hrabošů polních a norníků rudých (Bednarska *et al.* 2003; Lv *et al.* 2009; Ren *et al.* 2012). Velikost oocyst jednotlivých izolátů se nelišila v rámci experimentálně infikovaných druhů.

Ačkoli jsme zjistili, že oba izoláty jsou infekční pro oba poddruhy myši domácí, což je v rozporu s naší teorií o koevoluci, tento závěr může mít několik důvodů. Detekovaná rozdílná délka prepatentní periody může vysvětlovat mechanismus selekce opačného subtypu *C. tyzzeri* u příslušného poddruhu myši domácí. Druh s kratší prepatentní periodou může vytlačit druh s delší periodou. Podobný mechanismus popsali Akiyoshi *et al.* (2003) u gnotobiotických selat, kde „rychlejší“ *C. hominis* převážilo příbuzný druh *C. parvum*. K experimentálním infekcím v této studii byly použity inbrední myši, laboratorně odvozené od divoce žijících poddruhů. Snížení genetické variability a heterozygotnosti hlavního histokompatibilního komplexu vlivem inbreedingu může zvyšovat vnímavost k parazitózám (Froeschke *et Sommer* 2005; MacDougall-Shackleton *et al.* 2005, Meyer-Lucht *et Sommer* 2005). Kromě toho, volně žijící myši jsou parazitováni celým spektrem různých parazitárních druhů (Baird *et al.* 2012; Sak *et al.* 2011; Wasimuddin *et al.* 2012) a vzájemné interakce mezi nimi a hostitelem jsou v podmínkách experimentu jen obtížně replikovatelné.

## 5.3 Popis nového druhu *Cryptosporidium proliferans*

Ačkoli jsou *C. muris* a *C. andersoni* primárně specifické pro hlodavce, resp. přežvýkavce, byly zaznamenány případy výskytu *C. muris* u přežvýkavců (Kváč *et al.* 2008a; Kodádková *et al.* 2010; Rhee *et al.* 1998) a *C. andersoni* u hlodavců (Kváč *et al.* 2013b; Neumayerová *et al.* 2008; Ryan *et al.* 2003). Podobně bylo *C. proliferans*, nový druh, popsán v této práci, nalezeno u hostitelů patřících do řádu hlodavců, sudokopytníků a lichokopytníků. S výjimkou výskytu *C. proliferans* u veverek v USA byly všechny ostatní izoláty popsány u zvířat v Africe (Feng *et al.* 2007; Kváč *et al.* 2008a; Sak *et al.* 2013) a v Evropě (**publikace 2**).

### 5.3.1 Fylogenetická analýza *C. proliferans*

Fylogenetická analýza založená na sekvencích genů SSU, COWP, TRAP-C1, HSP70, aktinu, MS1, MS2, MS3 a MS16 ukázala, že *C. proliferans* (dříve známo jako *C. muris* TS03) se geneticky liší od dalších známých druhů žaludečních kryptosporidií, *C. muris* a *C. andersoni*. Tato odlišnost je vyšší než u srovnatelně blízce příbuzných druhů *C. parvum* a *C. erinacei*, respektive *C. hominis* a *C. cuniculus*, nebo *C. bovis* a *C. xiaoi* (Kváč *et al.* 2014; Robinson *et al.* 2010; **publikace 1**).

Na lokusu HSP70 bylo *C. proliferans* identické s izolátem *C. muris* Kawatabi (AY643490) (Nakai *et al.* 2004). Izolát *C. muris* Kawatabi klastruje k *C. proliferans* také na lokusu SSU, což naznačuje, že by se mohlo jednat o stejný druh. K ověření této skutečnosti by byla nutná další genetická a biologická charakterizace izolátu Kawatabi.

*Cryptosporidium proliferans* se také odlišuje od *C. muris* a *C. andersoni* na čtyřech minisatelitních lokusech, zkoumaných v **publikaci 2**. *Cryptosporidium muris* RN66, komerčně dodávaný referenční kmen (Waterborne Inc, LA), je dobře charakterizován a je známa sekvence celého genomu. Sekvence SSU tohoto kmene se liší od sekvence *C. proliferans*. Podobně předchozí studie ukázaly, že *C. muris* CB03 je v SSU lokusu shodný s RN66 a liší se od *C. proliferans* (Jalovecká *et al.* 2010; Kváč *et al.* 2008a). Feng *et al.* (2011a) na základě těchto studií připustili, že jejich závěr, že izoláty *C. muris* RN66 a CB03 jsou shodné s *C. proliferans* na SSU a minisatelitních lokusech, je pravděpodobně výsledkem křížové kontaminace při manipulaci s izolátem.

### 5.3.2 Biologické vlastnosti *C. proliferans*

Tato práce a studie Srétera *et al.* (2000) ukázaly, že oocysty *Cryptosporidium proliferans* ( $7,7 \times 5,3 \mu\text{m}$ ) jsou delší a užší než oocysty *C. muris* HZ206 ( $7,5 \times 5,7 \mu\text{m}$ ) a *C. andersoni* ( $7,6 \times 5,5 \mu\text{m}$ ). Během více než 10 let pasáže oocyst různými hostiteli jsme nezaznamenali žádné změny ve velikosti či tvaru oocyst (nepublikováno). Protože však uváděná velikost oocyst *C. andersoni* a *C. muris* je značně variabilní (Hůrková *et al.* 2003; Chalmers *et al.* 1997; Lindsay *et al.* 2000), nelze morfometrii oocyst použít ke spolehlivému odlišení těchto druhů od *C. proliferans*. Tvar a velikost oocyst *C. proliferans* se také výrazně liší od oocyst střevních druhů, jako jsou *C. xiaoi* ( $3,94 \times 3,44 \mu\text{m}$ ), *C. parvum* ( $5,3 \times 4,7 \mu\text{m}$ ) nebo *C. suis* ( $6,2 \times 5,5 \mu\text{m}$ ) (Fayer *et al.* 2009; Vítovec *et al.* 2006).

Prepatentní perioda *C. proliferans* u SCID myši se pohybovala v rozmezí 12 – 18 DPI s průměrem 14 DPI (Kváč *et al.* 2011), což odpovídá prepatentní periodě u *C. muris* Kawatabi (14 DPI) a je delší, než prepatentní perioda u *C. muris* RN66 (6 DPI) a *C. muris* CB03 (7 DPI; nepublikováno) u SCID myši (Satoh *et al.* 2003). V práci, studující infekci *C. muris* RN66 u bezsrstých myši, které specificky postrádají T-buněčnou imunitu, byla po dávce 1 milion oocyst (což je dávka použitá i v této studii), zaznamenána prepatentní perioda 10 DPI (Taylor *et al.* 1999). Delší prepatentní perioda byla pozorována pouze u nižších dávek 20 000 oocyst (15 – 18 DPI) a 400 oocyst (16 DPI). Podobně byla pozorována prepatentní perioda 10 DPI u outbredních bezsrstých myši i SCID myši infikovaných 500 000 oocyst *C. muris* RN66 (McDonald *et al.* 1992). V souladu s uvedenými studiemi je prepatentní perioda u *C. proliferans* u imunokompromitovaných myši (15 – 20 DPI), u imunokompetentních mastomyši odpovídá *C. andersoni* (20 DPI), ale je delší, než u *C. muris* (6 – 10 DPI). Výsledky této práce podporují hypotézu, že *C. proliferans* má u myši delší prepatentní periodu, než *C. muris*.

*Cryptosporidium proliferans* se vyvíjí výhradně ve žláznaté části žaludku, podobně jako *C. muris* a *C. andersoni* (Anderson 1987; Kváč *et Vítovec* 2003; Lindsay *et al.* 2000; Pospischil *et al.* 1987), a jeho životní cyklus se podobá cyklu *C. muris* (Melicherová *et al.* 2014; Tyzzer 1910). Klinický průběh infekce *C. proliferans* u imunokompetentních mastomyši je ale značně odlišný od infekce *C. muris*. Tyto myši vylučují oocysty *C. proliferans* mnohem déle a s větší intenzitou než oocysty



*C. muris* a na rozdíl od *C. muris*, *C. proliferans* způsobuje významné klinické a patologické změny, včetně úbytku hmotnosti a masivní proliferace žaludeční sliznice, která je spojena s téměř šestinásobným zvýšením hmotnosti žaludku. Ačkoli žaludeční kryptosporidie vyvolávají klinické příznaky u savců jen zřídka (Anderson *et al.* 1987; Iseki *et al.* 1989; Kváč *et al.* 2003; Ozkul *et al.* 1994), infekce *C. andersoni* u skotu způsobila až trojnásobné zvýšení hmotnosti abomasa, snížení produkce mléka a ztrátu tělesné kondice (Anderson 1998; Esteban *et al.* 1995). *Cryptosporidium andersoni* také způsobuje celoživotní infekci u skotu a myší (Koyama *et al.* 2005; Kváč *et al.* 2008a; Lindsay *et al.* 2000), podobně jako *C. proliferans* u mastomyší. Jako u řady předchozích studií chybí u zvířat, infikovaných *C. proliferans* infiltráty v *propria mucosae* (Anderson 1987; Iseki *et al.* 1989; Kváč *et al.* 2003, 2008a, 2013b; Ozkul *et al.* 1994; Tyzzer 1910).

## 5.4 Případová studie lidské kryptosporidiózy

Pěťadvacetiletá žena, která v terénu odchytila volně žijící myši a pracovala s nimi v laboratorních podmínkách, onemocněla a projevil se u ní typické klinické příznaky kryptosporidiózy, včetně nekrvavého profuzního průjmu a dehydratace. Po začátku průjmu byly denně vyšetřovány vzorky stolice na přítomnost kryptosporidií, byl sledován průběh ukazatelů infekce, včetně konzistence a barvy stolice, frekvence defekace a intenzity infekce. V nátěrech stolice byly identifikovány oocysty kryptosporidií s typickými barvicími charakteristikami. Žena byla dvakrát vyšetřena na přítomnost exogenních stadií prvoků, vajíček helmintů, shigely, salmonely, kampylobacteria, *Clostridium difficile*, améb, rotavirů a norovirů. Žádné další bakteriální, virové nebo parazitární patogeny nebyly zjištěny. Testy na HIV před a po kryptosporidióze byly negativní.

PCR a sekvenční analýza vzorku stolice prokázala přítomnost *C. parvum* (GenBank č. JX445926), *C. tyzzeri* IXa (JX445925) a *C. tyzzeri* IXb (JX445924). Subtyp *C. parvum* IIAA13G1R1, popsáný v této studii, byl dříve nalezen u imunokompetentních lidí, pacientů s HIV/AIDS a domácích zvířat v Malajsii (Iqbal *et al.* 2012). Jediný případ lidské kryptosporidiózy způsobené *C. tyzzeri* (nesprávně uváděný jako *C. parvum* IIfA6) byl dříve popsán u kuvajtského dítěte (Sulaiman *et al.* 2005); zdroj infekce však nebyl identifikován. U imunokompetentních hostitelů kryptosporidióza obvykle trvá 10 až 14 dní, načež dojde k spontánnímu uzdravení, zatímco infekce u imunokompromitovaných hostitelů může způsobit závažné, perzistující onemocnění. Byly provedeny experimentální infekce zdravých dobrovolníků k prohloubení našich znalostí o trvání a intenzitě infekce a způsobech vylučování oocyst u imunokompetentních hostitelů (Chappell *et al.* 1999, 2006, 2011). Doba trvání, příznaky a symptomy onemocnění v naší práci jsou ve shodě s těmito studiemi. Medián trvání příznaků onemocnění v této případové studii (144 h tekutého průjmu) odpovídá nálezům u dobrovolníků infikovaných *C. parvum* (41 – 336 h, průměr 155 h), *C. hominis* (49 – 518 h, průměr 137 h) a *C. meleagridis* (50 – 105 h, průměr 77 h). Celkový počet nezformovaných stolic zjištěný v této případové studii (124) je však mnohem vyšší než počet u dobrovolníků infikovaných *C. parvum* (3 – 15, průměr 10), *C. hominis* (2 – 19, průměr 9) a *C. meleagridis* (3 – 15, průměr 8). Tento vyšší počet neformovaných stolic v tomto případě může být způsoben koinfekcí *C. parvum* s *C. tyzzeri*.

Zatímco *C. tyzzeri* je primárně omezeno na hlodavce a zdá se, že je adaptováno na myši domácí (Elwin *et al.* 2012), zoonotické *C. parvum* je běžné u hospodářských zvířat (Watanabe *et al.* 2005) a je zároveň jedním z nejčastějších druhů, způsobujících lidskou kryptosporidiózu. Ačkoli dospělé myši nejsou obecně vnímavé k experimentálním infekcím *C. parvum*, domácí a volně žijící hlodavci k infekci tímto druhem údajně vnímaví jsou (Elwin *et al.* 2012). Ačkoli volně žijící zvířata mohou být rezervoárem různých zoonotických patogenů, včetně protozoárních parazitů, předpokládá se, že nejsou významným zdrojem lidsky patogenních kryptosporidií (Simpson 2002). Nicméně komenzální vztah, který mají myši domácí s člověkem, je odlišuje od většiny ostatních volně žijících zvířat.

Většinu případů kryptosporidiózy u lidí způsobují *C. hominis* a *C. parvum*. Bylo však publikováno nejméně 20 dalších druhů kryptosporidií, které jsou pro člověka infekční (Elwin *et al.* 2012; Firoozi *et al.* 2019; Kváč *et al.* 2009; Waldron *et al.* 2010). Uvádí se, že většinu lidských kryptosporidióz způsobuje jeden druh; je však zřejmé, že u lidí i zvířat může docházet ke smíšeným infekcím různých druhů a genotypů kryptosporidií. Ačkoli Cama *et al.* (2006) prokázali, že smíšené infekce nejsou neobvyklé, poznamenali, že mohou být podhodnoceny v důsledku přednostní PCR amplifikace převládajícího druhu nebo genotypu.

Závěry z této studie naznačují, že kryptosporidie ze synantropních myší domácích mohou způsobit onemocnění u imunokompetentního člověka, a ukazují, že *C. tyzzeri*, druh považovaný za převážně hostitelsky omezený na hlodavce, může být zoonotický. Navíc detekce subtypů *C. tyzzeri* IXa i IXb, které se zdají být geograficky izolované a specifické pro MMM a MMD, naznačuje, že je možná vícenásobná expozice infekci.

## 6. ZÁVĚRY

Pomocí multilokusových analýz bylo prokázáno, že myši domácí mohou být parazitovány nejméně sedmi různými druhy kryptosporidií. Kromě již popsáných druhů (*C. muris*, *C. tyzzeri*, *C. parvum*, *C. ubiquitum* a *Cryptosporidium* sp. mouse genotyp II) jsme u myši domácí poprvé detekovali v přirozené infekci *C. hominis* a *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II.

Celková prevalence kryptosporidií ve studované populaci myši domácí byla 23 %. 13 vzorků obsahovalo smíšenou infekci dvou druhů kryptosporidií: *C. muris* a *C. tyzzeri* se vyskytovalo u 11 vzorků (1,9 %), *C. parvum* a *C. tyzzeri* u 1 vzorku (0,2 %), stejně jako *C. parvum* a *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II (0,2 %). Myši jsou parazitovány zoonotickými druhy kryptosporidií, a mohou tak sloužit jako rezervoár infekce, potenciálně ohrožující jiná zvířata i člověka.

Výsledky práce prokazují, že kryptosporidie u myši nejsou pohlavně specifické. Věková specifita nebyla sledována. Při terénním výzkumu i experimentálních infekcích jsme ověřili, že kryptosporidiální infekce nejsou u myši spojeny s klinickými příznaky infekce, a že intenzita vylučování oocyst je nízká.

Bylo potvrzeno, že použití mikroskopické detekce, ani amplifikace pouze genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU) není dostatečné pro vyvození závěrů o diverzitě kryptosporidií v myši populaci. Tyto metody nezohledňují výskyt smíšených infekcí a mohou být podhodnoceny v důsledku přednostní PCR amplifikace převládajícího druhu nebo genotypu. U *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II byly nalezeny divergentní typy genu SSU, ačkoli na GP60 se jeho sekvence shodovaly. Proto je pro fylogenetické analýzy vhodné používat kombinaci několika genů, a kromě SSU i jiné polymorfní lokusy, například GP60, HSP70, TRAP-C1, COWP nebo actin.

Na základě fylogenetické analýzy byla popsána pravděpodobná koevoluce myším specifického druhu *C. tyzzeri* se svými hostiteli. Poddruh myši domácí *M. m. musculus* je v přírodě parazitován subtypem *C. tyzzeri* IXa a poddruh *M. m. domesticus* subtypem *C. tyzzeri* IXb. Experimentálně bylo zjištěno, že oba subtypy kryptosporidií jsou infekční pro oba poddruhy myši domácí, vyskytující se v hybridní zóně, nicméně

průběh infekce se u jednotlivých poddruhů myši s nepříslušným subtypem kryptosporidií lišil.

Pomocí morfometrických, genetických a biologických dat, získaných v této práci, byl popsán nový druh *C. proliferans*. Tento druh patří mezi žaludeční druhy kryptosporidií a dříve byl zařazován k *C. muris*. Prokázali jsme, že se od obou příbuzných žaludečních kryptosporidií (*C. muris* a *C. andersoni*) liší jak geneticky, tak i biologicky. I když také velikost oocyst se výrazně odlišuje od obou výše zmíněných druhů, nelze morfometrii použít ke spolehlivému odlišení těchto druhů od *C. proliferans*.

Popsali jsme případ nákazy zdravého, imunokompetentního člověka smíšenou infekcí *C. parvum* a *C. tyzzeri*. Byly podrobně zaznamenány klinické příznaky této infekce. Tato práce poprvé popisuje přenos kryptosporidií ze synantropních myši domácích na zdravého člověka a naznačuje, že *C. tyzzeri*, které se považovalo za druh s úzkou hostitelskou specifitou, může být zoonotické.

## 7. PUBLIKACE 1

Kváč M, McEvoy J, Loudová M, Stenger B, Sak B, Květoňová D, Ditrich O, **Rašková V**, Moriarty E, Rost M, Macholán M, Piálek J. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). Int. J. Parasitol. 2013; 43(10): 805–817.



## Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*)<sup>☆</sup>

Martin Kváč<sup>a,b</sup>, John McEvoy<sup>c,\*</sup>, Martina Loudová<sup>d</sup>, Brianna Stenger<sup>c</sup>, Bohumil Sak<sup>a</sup>, Dana Květoňová<sup>a</sup>, Oleg Ditrich<sup>a</sup>, Veronika Rašková<sup>a,b</sup>, Elaine Moriarty<sup>e</sup>, Michael Rost<sup>f</sup>, Miloš Macholán<sup>g</sup>, Jaroslav Piálek<sup>h</sup>

<sup>a</sup> Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic

<sup>b</sup> Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Veterinary and Microbiological Sciences, North Dakota State University, PO Box 6050, Dept. 7690, Fargo, ND 58108, USA

<sup>d</sup> Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

<sup>e</sup> Christchurch Science Centre, Institute of Environmental Science and Research Ltd, Christchurch, New Zealand

<sup>f</sup> Faculty of Economics, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

<sup>g</sup> Laboratory of Mammalian Evolutionary Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic

<sup>h</sup> Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 March 2013

Received in revised form 22 April 2013

Accepted 25 April 2013

Available online 18 June 2013

#### Keywords:

*Cryptosporidium tyzzeri*

*Mus musculus musculus*

*Mus musculus domesticus*

House mouse

Hybrid zone

Coevolution

### ABSTRACT

Two house mouse subspecies occur in Europe, eastern and northern *Mus musculus musculus* (Mmm) and western and southern *Mus musculus domesticus* (Mmd). A secondary hybrid zone occurs where their ranges meet, running from Scandinavia to the Black Sea. In this paper, we tested a hypothesis that the apicomplexan protozoan species *Cryptosporidium tyzzeri* has coevolved with the house mouse. More specifically, we assessed to what extent the evolution of this parasite mirrors divergence of the two subspecies. In order to test this hypothesis, we analysed sequence variation at five genes (ssrRNA, *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP), thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium* 1 (TRAP-C1), actin and gp60) in *C. tyzzeri* isolates from Mmd and Mmm sampled along a transect across the hybrid zone from the Czech Republic to Germany. Mmd samples were supplemented with mice from New Zealand. We found two distinct isolates of *C. tyzzeri*, each occurring exclusively in one of the mouse subspecies (*C. tyzzeri*-Mmm and *C. tyzzeri*-Mmd). In addition to genetic differentiation, oocysts of the *C. tyzzeri*-Mmd subtype (mean:  $4.24 \times 3.69 \mu\text{m}$ ) were significantly smaller than oocysts of *C. tyzzeri*-Mmm (mean:  $4.49 \times 3.90 \mu\text{m}$ ). Mmm and Mmd were susceptible to experimental infection with both *C. tyzzeri* subtypes; however, the subtypes were not infective for the rodent species *Meriones unguiculatus*, *Mastomys coucha*, *Apodemus flavicollis* or *Cavia porcellus*. Overall, our results support the hypothesis that *C. tyzzeri* is coevolving with Mmm and Mmd.

© 2013 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Cryptosporidium* is the genus of apicomplexan protozoan parasites that causes cryptosporidiosis, a diarrhoeal disease that can become chronic and life-threatening in immunocompromised hosts (Anonymous, 1982; Soave et al., 1984). It is a significant cause of childhood diarrhoea and failure to thrive in non-industrialised nations (Guerrant et al., 1999), and continues to be a major cause of waterborne disease worldwide (Hlavsa et al., 2005, 2011; Yoder and Beach, 2007; Reynolds et al., 2008; Chalmers and Giles, 2010; Chalmers et al., 2010; Yoder et al., 2010; Elwin et al., 2012). *Cryptosporidium* remains a significant

health concern, in part, because drug treatments are limited and entirely ineffective in the absence of a robust T-cell mediated immune response (McDonald, 2011).

*Cryptosporidium* infects all major vertebrate groups including most mammalian species (Current et al., 1986; Kimbell et al., 1999; Kváč and Vítovec, 2003; Ziegler et al., 2007; Jirků et al., 2008; Gibson-Kueh et al., 2011). More than 50 genotypes have been identified, primarily from ssrRNA gene sequences, and at least 25 species have been recognised based on additional genetic, morphometric and biological data (Fayer, 2010; Kváč et al., 2013). As a monoxenous, obligate and generally host-specific parasite, coevolution with the host is hypothesised to drive diversification, this hypothesis being supported, in part, by the phylogenetic clustering of *Cryptosporidium* taxa from closely related host species (Xiao et al., 2002).

A number of studies have examined intraspecific diversity in *Cryptosporidium*, particularly in the major human pathogenic

<sup>☆</sup> Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in GenBank under Accession Nos. JQ073388–JQ073555.

\* Corresponding author. Tel.: +1 701 231 8530; fax: +1 701 231 9692.

E-mail address: [john.mcevoy@ndsu.edu](mailto:john.mcevoy@ndsu.edu) (J. McEvoy).

species *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* (Widmer et al., 2004; Gatei et al., 2007; Tanriverdi et al., 2008; Xiao, 2010). Among the reported single locus genotyping tools, those targeting the gp60 gene appear particularly useful and are widely used (Jex and Gasser, 2010). This gene encodes a 60-kDa glycoprotein that is cleaved post-translationally to produce two glycoproteins, GP40 and GP15, which are expressed on the surface of sporozoites where they function during attachment to and invasion of host cells (Cevallos et al., 2000a,b; Strong et al., 2000). Most intraspecific variation in gp60 is concentrated in a highly polymorphic microsatellite region that encodes a serine/threonine stretch in GP40. A standardised nomenclature has been established to represent sequence variation at the gp60 locus (Sulaiman et al., 2005). The subtype family is identified by a roman numeral, which represents the *Cryptosporidium* sp./genotype, and lower-case letter. For instance, Ia and Ib are subtype families in *C. hominis*, and IIa and IIb are subtype families in *C. parvum*. Depending on the species, subsequent uppercase letters and numbers represent the number of various tandem repeats in the microsatellite region. For example, IIaA15G2R1 is a *C. parvum* subtype family (IIa) with 15 TCA repeats (A), two TCG repeats (G), and one ACATCA repeat (R). Analysis of gp60 has contributed to the understanding of *Cryptosporidium* transmission and can serve as a marker for intraspecific biological differences, as illustrated by IIc, which is an apparently human-restricted subtype family in the generally zoonotic species *C. parvum* (Alves et al., 2003).

*Cryptosporidium tyzzeri* (previously mouse genotype I) is adapted to the house mouse (Ren et al., 2012), and has been infrequently isolated from other vertebrate species including the yellow-necked mouse, voles, snakes and rats (Morgan et al., 1998, 1999; Bajer et al., 2003; Xiao et al., 2004; Karanis et al., 2007). *Cryptosporidium tyzzeri* gp60 subtype families (IXa and IXb; Feng et al., 2011) appear to have a variable geographic distribution: IXa was identified in house mice from China and IXb in two mice from the United States (USA) (Lv et al., 2009; Feng et al., 2011; Ren et al., 2012). Although these data are limited, the gp60 subtype families could represent divergent *C. tyzzeri* populations, which have coevolved with geographically isolated subspecies of the house mouse.

House mice originated in south-central Asia or the Middle East some 1 million years ago (MYA) and subsequently diverged into several subspecies approximately 0.5 MYA (Geraldes et al., 2008; Duvaux et al., 2011; Auffray and Britton-Davidian, 2012; Bonhomme and Searle, 2012). One of these subspecies, *Mus musculus musculus* (hereafter abbreviated Mmm), has spread from this cradle to a vast area of northern Eurasia from central and northern Europe to the Far East. Another subspecies, *Mus musculus domesticus* (Mmd), expanded westward through Asia Minor to southern and western Europe and northern Africa, and later has spread worldwide (Boursot et al., 1993; Guénet and Bonhomme, 2003; Rajabi-Maham et al., 2008; Duvaux et al., 2011; Auffray and Britton-Davidian, 2012; Bonhomme and Searle, 2012; Cucchi et al., 2012). In the area of their secondary contact in Europe, the two subspecies have formed a hybrid zone over 2,500 km long, stretching from Norway to the Black Sea (Macholán et al., 2003; Jones et al., 2011; Ďureje et al., 2012). Due to the colonisation history, the house mouse hybrid zone (HMHZ) is older in the southeast than in the north; however, as argued by Baird and Macholán (2012), its age is old enough to settle into quasi-equilibrium allowing intermixing neutral variants. Traits with a negative effect on the fitness of hybrids will be prevented from crossing the zone and will display abrupt changes in frequencies between subspecies-specific variants (Barton and Hewitt, 1985; Payseur et al., 2004; Macholán et al., 2007, 2011; Janoušek et al., 2012). Conversely, neutral variants will diffuse through the HMHZ freely with some delay due to linkage to counterselected loci

(Barton, 1979). Finally, even slightly advantageous traits will cross the HMHZ quite rapidly and spread into the opposite genetic background as was demonstrated recently for the Y chromosome (Albrechtová et al., 2012; Ďureje et al., 2012).

In this study, we test the hypothesis that *C. tyzzeri* is coevolving with its host. If so, we should observe higher divergence between parasites living in different mouse subspecies than between those living in the same subspecies. In the context of the HMHZ, an association between host and parasite genotypes would result in a steep transition of host-specific parasite genotypes from one side of the zone to the other whereas in the absence of the coevolution, the genotypes would freely introgress across the zone. Alternatively, some *C. tyzzeri* genotypes could invade a novel, susceptible mouse genotype that has not coevolved with the parasite.

To test these evolutionary scenarios, we characterised *C. tyzzeri* isolates from naturally infected Mmd and Mmm in localities across the HMHZ. This sample was supplemented with Mmd individuals from New Zealand. We found that *C. tyzzeri* isolates from Mmm and Mmd differed genetically, morphometrically and biologically. Collectively, these data are evidence that *C. tyzzeri* is coevolving with the two *M. musculus* subspecies.

## 2. Materials and methods

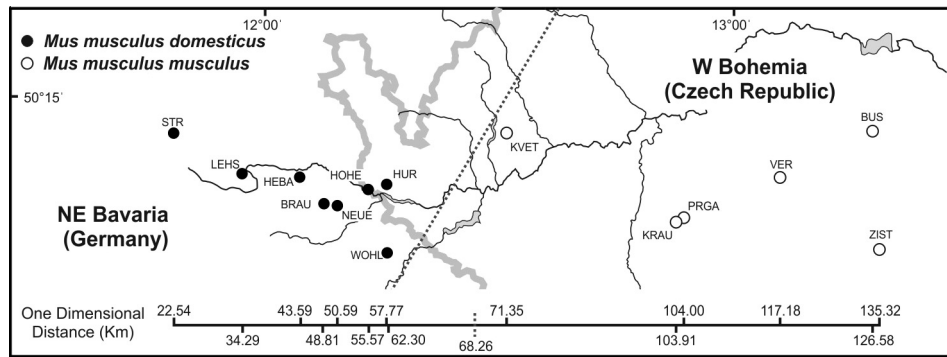
### 2.1. Origin of *C. tyzzeri* isolates

Thirty-two *C. tyzzeri* isolates were recovered from *M. musculus* (17 males, 15 females) sampled at 14 localities scattered across the HMHZ (Fig. 1). Two-dimensional GPS coordinates from each sample site were collapsed into a one-dimensional axis with a perpendicular orientation to the zone as described in Macholán et al. (2007). The position of each locality along this axis was given as a distance from the westernmost point specified in Dufková et al. (2011) and Macholán et al. (2011). These distances ranged from 22 km at the westernmost site (Mmd range) to 136 km at the easternmost site (Mmm range) and the consensus zone centre, estimated from 13 X-linked loci, was at 68.26 km (Dufková et al., 2011).

Mice were trapped with wooden and/or metal live traps baited with a mix of sardines in oil and oat flakes. Captured mice were transferred to a field laboratory where they were kept individually and provided with sterilized bedding material, pellets (VELAZ, Prague, Czech Republic) and tap water ad libitum. The proportions of males and females in the sampled population were similar in the areas east (six female and six male) and west (10 female and 11 male) of the hybrid zone centre. Two and four mice from east and west of the hybrid zone centre, respectively, were juveniles. All mice were dissected the day after capture. Fecal samples were collected from the colon and stored in 96% alcohol. A hybrid index (HI) was calculated for each mouse as the proportion of Mmm alleles across 1,401 subspecies-specific single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Wang et al., 2011) (see Table S1 in Baird et al. (2012)); hence, HI values ranged from 0 (Mmd) to 1 (Mmm).

Twelve *C. tyzzeri* isolates were recovered from *M. musculus* sampled at a single location near Christchurch, New Zealand. The subspecies of the host was not determined; however, it was assumed to be *M. m. domesticus* (Mmd) based on a previous report (Searle et al., 2009). The mice were trapped using Elliott live traps (Elliott Scientific Equipment, Upwey, Vic., Australia), which contained Dacron for bedding/warmth and were baited with a mix of peanut butter and rolled oats. Mice were trapped from farmland surrounding the Landcare Research Animal facility in Lincoln, New Zealand. Captured mice were transferred to an indoor animal facility. Fecal samples were collected from the traps when the mice were first brought into the facility.





**Fig. 1.** Sampling localities across the study area in Germany and the Czech Republic. The position of the *Mus musculus musculus*/*Mus musculus domesticus* hybrid zone is indicated with the dotted line. Positions of each locality along an axis perpendicular to the hybrid zone course are shown (see also Table 1); these positions are expressed relative to the westernmost locality presented in Dufková et al. (2011). Sampling site abbreviations: STR, Straas; LEHS, Lehsten; HEBA, Hebanz; BRAU, Braunersgrün; HOHE, Hohenberg; NEUE, Neuenreuth; HUR, Hürka; WOHL, Wolfsbühl; KVET, Květná; KRAU, Krásné Údolí; PRGA, Přílezy; VER, Verušický; BUS, Bušovice; ZIST, Žihle.

## 2.2. Sample collection and DNA extraction

In the Czech and German samples, 200 mg of feces were homogenised by bead disruption using FastPrep-24 (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) for 60 s at a speed  $5.5 \text{ m s}^{-1}$ . Total DNA was extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as described in Sak et al. (2011), and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until processed. DNA from fecal samples of New Zealand mice was extracted by alkaline digestion and phenol–chloroform extraction, and purified using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) as described in Peng et al. (2003). DNA was further purified according to manufacturer's instructions and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until processed.

## 2.3. PCR and sequence analysis

Molecular characterisation was carried out using nested PCR at five loci: *ssrRNA* (ca. 830 bp; Xiao et al., 1999; Jiang et al., 2005), *Cryptosporidium* oocyst wall protein 1 (COWP; ca. 550 bp; Spano et al., 1997; Pedraza-Diaz et al., 2001), *actin* (ca. 1066 bp; Sulaiman et al., 2002), *gp60* (830–870 bp; Alves et al., 2003), and thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1; ca. 780 bp; Spano et al., 1998). Positive (*C. hominis* for *ssrRNA*, COWP, *actin*, *gp60* and TRAP-C1) and negative controls were included in each analysis. Secondary PCR products were visualised following agarose gel electrophoresis with ethidium bromide or SYBR Green dye. Products of expected size were purified (Wizard SV, Promega, Madison, WI, USA or QIAquick, Qiagen, Hilden, Germany) and directly sequenced in both directions using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit with secondary PCR primers and an ABI Prism 3130 genetic analyser (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Sequences were assembled using SeqMan (DNASTar, Madison, WI, USA) and aligned using the ClustalW algorithm (Thompson et al., 1997).

## 2.4. Phylogenetic analyses

The evolutionary history of aligned sequences was inferred using the Neighbour-Joining method (NJ; (Saitou and Nei, 1987) based on Kimura 2-parameter (K2P) distances (Kimura, 1980). The bootstrap consensus tree was inferred from 1,000 pseudoreplicates. Trees were constructed using TREECON version 1.3b (Van de Peer and De Wachter, 1994).

*Cryptosporidium tyzzeri* *gp60* sequences were grouped by geographic location and evolutionary divergence was determined using the K2P model to calculate the number of base substitutions per site from averaging over all sequence pairs between groups. All

ambiguous positions were removed for each sequence pair. Analyses were carried out using MEGA5 (Tamura et al., 2011). Sequences of *ssrRNA* (JQ073483–JQ073504, JQ073506–JQ073515, JQ073517–JQ073523), COWP (JQ073415–JQ073446), *actin* (JQ073388–JQ073402, JQ073404–JQ073414), *gp60* (JQ073447–JQ073469, JQ073471–JQ073479, JQ073481–JQ073482, JX575574–JX575581) and TRAP-C1 (JQ073524–JQ073539, JQ073541–JQ073544 and JQ073546–JQ073555) obtained in this study have been deposited in GenBank.

## 2.5. Morphometry and experimental transmission studies

Isolates CR2090 (*C. tyzzeri*-Mmd) and CR4293 (*C. tyzzeri*-Mmm) from Mmd and Mmm, respectively (see Table 1 for HIs), were used for oocyst morphometry and experimental transmission studies. The *C. parvum* isolate used for comparative studies originated from a naturally infected, 1 month old calf with diarrhoea that was bred outside the area from which isolates of *C. tyzzeri* were obtained.

Oocysts from each isolate were purified using a sucrose gradient (Arrowood and Sterling, 1987) and cesium chloride gradient centrifugation (Kilani and Sekla, 1987). Purified oocysts were stored for up to 4 weeks in darkness in distilled water with antimycotics and antibiotics at  $4^\circ\text{C}$ .

*Cryptosporidium tyzzeri*-Mmm, *C. tyzzeri*-Mmd and *C. parvum* oocysts were examined using differential interference contrast (DIC) and immunofluorescence (IF) microscopy. IF was carried out with genus-specific FITC-labelled antibodies targeting the *Cryptosporidium* oocyst wall (*Cryptosporidium* IF Test, Crypto Cel, Cellabs, Australia). Cell morphology was determined using digital analysis of images (M.I.C. Quick Photo Pro v.1.2 software; Optical Service, Czech Republic) collected at  $1,000\times$  magnification using an Olympus Camedia C 5060 WIDEZOOM 5.1 megapixel digital camera (Optical Service). Length and width were measured for oocysts of each isolate ( $n = 100$ ) and a shape index was calculated. A  $20 \mu\text{l}$  aliquot containing 100,000 purified oocysts was examined for each isolate.

Experimental infections were carried out using 8-week-old adult SCID mice (Severe combined immunodeficiency, strain C.B-17; Charles River, Germany), BALB/c mice (Charles River), the wild-derived Mmm strain STUS (Piálek et al., 2008); 24–26th generation of brother–sister mating; Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic), and a wild-derived Mmd strain from Schweben, central Germany (8–10th generation of brother–sister mating; kept under the name SCHEST at the Institute of Vertebrate Biology). In addition to the house mouse models, we tested Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) (Charles River), southern multimammate mice

**Table 1**  
*Cryptosporidium tyzzeri* subtype and host characteristics.

Isolate	Locality	Country <sup>b</sup>	Distance (km) <sup>a</sup>	Hybrid index <sup>c</sup>	Subspecies of mice <sup>d</sup>	<i>Cryptosporidium tyzzeri</i> subtype			
						GP60 <sup>e</sup>	Actin <sup>f</sup>	COWP <sup>g</sup>	TRAP-C1 <sup>h</sup>
<i>East of the zone centre<sup>a</sup></i>									
CR2149	Žihle	CR	135.32	0.97	Mmm	IXa	A1	C1	T1
CR2090	Buškovice	CR	126.58	0.97	Mmm	IXa	A1	C1	T1
CR2152	Buškovice	CR	126.58	0.97	Mmm	IXa	× <sup>i</sup>	×	T1
CR2206	Věrušičky	CR	117.18	0.97	Mmm	IXa	A1	C1	T1
CR2208	Věrušičky	CR	117.18	0.97	Mmm	IXa	A1	C1	T1
CR2125	Přílezy	CR	104.00	0.97	Mmm	IXa	A1	C1	T1
CR2127	Přílezy	CR	104.00	0.97	Mmm	IXa	×	×	×
CR2128	Přílezy	CR	104.00	0.97	Mmm	IXa	A1	C1	T1
CR2126	Přílezy	CR	104.00	0.97	Mmm	IXa	A1	C1	×
CR2084	Krásné Údolí	CR	103.91	0.98	Mmm	IXa	A1	C1	T1
CR2085	Krásné Údolí	CR	103.91	0.97	Mmm	IXa	A1	C1	T1
CR3175	Květná	CR	71.35	0.89	Mmm	IXa	×	×	×
<i>West of the zone centre<sup>a</sup></i>									
G2134	Wolfsbühl	G	62.30	0.06	Mmd	IXb	A2	C2	T2
CR4293	Hürka	CR	57.77	0.14	Mmd	IXb	A2	C2	T2
CR2163	Hürka	CR	57.77	0.14	Mmd	IXb	A2	C2	T2
G2103	Hohenberg	G	55.57	0.09	Mmd	IXb	A2	C2	T2
G2174	Neuenreuth	G	50.59	0.05	Mmd	IXb	×	C2	T2
G2160	Braunersgrün	G	48.81	0.05	Mmd	IXb	A2	C2	T2
G2194	Braunersgrün	G	48.81	0.05	Mmd	IXb	×	×	×
G2108	Hebanz	G	43.59	0.03	Mmd	IXb	A2	C2	T2
G2169	Hebanz	G	43.59	0.04	Mmd	IXb	A2	C2	×
G2110	Lehsten	G	35.29	0.02	Mmd	IXb	A2	C2	T2
G2181	Lehsten	G	35.29	0.03	Mmd	IXb	×	×	×
G3224	Lehsten	G	35.29	0.02	Mmd	IXb	A2	C2	T2
G2120	Lehsten	G	35.29	0.02	Mmd	IXb	A2	C2	×
G2117	Straas	G	22.54	0.02	Mmd	IXb	×	×	×
G2116	Straas	G	22.54	0.02	Mmd	IXb	×	×	×
G2136	Straas	G	22.54	0.02	Mmd	IXb	A2	C2	T2
G2177	Straas	G	22.54	0.02	Mmd	IXb	A2	C2	T2
G2099	Straas	G	22.54	0.02	Mmd	IXb	A2	C2	T2
G2135	Straas	G	22.54	0.02	Mmd	IXb	A2	C2	T2
G2179	Straas	G	22.54	0.02	Mmd	IXb	A2	C2	T2
<i>New Zealand</i>									
NZ1632	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd <sup>j</sup>	×	×	×	T2
NZ1633	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd	IXb	A3	C2	T2
NZ1634	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd	IXb	×	C2	T2
NZ1635	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd	IXb	×	×	T2
NZ1636	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd	IXb	×	×	T2
NZ1637	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd	×	×	C2	×
NZ1638	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd	×	×	C2	×
NZ1639	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd	IXb	×	×	T2
NZ1640	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd	IXb	×	C2	T2
NZ1641	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd	IXb	×	C2	×
NZ1642	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd	IXb	×	C2	×
NZ1644	Christchurch	NZ	NA	NA	Mmd	IXb	A3	×	×

<sup>a</sup> The distance from the hybrid zone centre is at 68.26 km.

<sup>b</sup> CR, Czech Republic; G, Germany; NZ, New Zealand.

<sup>c</sup> Hybrid index for each mouse based on 1401 single nucleotide polymorphism (SNP) loci (Baird et al., 2012).

<sup>d</sup> Mmm = *Mus musculus musculus*, Mmd = *Mus musculus domesticus*.

<sup>e</sup> gp60 sequences were grouped into one of two subtype families (IXa and IXb) in accordance with a nomenclature established previously (Sulaiman et al., 2005; Lv et al., 2009).

<sup>f</sup> A1 (T<sup>78</sup>G<sup>1005</sup>), A2 (C<sup>78</sup>G<sup>1005</sup>), and A3 (C<sup>78</sup>A<sup>1005</sup>) differ by nucleotide substitutions at positions 78 and 1005 using *C. parvum* sequence XM\_627938 as a reference.

<sup>g</sup> *Cryptosporidium* oocyst wall protein; C1 (C<sup>879</sup>) and C2 (A<sup>879</sup>) differ by a nucleotide substitution at position 879 using *C. parvum* sequence XM\_627569 as a reference.

<sup>h</sup> Thrombospondin related adhesive protein of *Cryptosporidium* 1; T1 (G<sup>1923</sup>) and T2 (A<sup>1923</sup>) differ by a nucleotide substitution at position 1923 using *C. parvum* sequence XM\_628162 as a ruler.

<sup>i</sup> × = not detected.

<sup>j</sup> Mice from New Zealand are probably *Mus musculus domesticus* based on Searle et al. (2009).

(*Mastomys coucha*; Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic), yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*; Institute of Parasitology), and guinea pigs (*Cavia porcellus*; Institute of Parasitology).

Laboratory rodents were housed in plastic cages with sterilized wood-chip bedding placed in flexible film isolators (BEM, Znojmo, Czech Republic) with high-efficiency particulate air filters. Animals were supplied with a sterilized diet (VELAZ, Prague, Czech Republic) and sterilized water ad libitum.

Six animals from each host group were infected with *C. tyzzeri*-Mmd or *C. tyzzeri*-Mmm. In addition, one group of SCID mice ( $n = 6$ ) was infected with *C. parvum*. Each animal was inoculated via a gastric tube with 1 million purified oocysts suspended in 200  $\mu$ l of distilled water. Oocyst viability was >95% as determined by propidium iodide exclusion according to Sauch et al. (1991). Fecal samples from all experimental animals were collected daily starting on the third day p.i. Samples were stained with aniline-carbol-methyl violet and the presence of *Cryptosporidium*-specific DNA was

confirmed using nested PCR amplification of the gp60 gene (Alves et al., 2003). The infection intensity was determined as the number of oocysts per gram (OPG) of feces as described in Kváč et al. (2007). A susceptible host was one that, following inoculation with 1 million oocysts and an expected prepatent period (Ren et al., 2012), had *Cryptosporidium* oocysts or DNA in its feces, detectable by microscopy and PCR, respectively.

All experiments were terminated at 30 days p.i. A complete examination of all organs was conducted at necropsy. Tissue specimens of the gastrointestinal tract were sampled and processed for histology according to Kváč and Vítovec (2003) with a slight modification. The intestine was divided into 1 cm sections along its entire length and processed by paraffin embedding. Histological sections were stained with H&E, Wolbach's modification of Giemsa stain, alcian blue and FITC-conjugated antibodies targeting the *Cryptosporidium* oocyst wall (*Cryptosporidium* IF Test, Crypto Cel).

Animal caretakers wore disposable coveralls, shoe covers and gloves every time they entered the buildings. All wood-chip bedding, feces and disposable protective clothing were sealed in plastic bags, removed from the buildings and incinerated. All housing, feeding and experimental procedures were conducted under protocols approved by the Institute of Parasitology, Biology Centre and Institute of Vertebrate Biology of the Academy of Sciences of the Czech Republic and Central Commission for Animal Welfare, Czech Republic (protocol # 066/2010).

## 2.6. Statistical analyses

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  $T^2$  test was used to test the null hypothesis.

The course of infection was evaluated as the maximum infection intensity time ( $t_{max}$ ), maximum infection intensity concentration ( $C_{max}$ ), and average number of excreted oocysts during the patent period per mouse calculated as the area under curve (AUC) using the classical trapezoidal rule. Due to non-normality, the data were analysed using the Kruskal–Wallis non-parametric test. The Wilcoxon test was used as a post hoc test after a Dunn–Sidak adjustment. The Bartlett test was used to test homoscedasticity of differences in the prepatent and patent periods of different infections.

## 3. Results

Mice from west of the hybrid zone centre had a hybrid index ranging from 0.02 to 0.14, indicating that most of their genomes represent the Mmd subspecies. Mice from east of the hybrid zone centre had a hybrid index ranging from 0.89–0.98, which is indicative of the Mmm subspecies (Table 1).

### 3.1. Molecular characterisation of *C. tyzzeri*

For the *ssrRNA* gene, all *Cryptosporidium* sequences were identical, irrespective of the host, and they were the same as *C. tyzzeri* sequences with GenBank Accession NOs. DQ898158, AF112571, AF108863 and EU553589.

COWP sequences formed two clades, labelled C1 and C2, in the NJ tree (Fig. 2A). The C1 clade included all sequences from Mmm in the area east of the hybrid zone centre whereas the C2 clade included all sequences from Mmd in the area west of the hybrid zone centre and all sequences from Mmd in New Zealand (Table 1). The C2 clade also included a sequence from *C. tyzzeri* isolate 411 from *M. musculus* from the USA (Accession No. AF266268) and sequences isolated from other rodent species, *Clethrionomys glareolus*

(syn.: *Myodes glareolus*) (Accession No. AF266268), *Microtus arvalis* (Accession No. AJ489215) and *A. flavicollis* (Accession No. AJ489217) from Poland. Sequences in the C1 and C2 clades differed by a silent substitution at position 879 relative to a standard sequence (*C. parvum* COWP; Accession No. XM\_627569). The sequence from isolate 411 differed from all other sequences in C1 and C2 by a silent substitution at position 688.

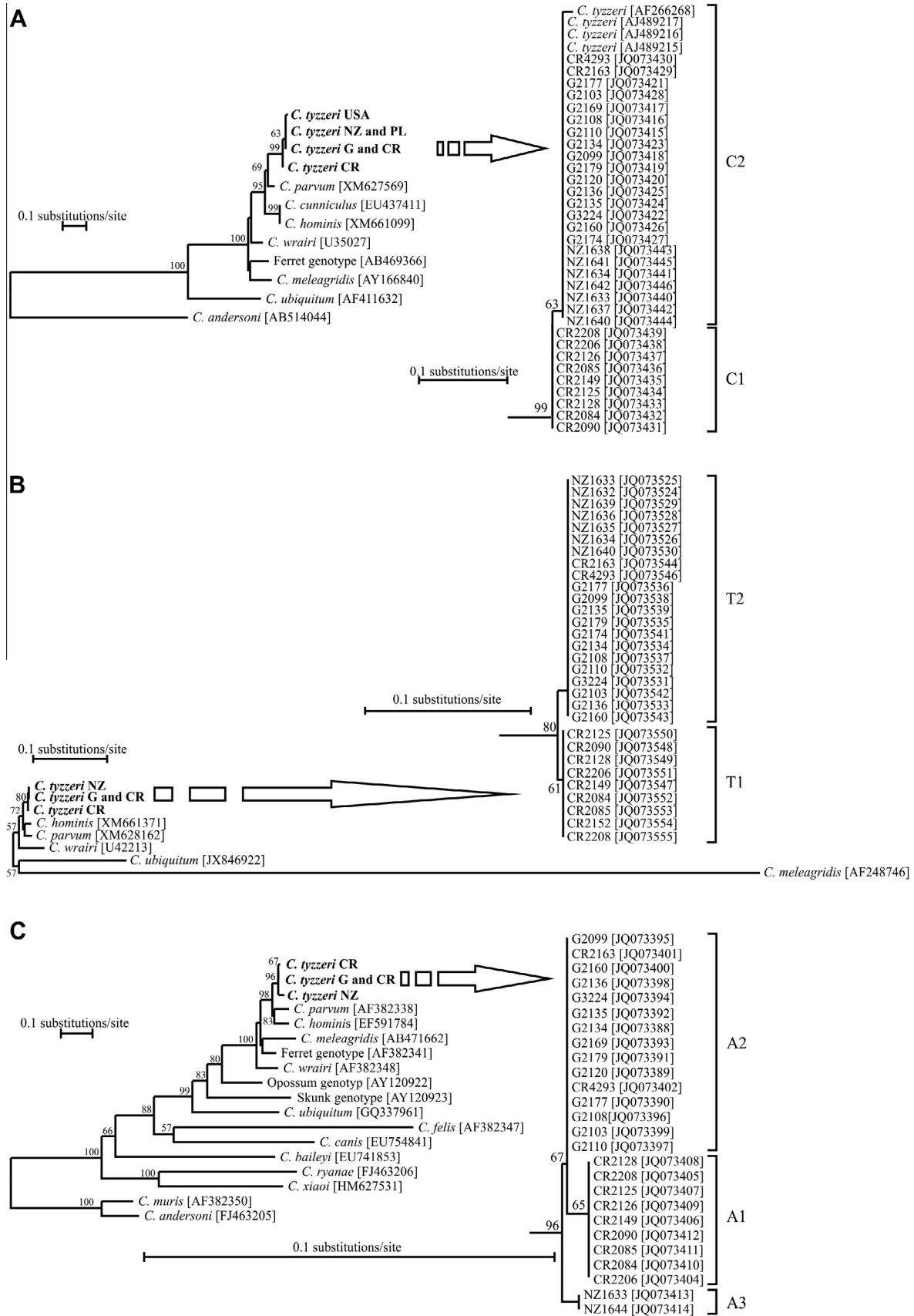
Two clades of identical sequences were revealed in TRAP-C1: the T1 and T2 clades included all *C. tyzzeri* sequences from Mmm and Mmd, respectively (Table 1, Fig. 2B). The two groups differed by a silent substitution at position 1923 relative to a standard sequence (*C. parvum* TRAP-C1; Accession No. XM\_628162).

Actin sequences formed three clades in the NJ tree labelled A1, A2 and A3 in Fig. 2C. Sequences within these groups shared 100% identity. A1 included all sequences from Mmm in the area east of the hybrid zone centre, A2 included sequences from Mmd in the area west of the hybrid zone centre and A3 contained sequences from New Zealand. A1 was characterised by T at position 78 of a *C. parvum* actin sequence (Accession No. XM\_627938), whereas A2 and A3 had a C at this position. A3 differed from both A1 and A2 at position 1005 (A was present in the former and G in the latter two groups, respectively; Table 1).

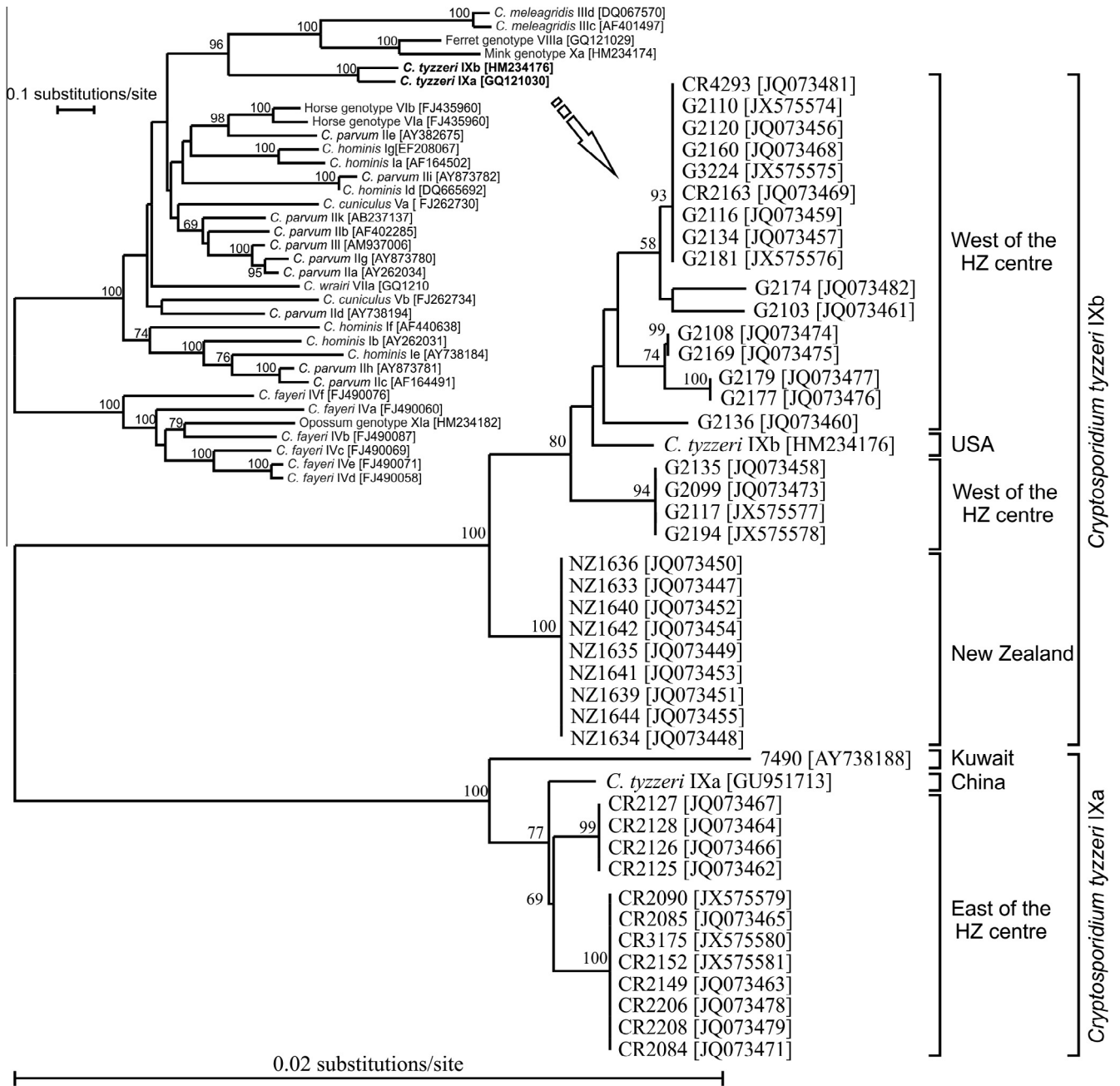
Fig. 3 shows a NJ tree based on gp60 sequences. All *C. tyzzeri* formed a monophyletic group divided into two clades with 100% bootstrap support. The two clades correspond to the gp60 subtype families IXa and IXb (Feng et al., 2011). The IXa subtype family comprised all sequences from Mmm in the area east of the hybrid zone centre and previously published sequences from *M. musculus* from China (Accession No. GU951713) and a child from Kuwait (Accession No. AY738188). The sequences from the Czech Republic were divided into two sister groups of identical sequences. The IXb subtype family included all sequences from Mmd in the area west of the hybrid zone centre, all sequences from New Zealand Mmd mice, and a previously published sequence from *M. musculus* from the USA (Accession No. HM234176). All sequences from New Zealand were identical and formed a separate clade within the IXb subtype family, whereas the *C. tyzzeri*-Mmd from the Czech Republic and Germany were more diversified and did not form a monophyletic group. The mean evolutionary divergence between *C. tyzzeri* gp60 sequences within the areas east and west of the hybrid zone centre, estimated using the K2P model as the average number of base substitutions per site, was  $0.0007 \pm 0.0007$  ( $n = 12$ ) and  $0.0022 \pm 0.0010$  ( $n = 20$ ), respectively. Estimates of the evolutionary divergence between *C. tyzzeri* gp60 sequences in different geographic locations are presented in Table 2. These data show the lowest divergence among sequences from the same host subspecies, regardless of geographic location.

The number of serine coding TCA repeats in gp60 sequences varied between five and eight. All IXb sequences from New Zealand had five TCA repeats, three IXa sequences from the Czech Republic had eight repeats (CR2149, CR2085 and CR3175), and all other gp60 sequences had six TCA repeats. In addition to these repeats, 12 and 18 bp repeats were identified in all sequences using Tandem Repeats Finder (Benson, 1999). The 12 bp repeat (consensus: GGTACTCAAGGA) was present as two copies in IXa sequences and two (e.g. CR2163) or three (e.g. G2135) copies in IXb sequences. The consensus sequence of the 18 bp repeat differed between the two gp60 subtype families: all IXa sequences had two copies (consensus: ATTCTGGTACTGAAGATA), and IXb sequences had two (G2136 and all isolates from New Zealand), three (e.g. G2135) or four (G2103) copies of the repeat (consensus: GGTACTGAAAATAATTCT).

Using the NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), gp60 sequences from *C. tyzzeri* isolates were predicted to encode one or more N-glycosylation sites (Fig. 4). IXa sequences encoded a single N-glycosylation site that was also present in IXb



**Fig. 2.** Neighbour-joining (NJ) trees depicting evolutionary relationships among *Cryptosporidium* spp. and genotypes inferred from a partial fragment of (A) the *Cryptosporidium* oocyst wall protein 1 (COWP) gene, (B) the thrombospondin related adhesive protein (TRAP-C1), and (C) the actin gene. The Kimura 2-parameter (K2P) model was used in all three trees. The bootstrap support is based on 1,000 pseudoreplicates; branches with less than 50% support have been collapsed.



**Fig. 3.** Evolutionary relationships among *Cryptosporidium* spp. and genotypes inferred from a partial fragment of the gp60 gene. The neighbour-joining tree is based on the K2P model. The bootstrap consensus tree was inferred from 1,000 pseudoreplicates; only values greater than 50% are shown.

**Table 2**  
Estimates of evolutionary divergence over gp60 sequence pairs between geographic regions.

Geographic region	Average number of base substitutions per site ± S.E.				
	East hybrid <sup>a</sup>	West hybrid <sup>b</sup>	New Zealand <sup>c</sup>	United States <sup>d</sup>	China <sup>e</sup>
West hybrid <sup>b</sup>	0.0284 ± 0.0060				
New Zealand <sup>c</sup>	0.0253 ± 0.0057	0.0040 ± 0.0019			
United States <sup>d</sup>	0.0264 ± 0.0059	0.0017 ± 0.0009	0.0029 ± 0.0020		
China <sup>e</sup>	0.0016 ± 0.0013	0.0270 ± 0.0059	0.0233 ± 0.0054	0.0251 ± 0.0058	
Kuwait <sup>f</sup>	0.0035 ± 0.0022	0.0279 ± 0.0063	0.0243 ± 0.0059	0.0261 ± 0.0062	0.0019 ± 0.0015

<sup>a</sup> East of the hybrid zone centre (see Table 1).

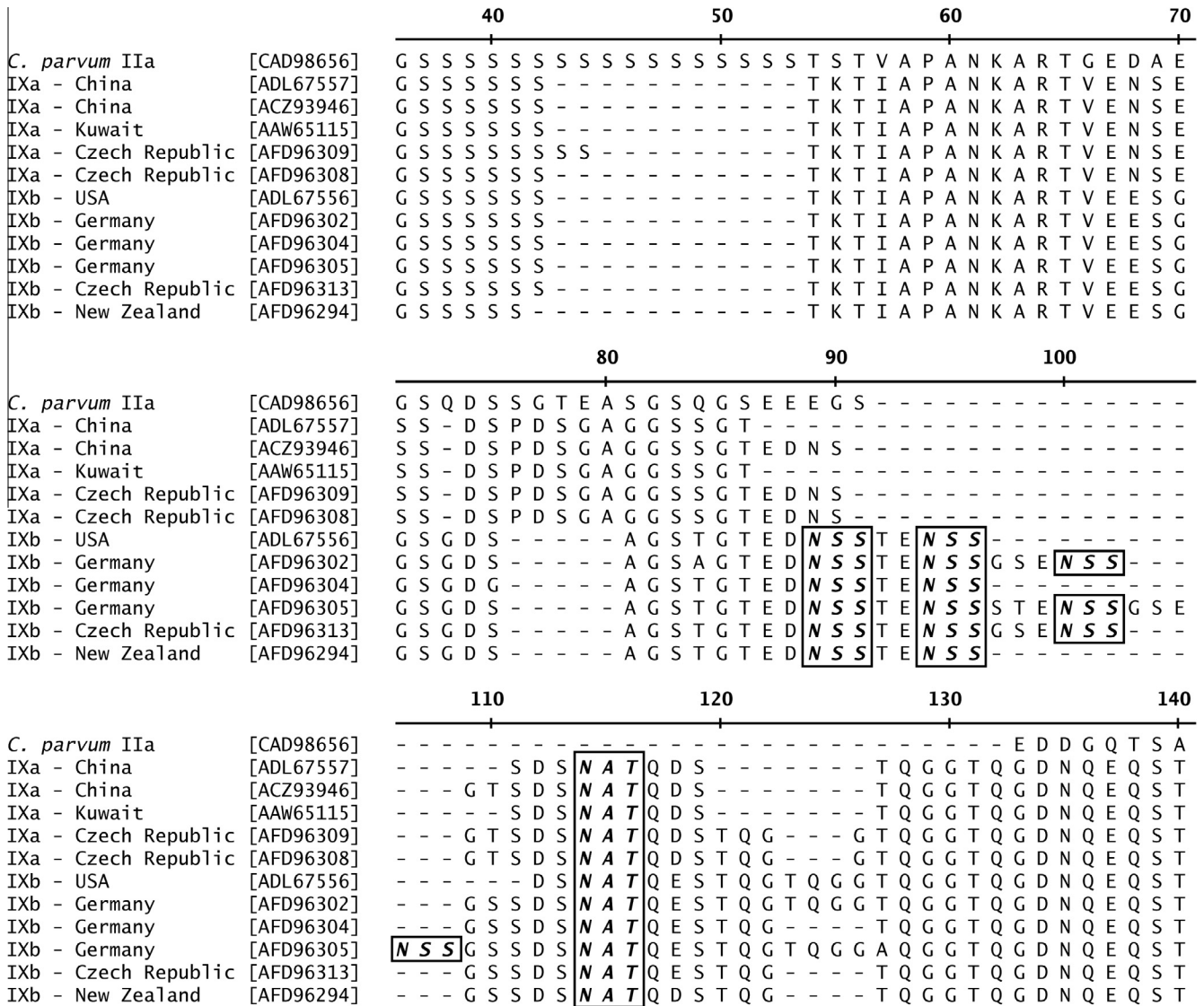
<sup>b</sup> West of the hybrid zone centre (see Table 1).

<sup>c</sup> See Table 1.

<sup>d</sup> GenBank Accession No. HM234176.

<sup>e</sup> GenBank Accession Nos. GU951713, HM234177, HM234179 and HM234180.

<sup>f</sup> GenBank Accession No. AY738188.



**Fig. 4.** Alignment of a partial gp60 protein sequence from *Cryptosporidium parvum* subtype IIa (CAD98656) and *Cryptosporidium tyzzeri* sequences from this and other studies. -glycosylation sites predicted by the NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) are bolded, italicised and boxed. GenBank accession numbers are presented in parentheses.

sequences. Two, three, and four copies of the 18 bp repeat in the IXb sequences coded for additional N-glycosylation sites.

**3.2. Oocyst morphometry**

Length, width, and a shape index (length/width) were calculated for oocysts of *C. tyzzeri*-Mmd and *C. tyzzeri*-Mmm from natural infections in Mmd and Mmm, respectively, and experimental infections in SCID mice, Mmm STUS and Mmd SCHEST. For comparative purposes, measurements were also taken from oocysts of *C. parvum* isolated from natural (calf) and experimental (SCID) infections. These data are presented in Table 3. Within *C. parvum*, *C. tyzzeri*-Mmd, and *C. tyzzeri*-Mmm, oocyst size did not differ significantly among hosts ( $F = 0.3771-2.2672$ ,  $P = 0.6035-0.1063$ ;  $F = 0.6431-0.8917$ ;  $P = 0.4116-0.5268$ ). Oocysts of *C. tyzzeri*-Mmd (mean:  $4.24 \times 3.69 \mu\text{m}$ ) were significantly smaller than oocysts of *C. tyzzeri*-Mmm (mean:  $4.49 \times 3.90 \mu\text{m}$ ) ( $F = 224.9762$ ;  $P < 0.001$ ). Oocysts of *C. tyzzeri*-Mmd and *C. tyzzeri*-Mmm were significantly smaller than *C. parvum* oocysts ( $F = 1400.2950$  and  $F = 985.4179$ , respectively,  $P < 0.001$  in both cases).

**3.3. Experimental transmission studies**

Infectivity was detected by examining feces for the presence of oocysts using microscopy and the presence of the *Cryptosporidium*-specific gp60 gene with PCR. *Cryptosporidium tyzzeri*-Mmd and *C. tyzzeri*-Mmm were found to be infective for immunocompetent (BALB/c, Mmm STUS and Mmd SCHEST) and immunodeficient (SCID) mice. In comparison, Mongolian gerbils, southern multimammate mice, yellow-necked mice and guinea pigs produced neither microscopically nor PCR detectable infection under the conditions of the study.

**3.3.1. Course of infection**

For each treatment, the method used to detect oocyst shedding (microscopy and PCR) did not affect estimation of the prepatent period. The mean of the prepatent period ranged from 4 days in SCID mice infected with *C. tyzzeri*-Mmd to 7 days in Mmd SCHEST mice infected with *C. tyzzeri*-Mmm (Table 4). The prepatent period in Mmd SCHEST mice infected with *C. tyzzeri*-Mmm was longer than the prepatent periods in all other infections presented in Table 4 ( $P = 0.0022-0.0411$ ).

**Table 3**  
*Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium parvum* oocyst morphology.

Isolate	Infection	Source	n	Length (µm)		Width (µm)		Shape index
				Range	Mean ± S.D.	Range	Mean ± S.D.	Mean ± S.D.
<i>C. parvum</i>	Natural	calf	100	4.42–6.44	5.51 ± 0.45	3.94–5.96	4.95 ± 0.49	1.12 ± 0.09
<i>C. parvum</i>	Experimental	SCID	100	4.42–6.35	5.50 ± 0.45	4.04–5.77	4.95 ± 0.46	1.12 ± 0.09
<i>C. tyzzeri</i> -Mmd	Natural	Wild Mmd	100	3.56–4.90	4.24 ± 0.26	3.37–4.33	3.73 ± 0.18	1.14 ± 0.08
<i>C. tyzzeri</i> -Mmd	Experimental	SCID	100	3.56–5.10	4.24 ± 0.27	3.17–4.33	3.70 ± 0.19	1.15 ± 0.09
<i>C. tyzzeri</i> -Mmd	Experimental	Mmm STUS	100	3.75–5.00	4.26 ± 0.24	3.19–4.29	3.69 ± 0.20	1.16 ± 0.09
<i>C. tyzzeri</i> -Mmd	Experimental	Mmd SCHEST	100	3.65–4.62	4.24 ± 0.24	3.24–4.23	3.64 ± 0.16	1.17 ± 0.08
<i>C. tyzzeri</i> -Mmm	Natural	Wild Mmm	100	3.89–5.00	4.47 ± 0.20	3.43–4.35	3.88 ± 0.21	1.16 ± 0.08
<i>C. tyzzeri</i> -Mmm	Experimental	SCID	100	3.89–4.98	4.53 ± 0.20	3.43–4.44	3.91 ± 0.21	1.16 ± 0.08
<i>C. tyzzeri</i> -Mmm	Experimental	Mmm STUS	100	3.98–4.91	4.49 ± 0.20	3.43–4.42	3.91 ± 0.20	1.15 ± 0.08
<i>C. tyzzeri</i> -Mmm	Experimental	Mmd SCHEST	100	3.89–4.95	4.49 ± 0.20	3.46–4.35	3.90 ± 0.21	1.15 ± 0.08

Mmd, *Mus musculus domesticus*; Mmm, *Mus musculus musculus*; Calf, calf from commercial breed; SCID, severe combined immunodeficiency mice; Wild Mmm, wild eastern European house mice; Wild Mmm, wild western European house mice; Mmm STUS, strain of eastern European house mice, 24–26th generation held in captivity; Mmd SCHEST, strain of western European house mice, 8–10th generation held in captivity.

**Table 4**  
Prepatent and patent period of *Cryptosporidium tyzzeri*-Mmd (CR4293) and *C. tyzzeri*-Mmm (CR2090) in susceptible hosts based on microscopic examination of feces.

Host	Strain	Prepatent period (Mean days ± S.D.)		Patent period (Mean days ± S.D.)	
		<i>C. tyzzeri</i> -Mmd	<i>C. tyzzeri</i> -Mmm	<i>C. tyzzeri</i> -Mmd	<i>C. tyzzeri</i> -Mmm
<i>Mus musculus</i>	SCID	4.17 ± 0.41	4.00 ± 0.00	>26	>26
<i>Mus musculus</i>	BALB/c	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	6.17 ± 1.60	6.17 ± 3.37
<i>Mus m. musculus</i>	STUS	4.50 ± 0.84	4.00 ± 0.00	7.67 ± 2.16	7.17 ± 0.98
<i>Mus m. domesticus</i>	SCHEST	4.67 ± 0.82	6.17 ± 1.47	4.83 ± 4.71	14.17 ± 3.19

SCID, severe combined immunodeficiency mice; BALB/c, inbred immunocompetent laboratory mice; Mmm STUS, strain of *M. musculus musculus*, 24–26th generation held in captivity; Mmd SCHEST, strain of *M. musculus domesticus*, 8–10th generation held in captivity.

Using microscopic detection, the patent period was significantly shorter in immunocompetent (mean 12.6 days) than immunodeficient SCID mice (>26 days;  $P = 0.0022$ ) (data not shown). In addition, *C. tyzzeri*-Mmm had a significantly longer patent period than *C. tyzzeri*-Mmd in the Mmd SCHEST strain ( $P = 0.0108$ ) (Table 4). A comparatively different patent period was detected with PCR. *Cryptosporidium tyzzeri*-Mmd DNA was detected in feces of Mmm STUS and Mmd SCHEST mice from 4 to 30 and 4 to 26 days p.i., respectively (Table 4, Fig. 5Ca, Da). *Cryptosporidium tyzzeri*-Mmm DNA was detected in feces of Mmm STUS and Mmd SCHEST mice from 4 to 30 and 5 to 30 days p.i., respectively ( $P = 0.2316$ – $0.8355$ ; Fig. 5Ca, Da).

The infection intensity (OPG) varied among the susceptible hosts presented in Table 4 with the highest intensity observed in immunodeficient mice, regardless of the *C. tyzzeri* isolate used. Peak oocyst shedding ( $t_{\max}$  and  $C_{\max}$ ) occurred at 5–7 days p.i. and 12–15 days p.i. in immunocompetent and immunodeficient SCID mice, respectively ( $P = 0.0021$ ) (Fig. 5Ab). In addition, the number of shed oocysts (AUC) was significantly higher in immunodeficient than immunocompetent mice ( $P = 0.0021$ ). Infection intensity (AUC,  $t_{\max}$  and  $C_{\max}$ ) did not differ between *C. tyzzeri* infections in Mmd SCHEST and Mmm STUS mice, regardless of the isolate used in the infection ( $W = 531.5$ – $549.0$ ,  $P = 0.1910$ – $0.2633$ ) (Fig. 5).

### 3.3.2. Pathological changes and clinical signs

There were no clinical signs or macroscopic changes associated with cryptosporidiosis in susceptible hosts autopsied at the peak of infection and 30 days p.i. Histological examination of the gastrointestinal tract of animals infected with *C. tyzzeri* revealed developmental stages primarily attached to the microvillar border of the duodenum, jejunum and ileum. Developmental stages were also present in the cecum of SCID mice. No pathological changes were detected in susceptible hosts. *Cryptosporidium* developmental stages were not found in the gastrointestinal tract of gerbils, multimammate mice, wood mice or guinea pigs.

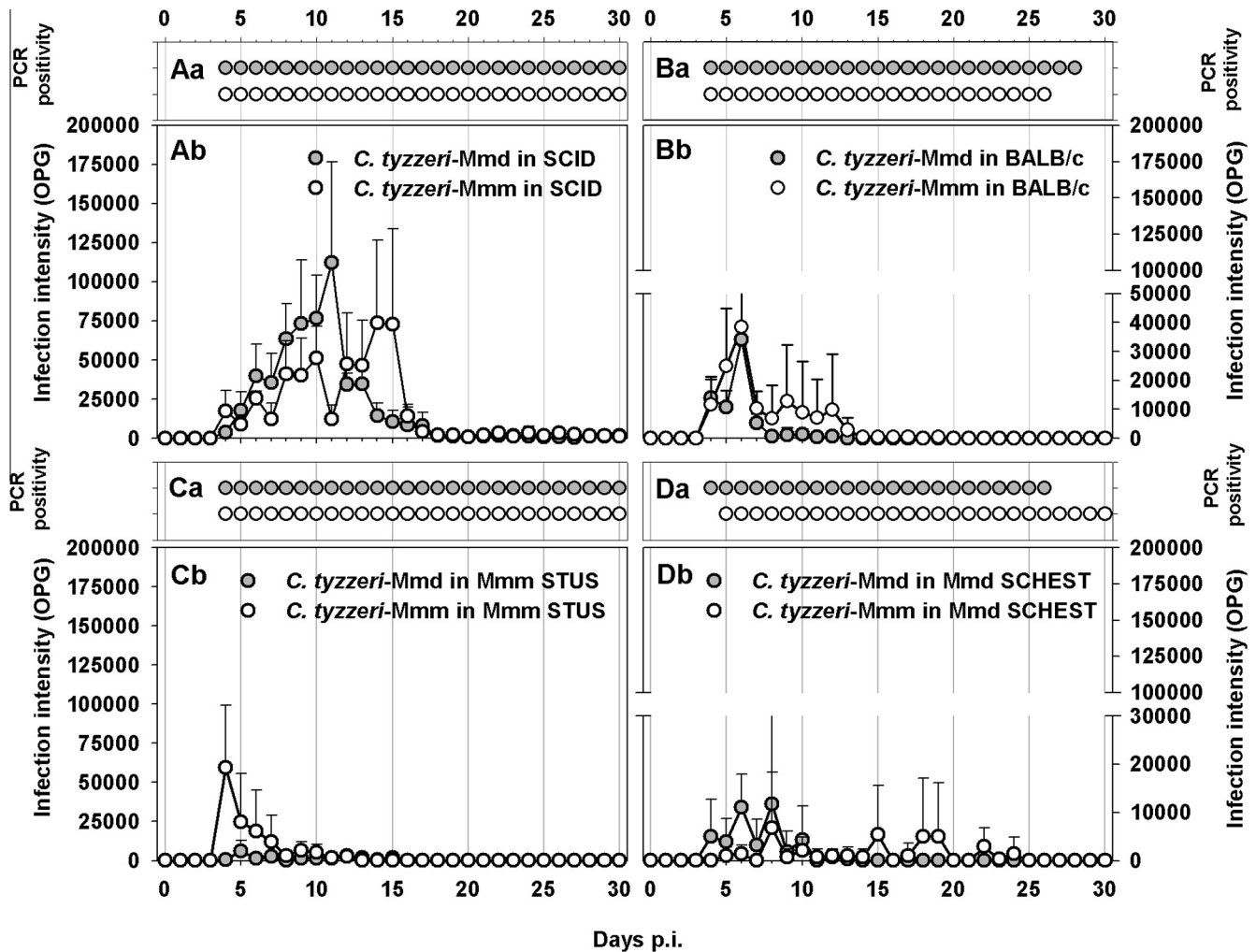
## 4. Discussion

The 500,000-year separation of the subspecies Mmd and Mmm, followed by their secondary contact and establishment of a stable and narrow hybrid zone, affords a rare opportunity to study key questions of evolution and coevolution. The goal in this study was to determine the extent to which the intestinal parasite *C. tyzzeri* has coevolved with subspecies of the house mouse.

Four out of the five loci examined in *C. tyzzeri* were divergent between Mmd and Mmm populations. Sequences at the *ssrRNA* locus did not vary and, with the exception of gp60, sequence divergence between the two host subspecies at other loci was low, which suggests that the populations diverged relatively recently. There was a strong association between the mouse subspecies genomes and *C. tyzzeri* genotypes in the hybrid zone, and no evidence for introgression of either *C. tyzzeri* genotype to foreign mouse genomes (Table 1). The most parsimonious explanation is that either the *C. tyzzeri* subtypes are less fit in the opposite mouse-subspecific genome or that the two subtypes can hybridize but the hybrids are selected against.

The Mmd COWP allele clustered with a COWP sequence from *C. tyzzeri* isolate 411 (Accession No. AF266268) in a NJ tree (Fig. 2A). This isolate was reported from a house mouse captured in the eastern USA (Xiao et al., 2000), a region colonised by Mmd from western Europe. The gp60 sequence from isolate 411 clustered with the Mmd-associated IXb subtype family (Fig. 3). Collectively, these data show that the distribution of *C. tyzzeri*-Mmd matches the distribution of Mmd in Germany, the Czech Republic, New Zealand and the USA.

The host-subspecies restriction of *C. tyzzeri* genotypes in the HMHZ differs from the pattern observed for microsporidia (Sak et al., 2011) and *Helicobacter* (Wasimuddin et al., 2012), which showed no subspecies specificity in the HMHZ. However, as both of these studies used single-gene pathogen detection, they were more limited than the present study in their ability to detect pathogen differentiation. This fact also limits comparisons with *C. tyzzeri* from other non-*Mus* spp., as discussed later.



**Fig. 5.** Course of infection of *Cryptosporidium tyzzeri* CR4293 (Mmd subtype) and CR2090 (Mmm subtype) strains in (A) SCID, (B) BALB/c, (C) STUS, (D) SCHEST mice based on (a) molecular and (b) coprological examination. STUS, a wild-derived *Mus musculus musculus* strain in 24–26th generation of brother–sister mating; SCHEST, a wild-derived *Mus musculus domesticus* strain in 8–10th generation of brother–sister mating; OPG, oocyst per gram.

The Mmd COWP allele shared 100% identity with sequences from the bank vole (*C. glareolus*), the common vole (*M. arvalis*), and the yellow-necked mouse (*A. flavicollis*) in Poland (Bajer et al., 2003). Given that this allele was not detected in isolates from Mmm in the central European transect across the HMHZ, it is striking to find it in Poland, a country to the east of the HMHZ, well within the Mmm range. This finding raises two important questions that cannot be addressed satisfactorily using the current data. Firstly, is the Mmd COWP allele also prevalent in populations infecting Mmm or is it restricted to the hosts identified by Bajer et al. (2003)? Although data from Mmm in Poland are lacking, *C. tyzzeri* was not found in samples from *A. flavicollis* or *C. glareolus* in the Czech Republic and Slovakia, suggesting that *C. tyzzeri* is not prevalent in these animals across the two countries (Kváč, unpublished data). Secondly, are there genetic or biological differences between isolates from voles and field mice in Poland and isolates from Mmd in the HMHZ? The limitations of genetic comparisons using COWP alone are exemplified by the finding of Robinson et al. (2010) that two other species, *C. hominis* and *Cryptosporidium cuniculus*, are identical at this locus. The failure to experimentally infect *A. flavicollis* with isolates from Mmd or Mmm in this study suggests that these isolates are biologically different to those reported by Bajer et al. (2003). In a follow-up study, Bednarska et al. (2003) revealed that the *C. tyzzeri* isolates from voles and field

mice from Poland were infective for C57BL/6 mice, an inbred strain with a prevailing genome derived from Mmd (Yang et al., 2011). However, mice were immunosuppressed prior to infection (Bednarska et al., 2003). In order to address the questions raised by these data, a more comprehensive molecular and biological examination of isolates from different hosts and geographic regions is required.

The gp60 locus was the most polymorphic of the five genes targeted, which is in accordance with high variability of this gene in other *Cryptosporidium* spp. (Alves et al., 2006; Feltus et al., 2006; Gatei et al., 2007). The gp60 sequences from Mmm and Mmd belonged to subtype families IXa and IXb, respectively. The IXa subtype was previously reported in *M. musculus* from China, a country colonised by Mmm in the north and another subspecies, *Mus musculus castaneus*, in the south. The hybrid zone between Mmm and *M. m. castaneus* in the Far East is less clearly defined than the European HMHZ. However, these subspecies are mostly separated by the Yangtze River (Moriwaki et al., 1990). The reported location of the isolates from China (Linzhou and Kaifeng City, Henan Province) suggests that they were sampled from mice within the Mmm range (Tsuchiya et al., 1994). The IXb subtype was previously reported from *M. musculus* in the USA and, as discussed earlier, the host subspecies is assumed to be Mmd. The gp60 data from *M. musculus* subspecies in the USA, Czech Republic,



Germany, New Zealand and China show that genetic variation in *C. tyzzeri* is explained by host-specific differences rather than geographic distance (Fig. 3).

The trinucleotide repeat region in *C. tyzzeri* was short relative to many other *Cryptosporidium* spp., including *C. parvum*. However, an 18 bp minisatellite region in the IXb subtype family encoded a variable number of *N*-glycosylation sites. The 18 bp repeat in IXa subtype family sequences did not encode *N*-glycosylation sites and to our knowledge this variable number of *N*-glycosylation sites is unique to the IXb subtype family. *N*-glycosylation is an important modifier of outer membrane proteins in the related apicomplexan genus *Toxoplasma* (Fauquenoy et al., 2008). A more detailed study is warranted to determine whether these sites have been lost by *C. tyzzeri* in Mmm (IXa subtype family) or have been gained by *C. tyzzeri* in Mmd (IXb subtype family).

In addition to congruent genetic differentiation, *C. tyzzeri* oocysts isolated from Mmd are significantly smaller than oocysts from Mmm. Oocysts from both mouse subspecies were smaller than those of *C. parvum* (Upton and Current, 1985), and similar to previous reports of *C. tyzzeri* from laboratory and wild mice, *C. glareolus*, *A. flavicollis* and *M. arvalis* (Bednarska et al., 2003; Lv et al., 2009; Ren et al., 2012). Moreover, isolates from the present study were morphologically similar to those in the original description of *C. parvum* by Tyzzer from laboratory mice originated from the USA (Tyzzer, 1912). Morphometry of both *C. tyzzeri* isolates and the *C. parvum* control was not significantly affected by host species.

Having shown that *C. tyzzeri* subtypes infecting Mmm and Mmd are genetically divergent and host-restricted in the HMHZ, the infectivity of divergent subtypes for each *M. musculus* subspecies was examined under experimental conditions. Similar to *C. parvum*, *C. tyzzeri* infects the small intestine of susceptible hosts and infectious stages have been identified in the jejunum and ileum of immunocompetent mice (Ren et al., 2012). We additionally found infectious stages in the duodenum of immunocompetent hosts and the duodenum and cecum of immunodeficient hosts infected with Mmm and Mmd *C. tyzzeri* subtypes.

Both Mmd and Mmm were susceptible to experimental infections with both *C. tyzzeri* subtypes, demonstrating that the subtypes are not strictly host-specific and neither subtype caused apparent disease. This observation seems to contradict the expectations derived from coevolutionary relationships and deserves some explanation. First, there were differences in the dynamics of the prepatent period (Table 4). If competition between the two *C. tyzzeri* subtypes for resources exists in nature then the subtype with a shorter prepatent period in a given subspecies eventually outcompetes the subtype with a longer prepatent period. The issue of competition could not be addressed in this study because the experimental design controlled for *Cryptosporidium* co-infections. Nevertheless, elimination of one *Cryptosporidium* sp. by another has been demonstrated by Akiyoshi et al. (2003) who observed a rapid displacement of *C. hominis* by a closely related *C. parvum* in a gnotobiotic pig model of infection.

The inconsistent susceptibilities of house mouse subspecies to *C. tyzzeri* subtypes in natural and experimental settings also may be attributed, at least in part, to the use of inbred mice in experimental infections (Mmm STUS mice were fully inbred and Mmd SCHEST mice were moderately inbred). The removal of genetic variation through inbreeding, and particularly the reduced heterozygosity of genes in the major histocompatibility complex, can increase susceptibility to parasitism (Froeschke and Sommer, 2005; MacDougall-Shackleton et al., 2005; Meyer-Lucht and Sommer, 2005). Finally, mice in natural settings of the HMHZ tend to be parasitized with multiple parasite species (Sak et al., 2011; Baird et al., 2012; Wasimuddin et al., 2012), resulting in an array of parasite–parasite and parasite–host interactions that shape the

immune response in ways that are difficult to replicate experimentally.

In summary, this study has shown that Mmm and Mmd are hosts of genetically and morphometrically divergent *C. tyzzeri* subtypes. The absence of introgression from either side of the HMHZ suggests that *C. tyzzeri* subtypes are relatively subspecies-specific in a natural setting, although Mmm and Mmd are susceptible to experimental infections with both subtypes. Collectively, these data support the conclusion that *C. tyzzeri* is coevolving with house mouse subspecies. More generally, the house mouse may be a useful model for understanding factors contributing to *Cryptosporidium* coevolution with hosts.

## Acknowledgements

We thank to our colleagues and farmers for their help with sampling. This study was funded by the Grants of the Czech Science Foundation (206/08/0640) (J.P., M.M.), Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LH11061) (M.K.), Grant Agency of University of South Bohemia (022/2010/Z) (M.K.), and National Institutes of Health (NIH), USA Grant No. 2P20 RR015566 from the National Center for Research Resources, USA (J.M.).

## References

- Akiyoshi, D.E., Mor, S., Tzipori, S., 2003. Rapid displacement of *Cryptosporidium parvum* type 1 by type 2 in mixed infections in piglets. *Infect. Immun.* 71, 5765–5771.
- Albrechtová, J., Albrecht, T., Baird, S.J., Macholán, M., Rudolfsen, G., Munclinger, P., Tucker, P.K., Piálek, J., 2012. Sperm-related phenotypes implicated in both maintenance and breakdown of a natural species barrier in the house mouse. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 279, 4803–4810.
- Alves, M., Xiao, L., Antunes, F., Matos, O., 2006. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol. Res.* 99, 287–292.
- 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.
- Anonymous, 1982. Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 31, 589–592.
- Arrowood, M.J., Sterling, C.R., 1987. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.* 73, 314–319.
- Auffray, J.C., Britton-Davidian, J., 2012. The house mouse and its relatives: systematics and taxonomy. In: Macholán, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P., Piálek, J. (Eds.), *Evolution of the House Mouse*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1–34.
- Baird, S.J.E., Macholán, M., 2012. What can the *Mus musculus musculus*/*M. m. domesticus* hybrid zone tell us about speciation? In: Macholán, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P., Piálek, J. (Eds.), *Evolution of the House Mouse*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 334–372.
- Baird, S.J.E., Ribas, A., Macholán, M., Albrecht, T., Piálek, J., Gouy de Bellocq, J., 2012. Where are all the wormy mice? A reexamination of hybrid parasitism in the European house mouse hybrid zone. *Evolution* 66, 2757–2772.
- 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.
- Barton, N.H., 1979. Gene flow past a cline. *Heredity* 43, 333–339.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M., 1985. Analysis of hybrid zones. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16, 113–148.
- Bednarska, M., Bajer, A., Kulis, K., Sinski, E., 2003. Biological characterisation of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10, 163–169.
- Benson, G., 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27, 573–580.
- Bonhomme, F., Searle, J.B., 2012. House mouse phylogeography. In: Macholán, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P., Piálek, J. (Eds.), *Evolution of the House Mouse*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 278–296.
- Boursot, P., Auffray, J.C., Britton-Davidian, J., Bonhomme, F., 1993. The evolution of house mice. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24, 119–152.
- Cevallos, A.M., Bhat, N., Verdon, R., Hamer, D.H., Stein, B., Tzipori, S., Pereira, M.E., Keusch, G.T., Ward, H.D., 2000a. Mediation of *Cryptosporidium parvum* infection in vitro by mucin-like glycoproteins defined by a neutralizing monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 68, 5167–5175.
- Cevallos, A.M., Zhang, X., Waldor, M.K., Jaisson, S., Zhou, X., Tzipori, S., Neutra, M.R., Ward, H.D., 2000b. Molecular cloning and expression of a gene encoding

- Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infect. Immun.* 68, 4108–4116.
- Chalmers, R.M., Giles, M., 2010. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK – challenges for control. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1487–1497.
- 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.
- Cucchi, T., Auffray, J.C., Vigne, J.D., 2012. History of house mouse synanthropy and dispersal in the Near East and Europe: a zooarchaeological insight. In: Macholán, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P., Piálek, J. (Eds.), *Evolution of the House Mouse*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 65–93.
- 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.
- Dufková, P., Macholán, M., Piálek, J., 2011. Inference of selection and stochastic effects in the house mouse hybrid zone. *Evolution* 65, 993–1010.
- Đureje, L., Macholán, M., Baird, S.J.E., Piálek, J., 2012. The mouse hybrid zone in Central Europe: from morphology to molecules. *Folia Zool.* 61, 308–318.
- Duvaux, L., Belkhir, K., Boulesteix, M., Boursot, P., 2011. Isolation and gene flow: inferring the speciation history of European house mice. *Mol. Ecol.* 20, 5248–5264.
- Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., Chalmers, R.M., 2012. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. *Epidemiol. Infect.* 140, 673–683.
- Fauquenoy, S., Morelle, W., Hovasse, A., Bednarczyk, A., Slomianny, C., Schaeffer, C., Van Dorsseleer, A., Tomavo, S., 2008. Proteomics and glycomics analyses of N-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*–host cell interactions. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 891–910.
- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124, 90–97.
- Feltus, D.C., Giddings, C.W., Schneck, B.L., Monson, T., Warshauer, D., McEvoy, J.M., 2006. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4303–4308.
- Feng, Y., Lal, A.A., Li, N., Xiao, L., 2011. Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.* 127, 238–242.
- Froeschke, G., Sommer, S., 2005. MHC class II DRB variability and parasite load in the striped mouse (*Rhabdomys pumilio*) in the Southern Kalahari. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1254–1259.
- Gatei, W., Das, P., Dutta, P., Sen, A., Cama, V., Lal, A.A., Xiao, L., 2007. Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infect. Genet. Evol.* 7, 197–205.
- Geraldes, A., Basset, P., Gibson, B., Smith, K.L., Harr, B., Yu, H.T., Bulatova, N., Ziv, Y., Nachman, M.W., 2008. Inferring the history of speciation in house mice from autosomal, X-linked, Y-linked and mitochondrial genes. *Mol. Ecol.* 17, 5349–5363.
- Gibson-Kueh, S., Yang, R., Thuy, N.T., Jones, J.B., Nicholls, P.K., Ryan, U., 2011. The molecular characterization of an *Eimeria* and *Cryptosporidium* detected in Asian seabass (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. *Vet. Parasitol.* 181, 91–96.
- Guénet, J.L., Bonhomme, F., 2003. Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet.* 19, 24–31.
- Guerrant, D.L., Moore, S.R., Lima, A.A., Patrick, P.D., Schorling, J.B., Guerrant, R.L., 1999. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four–seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 707–713.
- 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.
- Hlavsa, M.C., Watson, J.C., Beach, M.J., 2005. Cryptosporidiosis surveillance – United States, 1999–2002. *MMWR Surveill. Summ.* 54, 1–8.
- Janoušek, V., Wang, L., Luzynski, K., Dufková, P., Vyskočilová, M.M., Nachman, M.W., Munclinger, P., Macholán, M., Piálek, J., Tucker, P.K., 2012. Genome-wide architecture of reproductive isolation in a naturally occurring hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *M. m. domesticus*. *Mol. Ecol.* 21, 3032–3047.
- Jex, A.R., Gasser, R.B., 2010. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies – research review. *Biotechnol. Adv.* 28, 17–26.
- 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 tyzzeri*, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol. (Praha)* 55, 81–94.
- Jones, E.P., Jensen, J.K., Magnussen, E., Gregersen, N., Hansen, H.S., Searle, J.B., 2011. A molecular characterization of the charismatic Faroese house mouse. *Biol. J. Linn. Soc.* 102, 471–482.
- Karanis, P., Plutzer, J., Halim, N.A., Igori, K., Nagasawa, H., Ongert, J., Liqing, M., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. *Parasitol. Res.* 101, 1575–1580.
- Kilani, R.T., Sekla, L., 1987. Purification of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites by cesium chloride and Percoll gradients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 505–508.
- Kimball III, L.M., Miller, D.L., Chavez, W., Altman, N., 1999. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium serpentis* in a wild-caught corn snake (*Elaphe guttata guttata*) and a five-species restriction fragment length polymorphism-based assay that can additionally discern *C. parvum* from *C. wrairi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5345–5349.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Kváč, M., Kestřánová, M., Pinková, M., Květoňová, D., Kalinová, J., Wagnerová, P., Kotková, M., Vítovec, J., Ditrich, O., McEvoy, J., Stenger, B., Sak, B., 2013. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet. Parasitol.* 191, 218–227.
- Kváč, M., Ondráčková, Z., Květoňová, D., Sak, B., Vítovec, J., 2007. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 143, 229–233.
- Kváč, M., Vítovec, J., 2003. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Pub. Health* 50, 451–457.
- 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.
- MacDougall-Shackleton, E.A., Derryberry, E.P., Foufopoulos, J., Dobson, A.P., Hahn, T.P., 2005. Parasite-mediated heterozygote advantage in an outbred songbird population. *Biol. Lett.* 1, 105–107.
- Macholán, M., Baird, S.J., Dufková, P., Munclinger, P., Bímová, B.V., Piálek, J., 2011. Assessing multilocus introgression patterns: a case study on the mouse X chromosome in central Europe. *Evolution* 65, 1428–1446.
- Macholán, M., Krystufek, B., Vohralík, V., 2003. The location of the *Mus musculus/M. domesticus* hybrid zone in the Balkans: clues from morphology. *Acta Theriol. (Warsz)* 48, 177–188.
- Macholán, M., Munclinger, P., Šugerková, M., Dufková, P., Bímová, B., Božíková, E., Zima, J., Piálek, J., 2007. Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution* 61, 746–771.
- McDonald, V., 2011. Cryptosporidiosis: host immune responses and the prospects for effective immunotherapies. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 9, 1077–1086.
- Meyer-Lucht, Y., Sommer, S., 2005. MHC diversity and the association to nematode parasitism in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*). *Mol. Ecol.* 14, 2233–2243.
- Morgan, U.M., Sargent, K.D., Deplazes, P., Forbes, D.A., Spano, F., Hertzberg, H., Elliot, A., Thompson, R.C., 1998. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology* 117 (Pt 1), 31–37.
- Morgan, U.M., Sturdee, A.P., Singleton, G., Gomez, M.S., Gracenea, M., Torres, J., Hamilton, S.G., Woodside, D.P., Thompson, R.C., 1999. The *Cryptosporidium* “mouse” genotype is conserved across geographic areas. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1302–1305.
- Moriwaki, K., Sagai, T., Shiroishi, T., Bonhomme, F., Wang, C.H., He, X.Q., Jin, M.L., Wu, Z.G., 1990. Mouse subspecies differentiation and H-2 polymorphism. *Biol. J. Linn. Soc.* 41, 125–139.
- Payseur, B.A., Krenz, J.G., Nachman, M.W., 2004. Differential patterns of introgression across the X chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. *Evolution* 58, 2064–2078.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Nichols, G.L., McLaughlin, J., 2001. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 49–56.
- Peng, M.M., Meshnick, S.R., Cunliffe, N.A., Thindwa, B.D., Hart, C.A., Broadhead, R.L., Xiao, L., 2003. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50 (Suppl.), 557–559.
- Piálek, J., Vyskočilová, M., Bímová, B., Havelková, D., Piálková, J., Dufková, P., Bencová, V., Đureje, L., Albrecht, T., Hauffe, H.C., Macholán, M., Munclinger, P., Storchová, R., Zajíčková, A., Holáň, V., Gregorová, S., Forejt, J., 2008. Development of unique house mouse resources suitable for evolutionary studies of speciation. *J. Hered.* 99, 34–44.
- Rajabi-Maham, H., Orth, A., Bonhomme, F., 2008. Phylogeography and postglacial expansion of *Mus musculus domesticus* inferred from mitochondrial DNA coalescent, from Iran to Europe. *Mol. Ecol.* 17, 627–641.
- Ren, X., Zhao, J., Zhang, L., Ning, C., Jian, F., Wang, R., Lv, C., Wang, Q., Arrowood, M.J., Xiao, L., 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.* 130, 274–281.
- Reynolds, K.A., Mena, K.D., Gerba, C.P., 2008. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192, 117–158.
- 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.
- 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., Květoňová, D., Albrecht, T., Piálek, J., 2011. The first report on natural *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon* spp. infections in wild east-European house mice (*Mus musculus musculus*) and west-European house mice (*M. m. domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic–Germany border. *Vet. Parasitol.* 178, 246–250.
- Sauch, J.F., Flanagan, D., Galvin, M.L., Berman, D., Jakubowski, W., 1991. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3243–3247.

- Searle, J.B., Jamieson, P.M., Gündüz, I., Stevens, M.I., Jones, E.P., Gemmill, C.E., King, C.M., 2009. The diverse origins of New Zealand house mice. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 276, 209–217.
- Soave, R., Danner, R.L., Honig, C.L., Ma, P., Hart, C.C., Nash, T., Roberts, R.B., 1984. Cryptosporidiosis in homosexual men. *Ann. Intern. Med.* 100, 504–511.
- 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. wairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 150, 209–217.
- Spano, F., Putignani, L., Naitza, S., Puri, C., Wright, S., Crisanti, A., 1998. Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 147–162.
- Strong, W.B., Gut, J., Nelson, R.G., 2000. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect. Immun.* 68, 4117–4134.
- 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., Lal, A.A., Xiao, L., 2002. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J. Parasitol.* 88, 388–394.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tanriverdi, S., Grinberg, A., Chalmers, R.M., Hunter, P.R., Petrovic, Z., Akiyoshi, D.E., London, E., Zhang, L., Tzipori, S., Tumwine, J.K., Widmer, G., 2008. Inferences about the global population structures of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7227–7234.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
- Tsuchiya, K., Miyashita, N., Wang, C.H., Wu, X.L., He, X.Q., Jin, M.L., Li, H., Wang, F.S., Shi, L.M., Moriwaki, K., 1994. Taxonomic study of the genus *Mus* in China, Korea, and Japan – morphologic identification. In: Moriwaki, K., Shiroishi, T., Yonekawa, H. (Eds.), *Genetics and Wild Mice*. Japan Science Society Press, Tokyo, pp. 3–12.
- Tyzzar, E.E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26, 394–412.
- Upton, S.J., Current, W.L., 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *J. Parasitol.* 71, 625–629.
- Van de Peer, Y., De Wachter, R., 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 10, 569–570.
- Wang, L., Luzynski, K., Pool, J.E., Janoušek, V., Dufková, P., Vyskočilová, M.M., Teeter, K.C., Nachman, M.W., Munclinger, P., Macholán, M., Piálek, J., Tucker, P.K., 2011. Measures of linkage disequilibrium among neighbouring SNPs indicate asymmetries across the house mouse hybrid zone. *Mol. Ecol.* 20, 2985–3000.
- Wasimuddin, W., Čížková, D., Bryja, J., Albrechtová, J., Haufler, H.C., Piálek, J., 2012. High prevalence and species diversity of *Helicobacter* spp. detected in wild house mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8158–8160.
- Widmer, G., Feng, X., Tanriverdi, S., 2004. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. *Methods Mol. Biol.* 268, 177–187.
- Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 124, 80–89.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R., Lal, A.A., 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1578–1583.
- Xiao, L., Limor, J., Morgan, U.M., Sulaiman, I.M., Thompson, R.C., Lal, A.A., 2000. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5499–5502.
- Xiao, L., Ryan, U.M., Graczyk, T.K., Limor, J., Li, L., Kombert, M., Junge, R., Sulaiman, I.M., Zhou, L., Arrowood, M.J., Koudela, B., Modrý, D., Lal, A.A., 2004. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 891–899.
- 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.
- Yang, H.N., Wang, J.R., Didion, J.P., Buus, R.J., Bell, T.A., Welsh, C.E., Bonhomme, F., Yu, A.H.T., Nachman, M.W., Piálek, J., Tucker, P., Boursot, P., McMillan, L., Churchill, G.A., Pardo-Manuel de Villena, F., 2011. Subspecific origin and haplotype diversity in the laboratory mouse. *Nat. Genet.* 43, 648–655.
- Yoder, J.S., Beach, M.J., 2007. Cryptosporidiosis surveillance – United States, 2003–2005. *MMWR Surveill. Summ.* 56, 1–10.
- Yoder, J.S., Herral, C., Beach, M.J., 2010. Cryptosporidiosis surveillance – United States, 2006–2008. *MMWR Surveill. Summ.* 59, 1–14.
- Ziegler, P.E., Wade, S.E., Schaaf, S.L., Chang, Y.F., Mohammed, H.O., 2007. *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York City watershed. *J. Wildl. Dis.* 43, 586–596.

## 8. PUBLIKACE 2

Kváč M, Havrdová N, Hlásková L, Daňková T, Kanděra J, Ježková J, Vítovec J, Sak B, Ortega Y, Xiao LH, Modrý D, Chelladurai JRJJ, **Prantlová V**, McEvoy J. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. PLoS One. 2016; 11, 1–24.

RESEARCH ARTICLE

# *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and Biological Evidence of Cryptic Species within Gastric *Cryptosporidium* of Mammals

Martin Kváč<sup>1,2\*</sup>, Nikola Havrdová<sup>2</sup>, Lenka Hlásková<sup>1</sup>, Tereza Daňková<sup>3</sup>, Jiří Kanděra<sup>3</sup>, Jana Ježková<sup>4</sup>, Jiří Vítovec<sup>2</sup>, Bohumil Sak<sup>1</sup>, Ynes Ortega<sup>5</sup>, Lihua Xiao<sup>6</sup>, David Modrý<sup>1,7,8</sup>, Jeba Rose Jennifer Jesudoss Chelladurai<sup>9</sup>, Veronika Prantlová<sup>1,2</sup>, John McEvoy<sup>9</sup>

**1** Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic, **2** Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic, **3** Grammar School and High School of Economics, Vimperk, Czech Republic, **4** Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic, **5** Center for Food Safety, Department of Food Science & Technology, University of Georgia, Griffin, Georgia, United States of America, **6** Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States of America, **7** Department of Pathology and Parasitology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic, **8** CEITEC VFU, Brno, Czech Republic, **9** Veterinary and Microbiological Sciences Department, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, United States of America

\* [kvac@paru.cas.cz](mailto:kvac@paru.cas.cz)



OPEN ACCESS

**Citation:** Kváč M, Havrdová N, Hlásková L, Daňková T, Kanděra J, Ježková J, et al. (2016) *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and Biological Evidence of Cryptic Species within Gastric *Cryptosporidium* of Mammals. PLoS ONE 11(1): e0147090. doi:10.1371/journal.pone.0147090

**Editor:** Herbert B. Tanowitz, Albert Einstein College of Medicine, UNITED STATES

**Received:** June 19, 2015

**Accepted:** December 26, 2015

**Published:** January 15, 2016

**Copyright:** This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the [Creative Commons CC0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) public domain dedication.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LH11061, to MK); the Czech Science Foundation (15-01090S, to MK); the Grant Agency of University of South Bohemia (011/2013/Z, to MK); the NIH (1R15AI067284-01A1, to JM); and CEITEC-Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.100/02.0068) from European Regional Development Fund (to DM).

## Abstract

The morphological, biological, and molecular characteristics of *Cryptosporidium muris* strain TS03 are described, and the species name *Cryptosporidium proliferans* n. sp. is proposed. *Cryptosporidium proliferans* obtained from a naturally infected East African mole rat (*Tachyoryctes splendens*) in Kenya was propagated under laboratory conditions in rodents (SCID mice and southern multimammate mice, *Mastomys coucha*) and used in experiments to examine oocyst morphology and transmission. DNA from the propagated *C. proliferans* isolate, and *C. proliferans* DNA isolated from the feces of an African buffalo (*Syncerus caffer*) in Central African Republic, a donkey (*Equus africanus*) in Algeria, and a domestic horse (*Equus caballus*) in the Czech Republic were used for phylogenetic analyses. Oocysts of *C. proliferans* are morphologically distinguishable from *C. parvum* and *C. muris* HZ206, measuring 6.8–8.8 (mean = 7.7 μm) × 4.8–6.2 μm (mean = 5.3) with a length to width ratio of 1.48 (n = 100). Experimental studies using an isolate originated from *T. splendens* have shown that the course of *C. proliferans* infection in rodent hosts differs from that of *C. muris* and *C. andersoni*. The prepatent period of 18–21 days post infection (DPI) for *C. proliferans* in southern multimammate mice (*Mastomys coucha*) was similar to that of *C. andersoni* and longer than the 6–8 DPI prepatent period for *C. muris* RN66 and HZ206 in the same host. Histopathologically, stomach glands of southern multimammate mice infected with *C. proliferans* were markedly dilated and filled with necrotic material, mucus, and numerous *Cryptosporidium* developmental stages. Epithelial cells of infected glands were atrophic, exhibited cuboidal or squamous metaplasia, and significantly proliferated into the

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

lumen of the stomach, forming papillary structures. The epithelial height and stomach weight were six-fold greater than in non-infected controls. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA, *Cryptosporidium* oocyst wall protein, thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1, heat shock protein 70, actin, heat shock protein 90 (MS2), MS1, MS3, and M16 gene sequences revealed that *C. proliferans* is genetically distinct from *C. muris* and other previously described *Cryptosporidium* species.

## Introduction

Apicomplexan parasites of the genus *Cryptosporidium* infect the gastrointestinal tract of most vertebrates, including humans [1]. The organ specificity (localization of endogenous development in the host) of *Cryptosporidium* species and genotypes can vary, and two major groups are recognized: the larger intestinal group, which also includes species and genotypes with affinity for the lungs and bursa of Fabricius, and the smaller gastric group which has affinity for the glands of the glandular stomach [2]. Within the gastric group, two species, *C. muris* and *C. andersoni*, are specific for mammals, and a number of different strains of these species have been identified worldwide (Tables 1 and 2) [3, 4]. *Cryptosporidium muris* was described in laboratory mice [3]. Although it is predominantly a rodent species, it has been detected in, or experimentally transmitted to, various mammalian hosts, including members of Hyracoidea, Carnivora, Lagomorpha, Arctiodactyla, Perissodactyla, and primates (both human and non-human) (Table 1). *Cryptosporidium muris* also has been detected in the feces of snakes, lizards, frogs, and birds of prey; however, these cases were probably due to the mechanical passage of oocysts following ingestion of infected rodents rather than an active infection [5–12]. Similarly, the detection of *C. muris* in pig feces and slurry from pig farms [13–15] may have been due to rodents rather than active infections, as pigs are not susceptible to *C. muris* under experimental conditions [16]. *Cryptosporidium andersoni*, previously known as *C. muris*-like, was distinguished from *C. muris* based on molecular and biological differences [4]. Cattle (*Bos taurus*) are the typical host for *C. andersoni*, but it has been found in other ruminants, various rodents, and humans (Table 1).

A number of variant strains of *C. muris* and *C. andersoni* have been described, based on polymorphisms in the small ribosomal subunit (SSU) gene, and differences in host specificity, pathogenicity, and course of infection. For example, *C. muris* Japan field genotype (also known as *C. muris* Kawatabi strain) differs from *C. muris* RN66 (reference strain) [17, 18]. Similarly, among *C. andersoni* strains, only *C. andersoni* Kawatabi, is infectious for the domestic mouse. Previous studies suggest that *C. muris* and *C. andersoni* represent a complex of cryptic species (Tables 1 and 2), but phylogenetic and biological data to support separate species are mostly lacking.

We undertook this study to examine the host specificity, course of infection, pathogenicity, oocyst morphology, and molecular characteristics of *C. muris* strain TS03. Based on the collective data from this and other studies [19–25], which show that *C. muris* strain TS03 is genetically distinct from *C. muris* and other known *Cryptosporidium* species, we propose the species name *Cryptosporidium proliferans* n. sp.

## Materials and Methods

### Source of oocysts and DNA for studies

The isolate of *C. proliferans* (previously known as *C. muris* TS03) used to determine experimental infectivity and oocyst morphology originated from a naturally infected East African

**Table 1. List of identified hosts for *Cryptosporidium proliferans* (CP), *Cryptosporidium muris* (CM), *Cryptosporidium andersoni* (CA), Japan field mouse genotype (JG), and caribou genotype (CG). Mark indicates susceptibility to infection.**

Order	Host (common name)	CP	CM	CA	JG	CG	Reference
<b>Rodentia</b>	<i>Acomys cahirinus</i> (Spiny mouse)	•	•				[24]
	<i>Apodemus speciosus</i> (Large Japanese field mouse)				•		[17]
	<i>Apodemus sylvaticus</i> (Wood mouse)		•				[26]
	<i>Clethrionomys glareolus</i> (Bank vole)		•				[26]
	<i>Cavia porcellus</i> (Guinea pig)		•				[27]
	<i>Dolichotis patagonum</i> (Patagonian mara)		•				[10]
	<i>Eutamias sibiricus</i> (Siberian chipmunk)		•				[28]
	<i>Gerbilus gerbilus</i> (Lesser gerbil)	•		•			[29]
	<i>Meriones tristrami</i> (Tristram's jird)	•		•			[29]
	<i>Meriones unguiculatus</i> (Mongolian gerbil)	•		•			[21, 30]
	<i>Sekeetamys calurus</i> (Bushy-tailed jird)	•		•			[29]
	<i>Marmota bobak</i> (Bobak marmot)			•			[31]
	<i>Mastomys natalensis</i> (Natal multimammate mouse)	•	•	•			[32]
	<i>Mastomys coucha</i> (Southern multimammate mouse)	•	•	•			This study
	<i>Mesocricetus auratus</i> (Golden hamster)		•	•			[33, 34]
	<i>Microtus brandti</i> (Brandt's voles)	•	•				[24]
	<i>Mus</i> spp. (House mouse)	•	•	•	•		[6, 17, 35]
	<i>Phodopus campbelli</i> (Campbell's dwarf hamster)		•	•			[33]
	<i>Phodopus sungorus</i> (Djungarian hamster)		•	•			[33]
	<i>Phodopus roborovskii</i> (Roborovski hamster)		•				[36]
<i>Rattus norvegicus</i> (Brown rat)		•				[37]	
<i>Sciurus carolinensis</i> (Eastern gray squirrel)	•					[38]	
<i>Tachyoryctes splendens</i> (East African mole-rat)	•					[22]	
<b>Peramelemorphia</b>	<i>Macrotis lagotis</i> (Greater bilby)		•				[39]
<b>Hyracoidea</b>	<i>Procavia capensis</i> (Rock hyrax)		•				[40]
<b>Carnivora</b>	<i>Canis familiaris</i> (Dog)		•				[27]
	<i>Canis latrans</i> (Coyote)		•				[41]
	<i>Felis catus</i> (Cat)		•				[37]
	<i>Phoca hispida</i> (Ringed seal)		•				[42]
<b>Lagomorpha</b>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (European rabbit)		•				[27]
<b>Arctiodactyla</b>	<i>Bos grunniens</i> (Yak)			•			[43]
	<i>Bos taurus</i> (Cattle)			•			[4]
	<i>Bison bonasus</i> (European bison)			•			[31]
	<i>Capra hircus</i> (Goat)		•				[22, 44]
	<i>Ovis aries</i> (Sheep)		•	•			[22, 44, 45]
	<i>Camelus bactrianus</i> (Bactrian camel)			•			[46]
	<i>Gazella cuvieri</i> (Cuvier's gazelle)		•				[47]
	<i>Giraffa camelopardalis reticulata</i> (Reticulated giraffe)		•				[48]
	<i>Odocoileus hemionus</i> (Mule deer)						[49]
	<i>Oreamnos americanus</i> (Mountain goat)			•			[50]
	<i>Rangifer tarandus</i> (Reindeer)					•	[51]
	<i>Sus scrofa</i> (Pig)		•				[15]
<i>Syncerus caffer</i> (African buffalo)	•					[52]	
<b>Perissodactyla</b>	<i>Equus africanus</i> (Donkey)	•					[53]
	<i>Equus ferus caballus</i> (Horse)	•	•				This study; [54]
<b>Primates</b>	<i>Homo sapiens</i> (Human)		•	•			[55, 56]

(Continued)

Table 1. (Continued)

Order	Host (common name)	CP	CM	CA	JG	CG	Reference
	<i>Macaca fascicularis</i> (Crab-eating macaque)		•				[57]
	<i>Nycticebus coucang</i> (Sunda slow loris)		•				[58]
<b>Struthioniformes</b>	<i>Struthio camelus</i> (Ostrich)		•				[59]
<b>Caprimulgiformes</b>	<i>Podargus strigoides</i> (Tawny frogmouth)		•				[9]
<b>Galliformes</b>	<i>Rollulus roulouli</i> (Crested partridge)			•			[9]
<b>Squamata</b>	<i>Elaphe obsoleta</i> (Western rat snake)		•				[60]
	<i>Oxyuranus scutellatus</i> (Coastal taipan)		•				[6]
	<i>Python regius</i> (Python regius)		•				[61]
	<i>Spilotes pullatus</i> (Spilotes pullatus)		•				[19]
	<i>Varanus salvadorii</i> (Varanus salvadorii)		•				[31]
<b>Anura</b>	<i>Ceratophrys ornate</i> (Argentine horned frog)		•				[12]

doi:10.1371/journal.pone.0147090.t001

mole rat (*Tachyoryctes splendens*) trapped in Kakamega, Kenya in 2003, and was maintained in susceptible laboratory rodents (SCID and southern multimammate mice *Mastomys coucha*) at two laboratories: Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic and University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic. DNA obtained from the laboratory-propagated *C. proliferans* isolate, and *C. proliferans* DNA isolated from the feces of an African buffalo (*Syncerus caffer*) in Central African Republic [52], a donkey (*Equus africanus*) in Algeria [53], and a domestic horse (*Equus caballus*) in the Czech Republic (unpublished) were used for phylogenetic analyses.

Oocysts of *C. muris* HZ206, originally isolated from a naturally infected domestic mouse (*Mus musculus domesticus*; Mmd) in Germany in 2012, were used as a *C. muris* control. *Cryptosporidium muris* HZ206 has been maintained at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic in a wild-derived Mmd strain from Schweben, central Germany (10th generation of brother-sister mating; kept under the name SCHEST at the Institute of Vertebrate Biology, Brno, Czech Republic). For comparison of oocyst morphology a *C. parvum* isolate originating from a naturally infected 23-day-old Holstein calf was used.

### Parasitological examination and oocyst preparation

Animal feces were screened for *Cryptosporidium* oocysts using fecal smears stained with aniline-carbol-methyl violet (ACMV) [65]. Fecal specimens were collected daily and stored in a 2.5% potassium dichromate solution at 4–8°C. *Cryptosporidium* oocysts were purified for morphology, phylogeny, and infectivity analyses using sucrose gradient [66] and cesium chloride gradient centrifugation [67]. Purified oocysts were stored for up to 4 weeks at 4–8°C in PBS with antimycotics and antibiotics (100 UI penicillin, 10 µg/ml streptomycin, 0.25/ml µg amphotericin and 30 µg/ml gentamicin). The identity of the parasite was confirmed by sequence analysis of the SSU gene, using the method described below. The number of oocysts administered to animals was determined by hemocytometer counting. The viability of oocysts was examined by propidium iodide (PI) staining using a modification of a previously described assay [68]. Examined oocysts were washed in distilled water (DW; 10<sup>5</sup> oocysts in 100 µl) and mixed with 10 µl of PI (1% solution, SIGMA). After 30 min of incubation at room temperature in the dark, the oocysts were washed twice with DW. Oocyst viability was examined using fluorescence microscopy (filter 420 nm, Olympus IX70). Oocysts with red fluorescence were considered to be dead, and those without fluorescence were considered viable. A total of 500 oocysts were counted.



**Table 2. Prepatent and patent period for *Cryptosporidium proliferans* and different *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni* strains and isolates in various hosts.**

Species / strain	Original host	Recipient host (age in days)	Prepatent period (day)	Patent period (day)	Infectious dose	Reference
<i>C. muris</i> MCR	<i>Mus musculus</i>	<i>Mus musculus</i> ICR (21)	4–10	36–73	2×10 <sup>6</sup>	[34, 62]
<i>C. muris</i> RN66	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mus musculus</i> ICR (21)	6	> 30	2.4×10 <sup>6</sup>	[63]
<i>C. muris</i> CB03	<i>Camelus bactrianus</i>	<i>Mus musculus</i> BALB/c (56)	10	15–18	1×10 <sup>6</sup>	[25]
<i>C. andersoni</i> LI03	<i>Bos taurus</i>	<i>Mus musculus</i> BALB/c (56)	NI	NI	1×10 <sup>6</sup>	[22]
<i>C. proliferans</i>	<i>Tachyoryctes splendens</i>	<i>Mus musculus</i> BALB/c (56)	10–12	23–28	1×10 <sup>6</sup>	[20]
<i>C. muris</i> MCR	<i>Mus musculus</i>	<i>Ovis aries</i> (1–20)	28–35	16–38	2×10 <sup>7</sup>	[44]
<i>C. muris</i> RN66	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Ovis aries</i> (21)	NI	NI	1×10 <sup>7</sup>	[22]
<i>C. muris</i> CB03	<i>Camelus bactrianus</i>	<i>Ovis aries</i> (21)	24	< 10	1×10 <sup>7</sup>	[22]
<i>C. andersoni</i> LI03	<i>Bos taurus</i>	<i>Ovis aries</i> (21)	NI	NI	1×10 <sup>7</sup>	[22]
<i>C. proliferans</i>	<i>Tachyoryctes splendens</i>	<i>Ovis aries</i> (21)	NI	NI	1×10 <sup>7</sup>	[22]
<i>C. muris</i> MCR	<i>Mus musculus</i>	<i>Capra hircus</i> (1–20)	19–35	34–85	2×10 <sup>7</sup>	[44]
<i>C. muris</i> RN66	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Capra hircus</i> (21)	NI	NI	1×10 <sup>7</sup>	[22]
<i>C. muris</i> CB03	<i>Camelus bactrianus</i>	<i>Capra hircus</i> (21)	28	20–60	1×10 <sup>7</sup>	[22]
<i>C. andersoni</i> LI03	<i>Bos taurus</i>	<i>Capra hircus</i> (21)	NI	NI	1×10 <sup>7</sup>	[22]
<i>C. proliferans</i>	<i>Tachyoryctes splendens</i>	<i>Capra hircus</i> (21)	NI	NI	1×10 <sup>7</sup>	[22]
<i>C. muris</i> RN66	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mus musculus</i> SCID (28)	6	> 28	1×10 <sup>6</sup>	[35]
<i>C. muris</i> CB03	<i>Camelus bactrianus</i>	<i>Mus musculus</i> SCID (56)	7	> 60	1×10 <sup>6</sup>	Unpublished data
<i>C. andersoni</i> LI03	<i>Bos taurus</i>	<i>Mus musculus</i> SCID (56)	NI	NI	1×10 <sup>6</sup>	[22]
<i>C. andersoni</i> Kawatabi	<i>Bos taurus</i>	<i>Mus musculus</i> SCID (28)	14	> 28	1×10 <sup>6</sup>	[35]
<i>C. proliferans</i>	<i>Tachyoryctes splendens</i>	<i>Mus musculus</i> SCID (56)	12–18	> 60	1×10 <sup>6</sup>	[20]
<i>C. muris</i> CB03	<i>Camelus bactrianus</i>	<i>Lasiopodomys brandtii</i>	14	14–32	1×10 <sup>6</sup>	[24]
<i>C. andersoni</i> LI03	<i>Bos taurus</i>	<i>Lasiopodomys brandtii</i>	NI	NI	1×10 <sup>6</sup>	[24]
<i>C. proliferans</i>	<i>Tachyoryctes splendens</i>	<i>Lasiopodomys brandtii</i>	14	> 40	1×10 <sup>6</sup>	[24]
<i>C. muris</i> RN66	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mastomys coucha</i> (56)	7–8	38–56	1×10 <sup>6</sup>	Unpublished data
<i>C. muris</i> CB03	<i>Camelus bactrianus</i>	<i>Mastomys coucha</i> (56)	8–10	51–76	1×10 <sup>6</sup>	Unpublished data
<i>C. andersoni</i> LI03	<i>Bos taurus</i>	<i>Mastomys coucha</i> (56)	20	46–59	1×10 <sup>6</sup>	[64]
<i>C. proliferans</i>	<i>Tachyoryctes splendens</i>	<i>Mastomys coucha</i> (56)	15–20	> 140	1×10 <sup>6</sup>	This study
<i>C. muris</i> HZ206	<i>Mus musculus</i>	<i>Mastomys coucha</i> (56)	6–8	48–77	1×10 <sup>6</sup>	This study
<i>C. andersoni</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Meriones unguiculatus</i> (56)	15–19	18–65	1×10 <sup>6</sup>	[30]
<i>C. proliferans</i>	<i>Tachyoryctes splendens</i>	<i>Meriones unguiculatus</i> (56)	18–22	> 90	1×10 <sup>6</sup>	[21]

NI—non infectious

doi:10.1371/journal.pone.0147090.t002

## Oocyst morphology

Oocysts were examined using differential interference contrast (DIC) microscopy following ACMV and Auramine Phenol (AP) staining [69], or fluorescence microscopy following labeling with genus-specific FITC-conjugated antibodies (*Cryptosporidium* IF Test, Crypto cel, Medac) (Olympus IX70 microscope; Olympus CZ, Czech Republic). Morphology and morphometry were determined using digital analysis of images (M.I.C. Quick Photo Pro v.3.0 software; Optical Service, Czech Republic) collected using an Olympus Digital Colour Camera DP73 (17.29 megapixels). A 20- $\mu$ l aliquot containing  $10^5$  purified oocysts was examined for each measurement. Length and width of oocysts ( $n = 100$ ) were measured under DIC at 1000 $\times$  magnification, and these were used to calculate the shape index and length-to-width ratio of each oocyst. As a control, the morphometry of *C. parvum* ( $n = 100$ ) from a naturally infected 23-day-old Holstein calf, and *C. muris* HZ206 ( $n = 100$ ) were measured. Photomicrographs of *C. proliferans* oocysts observed by DIC, ACMV, AP and IFA were deposited as a phototype at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

## DNA extraction and molecular analyses

Total DNA was extracted from 200 mg of feces,  $10^5$  purified oocysts, or 200 mg of tissue by bead disruption for 60 s at 5.5 m/s using 0.5 mm glass beads in a FastPrep<sup>®</sup>24 Instrument (MP Biomedicals, CA, USA) followed by isolation/purification using a commercially available kit in accordance with the manufacturer's instructions (QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit or DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Purified DNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to being used for PCR. A nested PCR approach was used to amplify  $\sim 830$  bp of the small ribosomal subunit (SSU) gene [70, 71],  $\sim 1066$  bp of the actin gene [72], and four previously described minisatellite genes—MS1 (encoding a hypothetical protein), MS2 (encoding a 90-kDa heat shock protein), MS3 (encoding a hypothetical protein), and MS16 (encoding a leucine-rich repeat family protein) [19]. Both primary and secondary PCR reactions were carried out in a volume of 50  $\mu$ l; the primary reaction contained 2  $\mu$ l of genomic DNA (or water as a negative control) and the secondary reaction contained 2  $\mu$ l of the primary reaction as template. In addition, primers for nested PCR to amplify Thrombospondin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1;  $\sim 955$  bp), *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein ( $\sim 400$  bp), and Heat shock protein (HSP70;  $\sim 515$  bp) were designed for this study using PrimerQuest online software (IDT, <http://www.idtdna.com/>) and tested by software Serial Cloner v 2.6.1. ([http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)). Primers amplifying TRAP-C1 were designed using the *C. muris* sequence in GenBank (CMU\_020100). The primers for primary reactions were TRAP-G-F1 (GGA GAT CCT TTA TGT GTT G) and TRAP-G-R1 (CCT GTA CAA ATT CTT CTG AT) and secondary reaction TRAP-G-F2 (GCT CAG AAG ATC CAA GTA) and TRAP-G-R2 (GAT TGC TCT GAA CTA GGA). Primers amplifying HSP70 gene were designed using the *C. muris* sequence in GenBank (CMU\_009950). The primers for primary reactions were HSPAvA1-F (GCT CGT GGT CCT AAA GAT AA) and HSPAvA1-R (ACG GGT TGA ACC ACC TAC TAA T) and secondary reaction HSPAvA2-F (ACA GTT CCT GCC TAT TTC A) and HSPAvA2-R (GCT AAT GTA CCA CGG AAA TAA). Primers amplifying the COWP gene were designed using the consensus of sequences in GenBank (B471649, AB471650, KF747672, DQ989571, DQ989570, DQ060431, KF419210, AF266275, AF161580, DQ060430, AF266262, AY282693, AF161579, AF266264, AB514044, AB514043, AY643491, AB089289, and AB089287). The primers for primary reactions were COWP-torto-F1 (GAA TGT CCT CCT GGG ACT GTA) and COWP-torto-R1 (AGT TCC TGG TGG ACA TAC TG) and secondary reaction COWP-torto-F2 (TCC TCC TGG GAC TGT ATT GGA) and COWP-torto-R2 (GGT GGA CAT ACT GGT TGT GTT G). The primary PCR reactions, for

TRAP-C1, HSP70, and COWP genes, were carried out in a volume of 50  $\mu$ l containing 2  $\mu$ l of DNA template (or water as a negative control), 1 $\times$ PCR buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs, 0.2  $\mu$ M of each primer, and 1.5 U of Taq DNA polymerase (Top Bio, Czech Republic). Secondary reactions were carried out under similar conditions with 2  $\mu$ l of primary product used as template. PCRs were run in a thermo cycler with an initial denaturation of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 45 s, 55°C (TRAP-C1), 50°C (HSP70 and COWP) for 45 s, 72°C for 1 min. A final elongation step of 72°C for 10 min was included to ensure complete extension of amplified products. Conditions were the same for both primary and secondary reactions. DNA of *C. andersoni* was used as positive control. Secondary PCR products were detected by agarose gel (2.0%) electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining (0.2  $\mu$ g/ml) and extracted using QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Purified secondary products were sequenced in both directions with an ABI 3130 genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the secondary PCR primers and the BigDye1 Terminator V3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, California) in 10  $\mu$ l reactions. Amplification and sequencing of each locus was repeated three times.

## Phylogenetic analyses

The nucleotide sequences of each gene obtained in this study were edited using the ChromasPro 1.7.5 software (Technelysium, Pty, Ltd.), manually edited, and aligned with each other and with reference sequences from GenBank using MAFFT version 7 online server with automatic selection of alignment mode (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Phylogenetic analyses were performed and best DNA/Protein phylogeny models were selected using the MEGA6 software [73, 74]. Phylogenetic trees were inferred by the **i**) neighbor-joining (NJ), **ii**) maximum likelihood (ML), and **iii**) maximum parsimony (MP) method. Bootstrap support for branching was based on 1000 replications. Neighbor-joining phylograms were edited for style using CorelDrawX7. Sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers KR090615-KR090632 and KT731193-KT731212.

## Transmission studies

**Animals.** The infectivity and pathogenicity of *C. proliferans* for the eight-week-old southern multimammate mice (*Mastomys coucha*), and adult budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) (Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic) was determined experimentally in this study. The infectivity of *C. proliferans* for SCID and BALB/c mice, gerbils, calves, kids, and lambs to *C. proliferans* (previously named *C. muris* strain TS03) was determined previously (Table 2) [21, 22, 25].

**Experimental design.** To prevent environmental contamination with oocysts, southern multimammate mice were housed in plastic cages with sterilized wood-chip bedding situated in flexible film isolators (BEM, Znojmo, Czech Republic) with high-efficiency particulate air filters. Birds were kept in cages placed in a room separated from other animals. The southern multimammate mice and budgerigars were supplied with a standard sterilized diet for rodents and birds, respectively, and sterilized water *ad libitum*. For three week prior to infection, fecal samples from all animals were screened daily for the presence of *Cryptosporidium* spp. using parasitological and molecular tools as described in previous sections. Each animal was inoculated orally by stomach tube with 10<sup>6</sup> purified viable oocysts of each species (*C. proliferans* and *C. muris* HZ206) suspended in 200  $\mu$ l of distilled water. Each animal used as negative control was inoculated with 200  $\mu$ l of distilled water only. A total of nine budgerigars were used: three as negative controls, three infected with *C. proliferans*, and three infected with *C. muris* HZ206. Fecal samples from all experimental birds were collected daily and experiments were

terminated 30 days post infection (DPI). A total of 94 southern multimammate mice were divided into three groups: i) control group (n = 34), ii) group infected with *C. muris* HZ206 (n = 30), and iii) group infected with *C. proliferans* (n = 30). All animals were weighed before the start of the experiment, with a precision of 0.1 g. Each animal was kept in separate cages. Fecal samples from all experimental southern multimammate mice were taken daily for the first 28 days, then every 7 days. Experiments were terminated 140 DPI. Animals were euthanized via cervical dislocation (according Law of the Czech Republic No. 419/2012 Sb.). Fecal samples from all experimental animals were stained by ACMV and the presence of *Cryptosporidium* specific DNA was confirmed using nested PCR targeting the SSU gene every 7 days. Every 28 days, 4 southern multimammate mice were sacrificed from each group, and each was examined for body weight, stomach size and weight, and the surface ratio of glandular to non-glandular parts of the stomach. Histopathological changes of gastric mucosa due to infection of *C. proliferans* and *C. muris* were evaluated using histological methods. Results were compared to uninfected animals, which were tested using the same procedures. Course of infection indicators, including fecal consistency, fecal color and infection intensity, were examined. Infection intensity was reported as the number of oocysts per gram (OPG) of feces as previously described [64].

**Clinical and histopathological examinations.** A complete examination of all gastrointestinal organs was conducted at necropsy. Tissue samples from the stomach, small intestine, and large intestine (the entire tract was divided into 1 cm sections) were processed for histology [75] and for PCR analyses (see Section 2.4.). Histology sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), Wolbach's modified Giemsa, Periodic Acid Schiff (PAS) stain, and genus-specific FITC conjugated monoclonal antibodies targeting *Cryptosporidium* oocyst wall antigens (*Cryptosporidium* IF Test, Crypto Cel, Medac).

## Animal care

Animal caretakers wore disposable coveralls, shoe covers, and gloves every time they entered the facility rooms. All wood-chip bedding, feces, and disposable protective clothing were sealed in plastic bags, removed from the buildings and incinerated. All housing, feeding, and experimental procedures were conducted under protocols approved by the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic and Institute and National Committees (Protocols No. 52/2014).

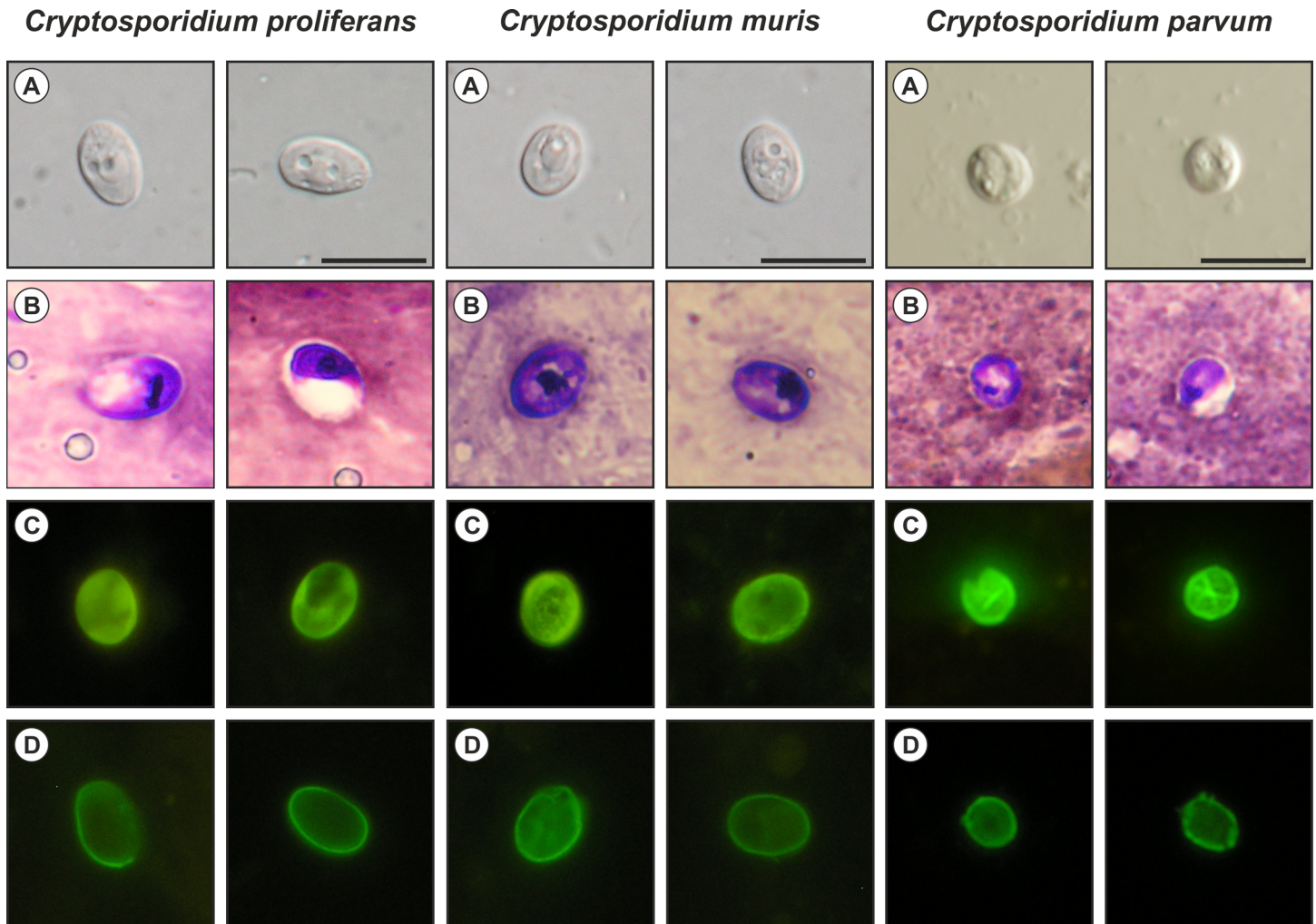
## Statistical analyses

The hypothesis tested in the analysis of oocyst morphometry and size of stomach was that two-dimensional mean vectors of measurement are the same in the two populations being compared. Hotelling's T<sup>2</sup> test was used to test the null hypothesis. The Bartlett test was used to test homoscedasticity of differences in the prepatent and patent periods of different infections.

## Results

### Oocyst morphology

Oocysts of *C. proliferans* measuring 6.8–8.8 (mean = 7.7  $\mu\text{m}$ )  $\times$  4.8–6.2  $\mu\text{m}$  (mean = 5.3) with a length to width ratio of 1.48 (n = 100) were significantly longer and narrower ( $p < 0.05$ ) than *C. muris* HZ206 oocysts, which measured 6.3–8.1 (mean = 7.5  $\mu\text{m}$ )  $\times$  5.0–6.6 (mean = 5.7  $\mu\text{m}$ ) with length to width ratio of 1.35 (n = 100). *Cryptosporidium parvum* oocysts were significantly smaller ( $p < 0.05$ ) than *C. proliferans* and *C. muris* HZ206, measuring 5.1–5.5 (mean = 5.3  $\mu\text{m}$ )  $\times$  4.6–5.2 (mean = 4.7  $\mu\text{m}$ ) with length to width ratio of 1.12 (1.07–1.32) (n = 100) (Fig 1A). Oocysts of *C. proliferans* recovered from experimentally infected mice were morphologically



**Fig 1. *Cryptosporidium proliferans*, *Cryptosporidium muris* HZ206, and *Cryptosporidium parvum* oocysts in (A) differential interference contrast microscopy and stained by (B) aniline-carbol-methyl violet (C) Auramine Phenol and (D) anti-*Cryptosporidium* FITC-conjugated antibody.** Bar = 10  $\mu$ m.

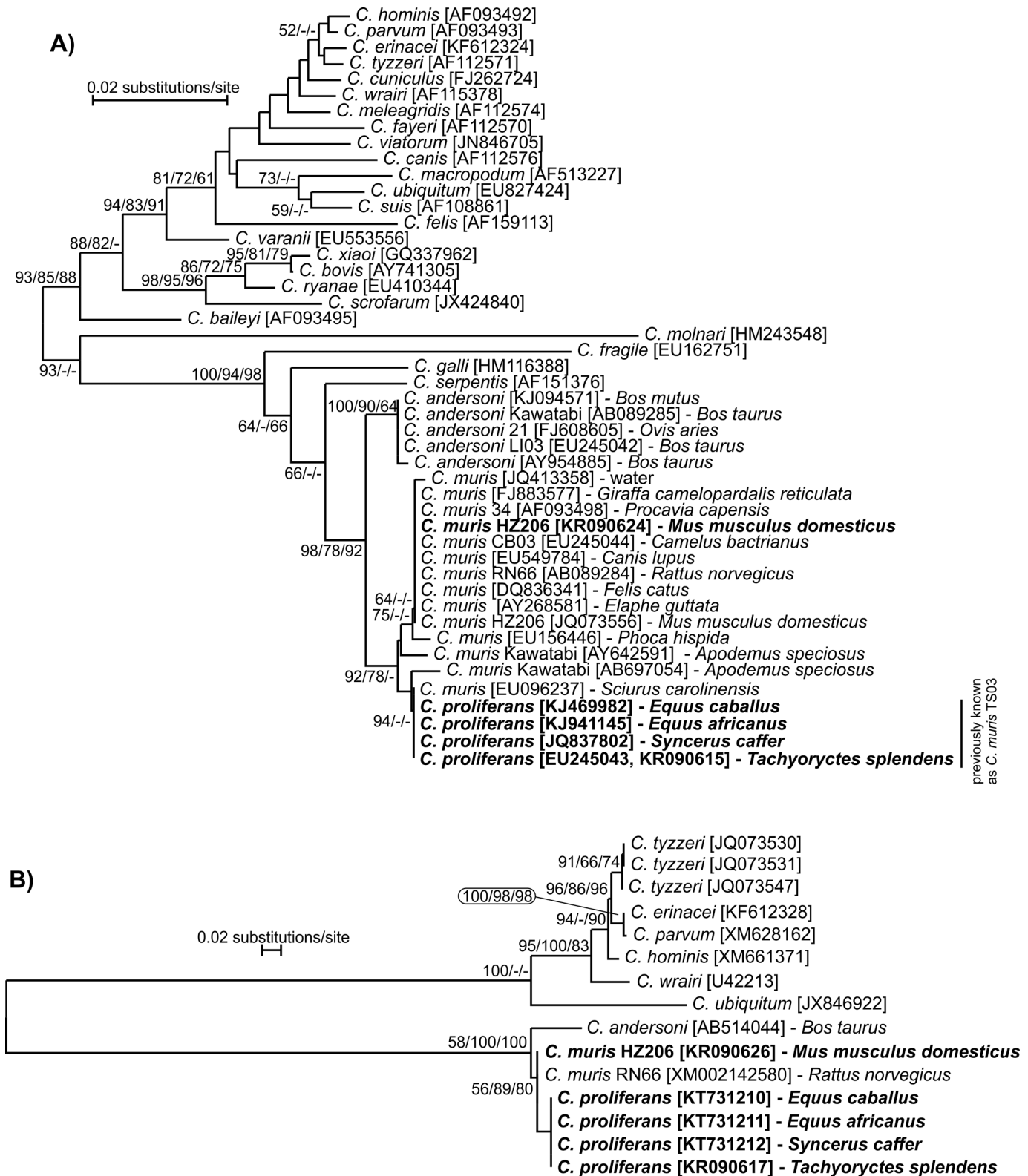
doi:10.1371/journal.pone.0147090.g001

similar to those used for infection. Oocysts in fecal smears showed typical *Cryptosporidium* ACMV and AP staining characteristics (Fig 1B and 1C). Fixed *C. proliferans* oocysts labeled with FITC conjugated anti-*Cryptosporidium* oocyst wall antibody and examined by epifluorescence microscopy displayed typical apple green, halo-like fluorescence (Fig 1D).

### Molecular characterization

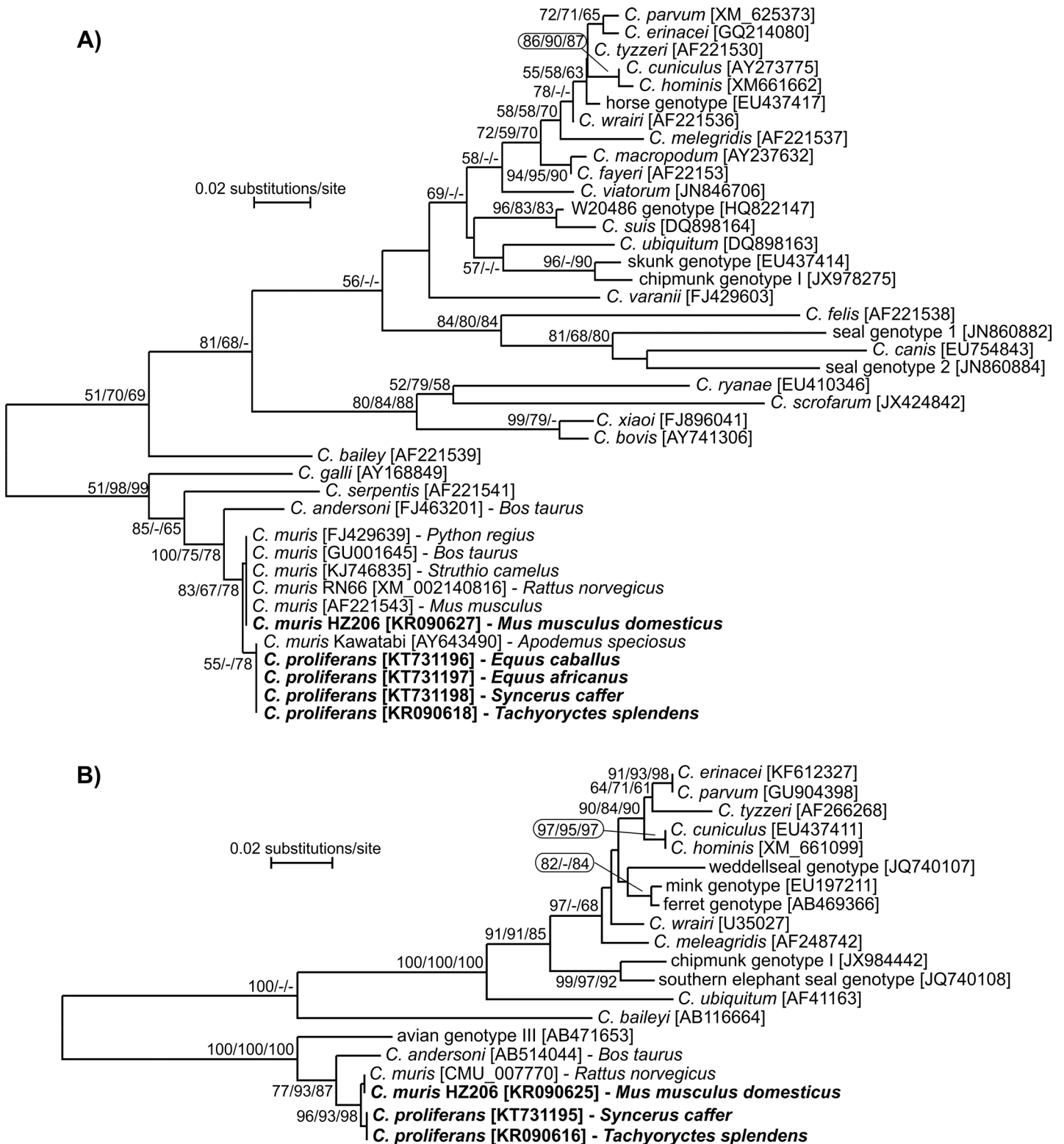
At the SSU locus, *C. proliferans* isolates from an East African mole rat, African buffalo, donkey, and domestic horse shared 100% identity with each other and with an isolate (EU096237) from an Eastern gray squirrel in the USA (Fig 2A). At the TRAP-C1 locus, isolates of *C. proliferans* from the four different hosts shared 100% identity with each other and differed from *C. muris* RN66 by five SNPs, two of which were non-synonymous (Fig 2B).

At the HSP70 locus, *C. proliferans* isolates from the four different hosts shared 100% identity with each other and with the *C. muris* Kawatabi isolate (AY643490) from *Apodemus speciosus* in Japan (Fig 3A), but differed from *C. muris* RN66 by a synonymous SNP.



**Fig 2. Phylogenetic relationships between *Cryptosporidium proliferans* (highlighted) and other *Cryptosporidium* spp. as inferred by a neighbor-joining analysis (NJ)/maximum parsimony(MP)/maximum likelihood (ML) of (A) the SSU (706 base positions in the final dataset; ML = log -2886.67) and (B) TRAP-C1 (531 base positions in the final dataset, ML = log -1929.25). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates). Numbers at the nodes represent bootstrap values for the nodes gaining more than 50% support. Scale bar included in each tree.**

doi:10.1371/journal.pone.0147090.g002



**Fig 3. Phylogenetic relationships between *Cryptosporidium proliferans* (highlighted) and other *Cryptosporidium* spp. as inferred by a neighbor-joining analysis (NJ)/maximum parsimony(MP)/maximum likelihood (ML) of (A) HSP70 (211 base positions in the final dataset, ML = log -1745.42) and (B) COWP (369 base positions in the final dataset, ML = log -532.78). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates). Numbers at the nodes represent bootstrap values for the nodes gaining more than 50% support. Scale bar included in each tree.**

doi:10.1371/journal.pone.0147090.g003

Isolates of *C. proliferans* from the East African mole rat and African Buffalo shared 100% identity at the COWP locus, and differed from *C. muris* RN66 (CMU\_007770) by a synonymous SNP (C/T) at position 597, using the *C. parvum* Iowa isolate as a reference sequence (Cgd6\_2090) (Fig 3B). *Cryptosporidium proliferans* COWP sequences were not obtained from donkey or domestic horse isolates.

At the actin locus, isolates from the East African mole rat, African buffalo, and donkey shared 100% identity with each other and differed from *C. muris* by four synonymous SNPs (Fig 4A). An actin sequence was not obtained from the domestic horse isolate.

*Cryptosporidium proliferans* isolates clustered separately from *C. muris* and *C. andersoni* at each of the four microsatellite loci examined. Three *C. proliferans* subtypes formed a single cluster at the MS1 locus: MS1-P1 was detected in isolates from the East African mole rat and African Buffalo; MS1-P2 and MS1-P3 were detected in the donkey and domestic horse, respectively (Fig 4B). A single *C. proliferans* subtype was detected at the MS2 (MS2-P1) and MS3 loci (MS3-P1) (Fig 5A and 5B). Similar to MS1, three *C. proliferans* subtypes formed a single cluster at the MS16 locus: MS16-P1 was detected in isolates from the East African mole rat and African Buffalo; MS16-P2 and MS16-P3 were detected in the domestic horse and donkey, respectively (Fig 5C).

In a tree constructed from concatenated sequences of SSU, actin, HSP70, and TRAP-C1, *C. proliferans* clustered separately from *C. muris* RN66, *C. muris* HZ206, *C. parvum*, *C. hominis*, and *C. meleagridis* (Fig 6).

## Experimental transmission studies

Oocysts used for experimental infections had >95% viability, determined by PI staining. Experimentally inoculated budgerigars did not produce microscopically detectable infection. Histological and molecular examination of gastrointestinal tract tissue from budgerigars did not reveal the presence of *Cryptosporidium* developmental stages.

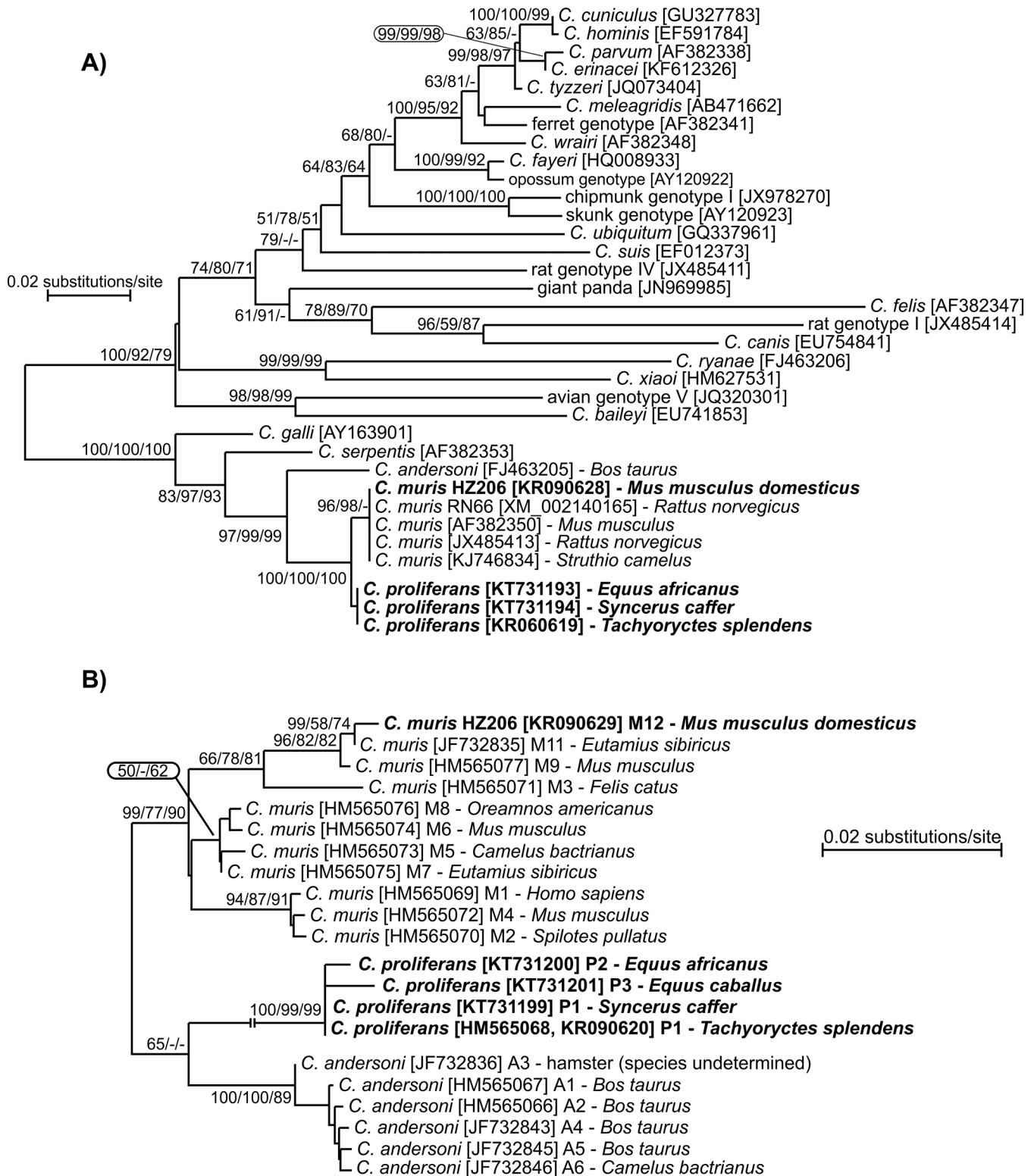
Both *C. proliferans* and *C. muris* HZ206 were infectious for southern multimammate mice. While southern multimammate mice began shedding *C. muris* HZ206 oocysts 6–8 DPI, *C. proliferans* shedding began significantly later at 18–21 DPI ( $p < 0.001$ ). PCR amplification of the *Cryptosporidium* SSU gene was unsuccessful from 2 to 5 DPI and 2 to 17 DPI in mice infected with *C. muris* HZ206 and *C. proliferans*, respectively.

*Cryptosporidium muris* HZ206 infection intensity ranged from  $2.0 \times 10^3$  to  $1.4 \times 10^5$  OPG, with maximum shedding at 42 DPI. Oocyst shedding intensity decreased from 42 DPI and microscopic detection was intermittent by 77 DPI, although specific DNA was present in feces throughout the patent period (Fig 7). *Cryptosporidium proliferans* infection intensity ranged from  $1.0 \times 10^5$  to  $9.5 \times 10^6$  OPG with maximum shedding at 126 DPI. In contrast to *C. muris* HZ206, the infection intensity continued to increase throughout the experiment (Fig 7). Southern multimammate mice experimentally infected with *C. proliferans* mostly developed lifelong infection (data not shown).

No clinical signs of cryptosporidiosis were detected in southern multimammate mice during the first 84 DPI with *C. proliferans*; however, these mice subsequently began to lose weight compared to time-matched mice in the *C. muris* HZ206 infection and uninfected control groups ( $p < 0.05$ ).

Histological examination of the glandular and non-glandular parts of the stomach in uninfected control mice showed no evidence of *Cryptosporidium* developmental stages, pathological alterations, or activation of glands. Also, mucus production was normal. Developmental stages were found only in the glandular part of the stomach of experimentally infected groups and high numbers were typically associated with high oocyst shedding. In *C. proliferans* positive





**Fig 4. Phylogenetic relationships between *Cryptosporidium proliferans* (highlighted) and other *Cryptosporidium* spp. as inferred by a neighbor-joining analysis (NJ)/maximum parsimony (MP)/maximum likelihood (ML) of (A) actin (728 base positions in the final dataset, ML = log = -5522.35) and (B) MS1 (436 base positions in the final dataset, ML = log = -886.75). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates). Numbers at the nodes represent bootstrap values for the nodes gaining more than 50% support. Interrupted branches have been shortened five-fold. Scale bar included in each tree.**

doi:10.1371/journal.pone.0147090.g004

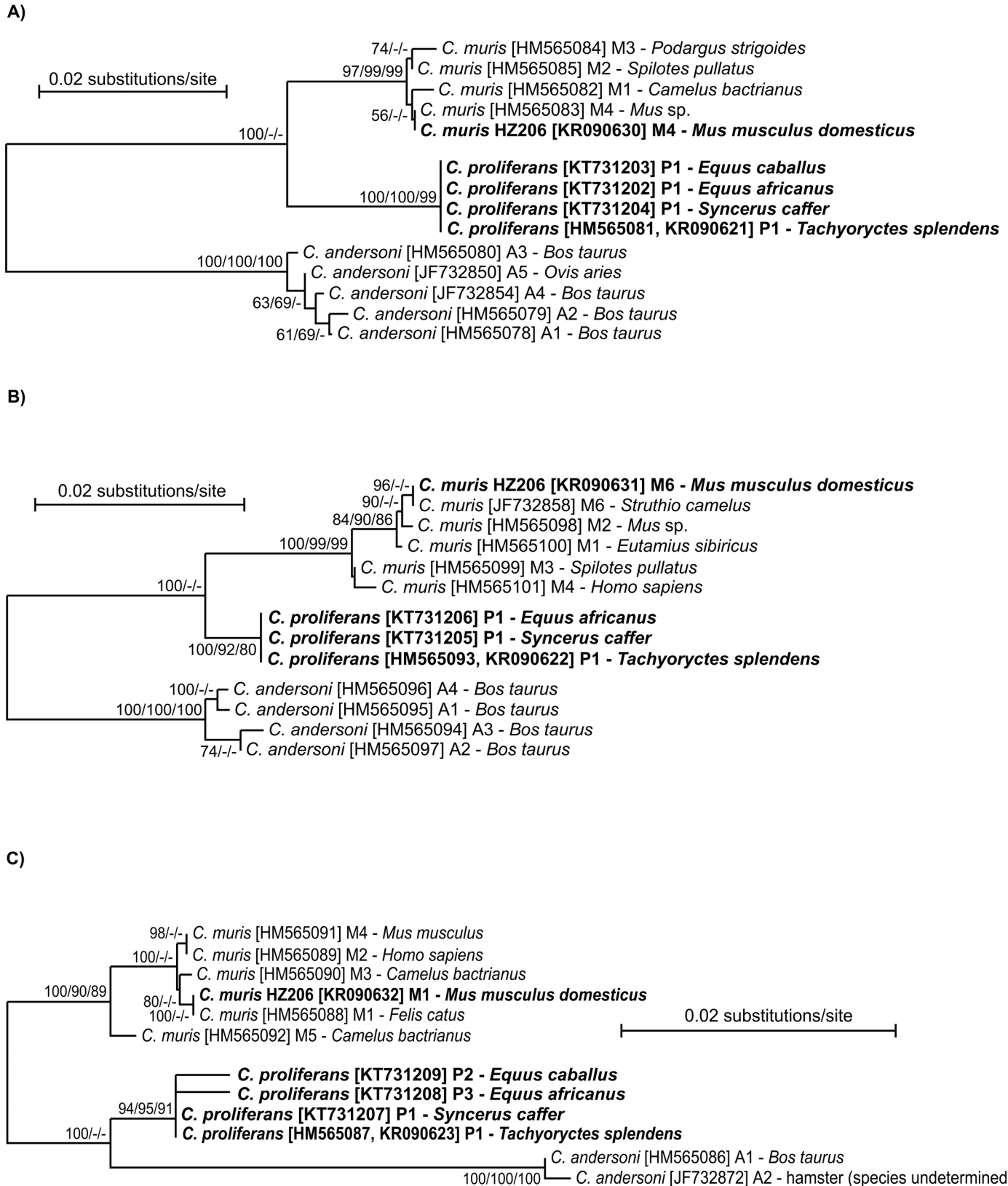


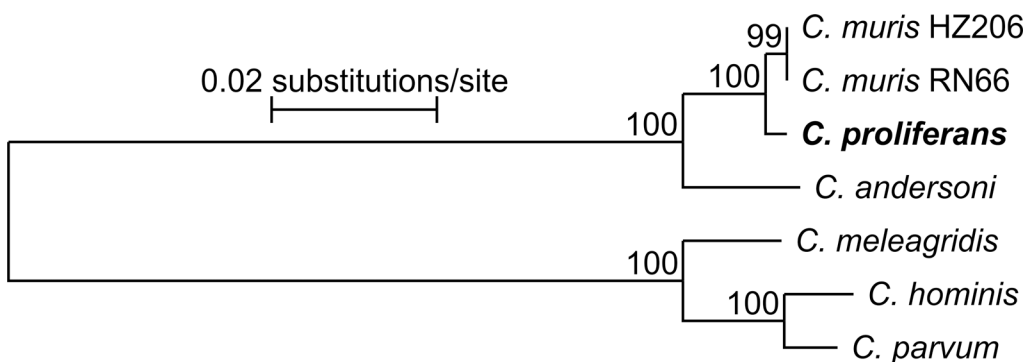
Fig 5. Phylogenetic relationships between *Cryptosporidium proliferans* (highlighted) and other *Cryptosporidium* spp. as inferred by a neighbor-joining analysis (NJ)/maximum parsimony (MP)/maximum likelihood (ML) of (A) MS2 (442 base positions in the final dataset, ML = log -792.33), (B)

**MS3 (485 base positions in the final dataset, ML = log = -832.45), and (C) MS16 (580 base positions in the final dataset, ML = log = -956.78).** The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates). Numbers at the nodes represent bootstrap values for the nodes gaining more than 50% support. Scale bar included in each tree.

doi:10.1371/journal.pone.0147090.g005

southern multimammate mice, infected glands were markedly dilated, and filled with necrotic material, mucus, and numerous development stages. Epithelial cells of infected glands were atrophic and exhibited cuboidal or squamous metaplasia. The epithelium also was significantly proliferated into the lumen of the stomach and formed papillary structures. Such proliferation was not observed in uninfected control and *C. muris* HZ206 infected southern multimammate mice (Fig 8).

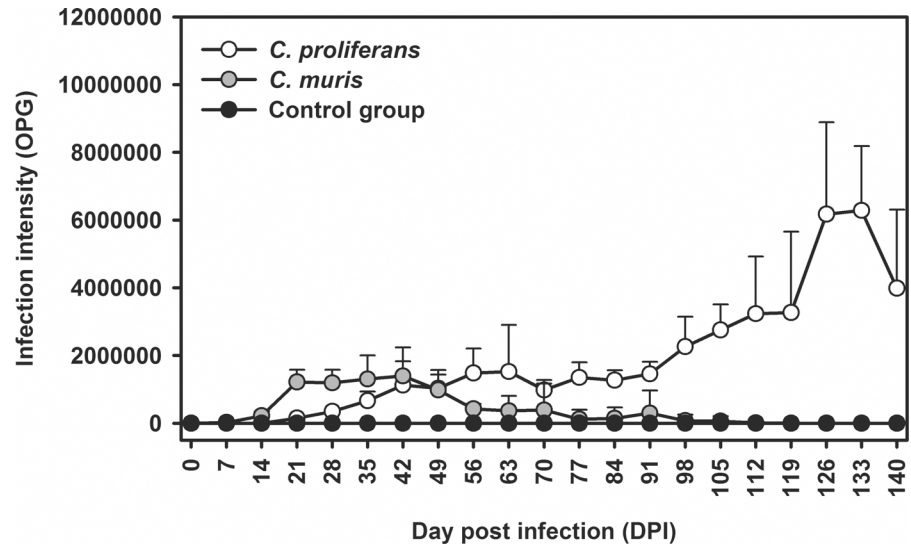
Macroscopically, the gastric mucosa of southern multimammate mice infected with *C. proliferans* had confluent cauliflower-shaped lesions (Fig 8D). The lamina propria did not contain any inflammatory infiltrates. The gastric mucosa of *C. muris* HZ206 infected southern multimammate mice was less hyperplastic without significant gain. Mucus production was similar to that in the uninfected control group and was significantly less than in *C. proliferans* infected southern multimammate mice. A gradual retreat of infection from the lower layers of the epithelium was observed in southern multimammate mice infected with *C. muris* from 56 DPI, and no developmental stages of *C. muris* HZ206 were detected from 112 DPI using histological methods. The total stomach weight in infected southern multimammate mice was increased compared to the negative control group. While the stomach weight of southern multimammate mice infected with *C. muris* HZ206 increased up to 1.5 fold, the stomach weight of mice infected with *C. proliferans* significantly increased up to 5.7 fold ( $p < 0.001$ ; Fig 9). The proliferating mucosa was the major contributor to the increase in stomach weight, while the submucosa, muscularis, and serosa did not significantly change in any group ( $p > 0.05$ ). The mucosa from *C. proliferans* and *C. muris* infections increased 5.6 and 1.6 fold, respectively compared to



Taxa	<i>C. pro</i>	HZ206	RN66	<i>C. and</i>	<i>C. par</i>	<i>C. hom</i>	<i>C. mel</i>
<i>C. proliferatum</i>	0.0000						
<i>C. muris</i> HZ206	0.0035	0.0000					
<i>C. muris</i> RN66	0.0035	0.0000	0.0000				
<i>C. andersoni</i>	0.0225	0.0231	0.0231	0.0000			
<i>C. parvum</i>	0.1873	0.1886	0.1886	0.1888	0.0000		
<i>C. hominis</i>	0.1887	0.1900	0.1900	0.1936	0.0128	0.0000	
<i>C. meleagridis</i>	0.1800	0.1805	0.1805	0.1806	0.0278	0.0273	0.0000

**Fig 6. Phylogenetic relationships between *Cryptosporidium proliferans* and selected *Cryptosporidium* spp. as inferred by a neighbor-joining analysis (NJ)/maximum parsimony (MP)/maximum likelihood (ML) analysis of a concatenated sequence constructed from partial DNA sequences of SSU, actin, COWP, HSP70, and TRAP-C1 genes (1991 base positions in the final dataset, ML = log = -4368.98).** The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates). Numbers at the nodes represent bootstrap values for the nodes gaining more than 50% support. Scale bar included in tree.

doi:10.1371/journal.pone.0147090.g006



**Fig 7. Course of infection of *Cryptosporidium proliferans* and *Cryptosporidium muris* HZ206 in *Mastomys coucha* based on coprological examination of feces.**

doi:10.1371/journal.pone.0147090.g007

the uninfected control group ( $p < 0.001$ ). In addition, the ratio of glandular to non-glandular surfaces changed from 55:45 to 80:20 in southern multimammate mice infected with *C. proliferans*. This change was not observed in uninfected control and *C. muris* HZ206 infected southern multimammate mice (data not shown).

### Taxonomic summary of *Cryptosporidium proliferans* n. sp.

**Diagnosis.** Oocysts are shed fully sporulated. Sporulated oocysts 6.8–8.8 (mean = 7.7  $\mu\text{m}$ )  $\times$  4.8–6.2  $\mu\text{m}$  (mean = 5.3) with a length to width ratio of 1.48. Four sporozoites and residual body are present in each oocyst. The lifecycle of *C. proliferans*, including the description of endogenous stages, was described previously [23].

**Type host.** *Tachyoryctes splendens* (Rüppell, 1835).

**Other natural hosts.** *Equus africanus* (Fitzinger, 1857), donkey [53]; *Sciurus carolinensis* Gmelin, 1788, eastern gray squirrel [38]; *Syncerus caffer* (Sparrman, 1779), African buffalo [52]; *Equus caballus* Linnaeus, 1758, horse (unpublished, and this study).

**Experimental host.** *Mastomys coucha* (Smith, 1836), southern multimammate mouse; *Mastomys natalensis* (Smith, 1834), natal multimammate mouse; *Meriones unguiculatus* (Milne-Edwards, 1867), Mongolian gerbil; *Lasiopodomys brandtii* (Radde, 1861), Brandt's vole; *Mus musculus* Linnaeus, 1758, house mouse (strain BALB/c and SCID) [15, 22, 24, 25].

Prepatent and patent period of *C. proliferans* in model hosts are presented in Table 3.

**Type locality.** Kakamega, Kenya

**Site of infection.** stomach, specifically the glandular part

**Material deposited.** A phototype, description of oocysts, and DNA are deposited at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

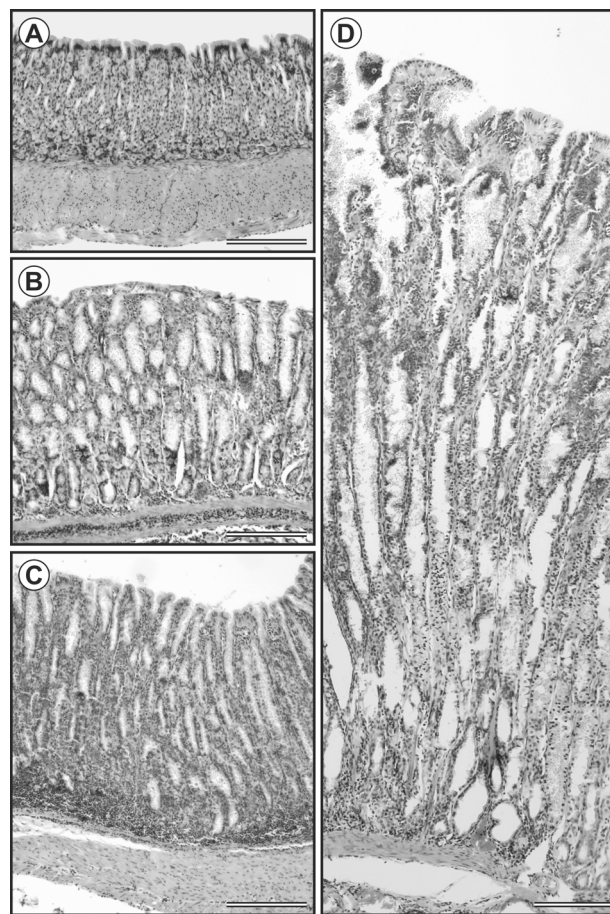
**DNA sequences.** Partial sequences of SSU, actin, COWP, HSP70, TRAP-C1, MS1, MS2, MS3, and MS16 genes were submitted to GenBank under the accession numbers KR090615–KR090623 and KT731193–KT731212.

**Etymology.** The species name *proliferans* is derived from the Latin substantive “proliferatio” (meaning a proliferation) according to ICZN Article 11.9.1–3, as it appears to cause a proliferation of mucosa in infected stomach.

## Discussion

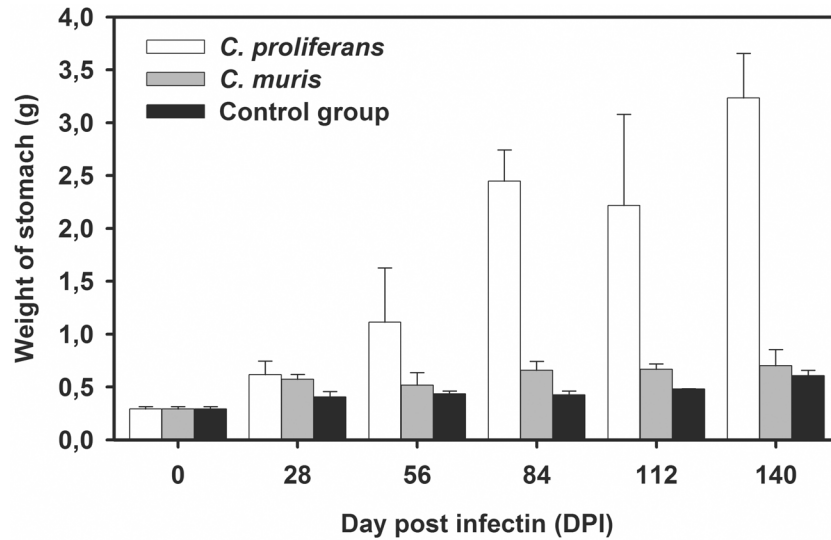
The gastric species *C. muris* and intestinal species *C. parvum* were the first described *Cryptosporidium* species [3, 76]. Until the late 1990s, many intestinal *Cryptosporidium* spp. were regarded as subtypes of *C. parvum*; for example, *C. hominis* was known as *C. parvum* genotype I and *C. canis* as *C. parvum* canine genotype [77, 78]. Recognition of the subtypes as separate species was made possible by studies showing molecular and biological differences from *C. parvum*. In cases where only molecular differences are described, isolates are regarded as distinct genotypes rather than subtypes of *C. parvum*; for example, *Cryptosporidium* rat genotype I-IV [79–82]. Also, *C. andersoni* (previously known as *C. muris*-like) was separated from *C. muris* *senso lato* based on molecular and biological differences [4]. A number of reports over the past 15 years indicate the presence of cryptic species within the mammalian gastric *Cryptosporidium* group, but evidence to support the naming of a new species has thus far been lacking (see Tables 1 and 2 for references).

Although *C. muris* and *C. andersoni* are primarily rodent- and ruminant specific, respectively, there have been reports of *C. muris* in ruminants and *C. andersoni* in rodents (Table 1). Similarly, *C. proliferans* has been found in hosts belonging to the Rodentia, Arctiodactyla, and Perissodactyla. With the exception of the occurrence of *C. proliferans* in squirrels in the US, all the other isolates have been detected in animals in Africa [22, 38, 52] and Europe (this study).



**Fig 8. Height of mucosa of *Mastomys coucha* stomach of A) control group, B) *Cryptosporidium muris* HZ206 infection, and C) *Cryptosporidium proliferans* infection at 28 day post infection; D) stomach mucosa proliferation in *Mastomys coucha* with *Cryptosporidium proliferans* at 140 DPI. Haematoxylin and eosin. Bar = 150  $\mu$ m.**

doi:10.1371/journal.pone.0147090.g008



**Fig 9. Change of stomach weight of *Mastomys coucha* during experimental infection with *Cryptosporidium proliferans* and *Cryptosporidium muris* HZ206 compared to the control group.**

doi:10.1371/journal.pone.0147090.g009

The present study and a previous study [83] have shown that *Cryptosporidium proliferans* oocysts (7.7 × 5.3 μm) are longer and narrower than those of *C. muris* HZ206 (7.5 × 5.7 μm) and *C. andersoni* (7.6 × 5.5 μm). We have seen no change in the size of the oocysts during more than 10 years of oocyst passage through different hosts (data not shown). However, because the reported size of *C. andersoni* and *C. muris* oocysts is quite variable [4, 26, 28], oocyst morphology cannot be used to reliably distinguish these species from *C. proliferans*. The shape and size of *C. proliferans* is also significantly different from oocysts of intestinal species such *C. xiaoi* (3.94 × 3.44 μm), *C. parvum* (5.3 × 4.7 μm) or *C. suis* (6.2 × 5.5 μm) [84, 85].

Phylogenetic analyses based on SSU, COWP, TRAP-C1, HSP70, actin, MS1, MS2, MS3, and MS16 gene sequences have shown that *C. proliferans* is genetically distinct from known *Cryptosporidium* species. At the SSU locus, *C. proliferans* is 99.4% and 98.3%, similar to *C. muris* and *C. andersoni*, respectively. This is comparable to the similarities between *C. hominis* and *C. cuniculus* (98.9%), *C. parvum* and *C. erinacei* (99.5%), and *C. bovis* and *C. xiaoi* (99.5%). At the COWP locus, *C. proliferans* is 99.7% and 97.8% similar to *C. muris* RN66 and *C. andersoni*, respectively. Other closely related *Cryptosporidium* species, including *C. erinacei* and *C. parvum* and *C. cuniculus* and *C. hominis*, are identical at the COWP locus [86, 87]. At the TRAP-C1 locus, *C. proliferans* is 99.0% and 95.6% similar to *C. muris* RN66 and *C. andersoni*, respectively. In comparison, *C. parvum* and *C. erinacei* are 99.8% similar at the TRAP-C1 locus [86, 88]. At the HSP70 locus, *C. proliferans* is 99.5% and 97.1% similar to *C. muris* RN66 and *C. andersoni*, respectively. In comparison, *C. parvum* and *C. erinacei* are 99.0% similar at this locus. *Cryptosporidium proliferans* is identical to the *C. muris* Kawatabi isolate (AY643490) at

**Table 3. Prepatent and patent period of *Cryptosporidium proliferans* in various hosts.**

Host	Prepatent period (DPI)	Patent period (DPI)	Reference
southern multimammate mouse	15–21	> 140	This study; [24]
laboratory mouse	6–8	up to 30	[25]
gerbils	18–22	> 90	[21]
voles	14	> 40	[24]

doi:10.1371/journal.pone.0147090.t003

the HSP70 locus [89]. The *C. muris* Kawatabi isolate also clusters with *C. proliferans* at the SSU locus, suggesting that these could be the same species. Further genetic and biological characterization of the Kawatabi isolate would be required to test this. At the actin locus, *C. proliferans* is 99.4% similar to *C. muris* RN66. In comparison, *C. parvum* and *C. erinacei* share 99.5% similarity at this locus. *Cryptosporidium proliferans* also is distinguishable from *C. muris* and *C. andersoni* at four minisatellite loci examined in this study. It was previously found that *C. muris* isolates RN66 and CB03 were identical to *C. proliferans* (*C. muris* TS03 in their study) at the SSU and minisatellite loci [19]. RN66, a commercially supplied reference strain (Waterborne Inc, LA), has been well characterized and the whole genome sequence is known. Multiple studies have shown that the SSU sequence of this strain differs from that of *C. proliferans* (TS03). Similarly, previous studies have shown that CB03 is identical to RN66, and different from TS03, at the SSU locus [22, 25]. Therefore, Feng et al. acknowledged that their finding was likely the result of cross contamination during isolate handling [19].

The prepatent period for *C. proliferans* infection in SCID mice, which lack T- and B-cell immunity, ranged from 12–18 DPI with a mean of 14 DPI [20]. This is similar to the prepatent period for *C. andersoni* Kawatabi (14 DPI) and longer than the prepatent periods for *C. muris* RN66 (6 DPI) and *C. muris* CB03 (7 DPI; unpublished) in SCID mice [35]. In a study on *C. muris* RN66 infection in nude mice, which specifically lack T-cell immunity [90], a 10 DPI prepatent period was reported following a dose of 1 million oocysts, the dose used in the present study. Longer prepatent periods were observed only with lower doses of 20,000 oocysts (15–18 DPI) and 400 oocysts (16 DPI). Similarly, a prepatent period of 10 DPI was observed in both outbred nude and SCID mice infected with 500,000 oocysts of *C. muris* RN66 [91]. Consistent with observations in immunocompromised mice, the prepatent period for *C. proliferans* (15–20 DPI) in immunocompetent southern multimammate mice is similar to that for *C. andersoni* (20 DPI), and longer than that for *C. muris* (6–10 DPI). Collectively, these data support the conclusion that *C. proliferans* has a longer prepatent period than *C. muris* in mice.

*Cryptosporidium proliferans* develops exclusively in the glandular part of the stomach, similar to *C. muris* and *C. andersoni* [4, 47, 75, 92], and its lifecycle [23] is similar to that of *C. muris* [93].

The clinical course of *C. proliferans* infection in immunocompetent southern multimammate mice is considerably different to that of *C. muris*. These mice shed oocysts of *C. proliferans* for much longer and at a greater intensity than oocysts of *C. muris*, and only the *C. proliferans* infection causes significant clinical and pathological changes, including weight loss and massive proliferation of the gastric mucosa that is associated with an almost 6-fold increase in stomach weight. Although gastric cryptosporidia rarely induce clinical symptoms in mammals [37, 75, 92, 94], *C. andersoni* infection in cattle has caused up to a three-fold increase in abomasum weight, decreased milk production, and loss of body condition [40, 95]. *Cryptosporidium andersoni* also causes a lifelong infection in cattle and mice [4, 22, 96], similar to *C. proliferans* in multimammate mice.

Consistent with most previous studies on *C. muris* and *C. andersoni*, infiltrates in propria of the mucosa are absent in animals infected with *C. proliferans* [22, 29, 37, 75, 92–94].

In conclusion, molecular and biological data support the establishment of *C. muris* TS03 as a new species and we propose the name *Cryptosporidium proliferans*.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MK BS JM LH NH. Performed the experiments: MK BS NH LH TD JK JJ JC. Analyzed the data: MK JM YO LX DM JV VP. Contributed reagents/materials/analysis tools: MK JV BS YO LX DM JM VP. Wrote the paper: MK BS JM YO LX DM.

## References

1. O'Donoghue PJ. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol.* 1995; 25(2):139–95. Epub 1995/02/01. PMID: [7622324](#).
2. Fayer R. General Biology. In: Fayer R, Xiao L, editors. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2 ed: CRC Press, Boca Raton, FL; 2007. p. 1–42.
3. Tyzzer EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1907; 5:12.
4. Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol.* 2000; 47(1):91–5. Epub 2000/01/29. PMID: [10651302](#).
5. Upton SJ, McAllister CT, Freed PS, Barnard SM. *Cryptosporidium* spp. in wild and captive reptiles. *J Wildl Dis.* 1989; 25(1):20–30. Epub 1989/01/01. PMID: [2915400](#).
6. Morgan UM, Sargent KD, Deplazes P, Forbes DA, Spano F, Hertzberg H, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology.* 1998;117 31–7. Epub 1998/08/08. PMID: [9695098](#).
7. Morgan UM, Xiao L, Fayer R, Graczyk TK, Lal AA, Deplazes P, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from captive reptiles using 18S rDNA sequence data and random amplified polymorphic DNA analysis. *J Parasitol.* 1999; 85(3):525–30. Epub 1999/07/01. PMID: [10386447](#).
8. Traversa D, Iorio R, Otranto D, Modrý D, Šlapeta J. *Cryptosporidium* from tortoises: Genetic characterization, phylogeny and zoonotic implications. *Mol Cell Probes.* 2008; 22(2):122–8. Epub 2008/02/01. doi: [10.1016/j.mcp.2007.11.001](#) PMID: [18234467](#).
9. Ng J, Pavlásek I, Ryan U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(12):7548–53. doi: [10.1128/AEM.01352-06](#) PMID: [17028234](#); PubMed Central PMCID: PMC1694252.
10. Xiao L, Ryan UM, Graczyk TK, Limor J, Li L, Kombert M, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(2):891–9. Epub 2004/02/10. PMID: [14766569](#); PubMed Central PMCID: PMC1694252.
11. Graczyk TK, Fayer R, Cranfield MR. *Cryptosporidium parvum* is not transmissible to fish, amphibians, or reptiles. *J Parasitol.* 1996; 82(5):748–51. PMID: [8885883](#).
12. Crawshaw GJ, Mehren KG. Cryptosporidiosis in zoo and wild animals. *Erkrankungen der Zootiere Verhandlungsbericht des 29 Internationalen Symposiums Über die Erkrankungen der Zootiere*; Cardiff: Akademie-Verlag, Berlin; 1987. p. 353–62.
13. Jenkins MB, Liotta JL, Lucio-Forster A, Bowman DD. Concentrations, viability, and distribution of *Cryptosporidium* genotypes in lagoons of swine facilities in the Southern Piedmont and in coastal plain watersheds of Georgia. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(17):5757–63. doi: [10.1128/AEM.00434-10](#) PMID: [20639363](#); PubMed Central PMCID: PMC2935074.
14. Xiao L, Moore JE, Ukoh U, Gatei W, Lowery CJ, Murphy TM, et al. Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(6):4461–3. Epub 2006/06/06. doi: [10.1128/AEM.00370-06](#) PMID: [16751569](#); PubMed Central PMCID: PMC1489634.
15. Kváč M, Hanzlíková D, Sak B, Květoňová D. Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. *Vet Parasitol.* 2009; 160(3–4):319–22. Epub 2008/12/19. doi: [10.1016/j.vetpar.2008.11.007](#) PMID: [19091471](#).
16. Kváč M, Kestřánová M, Květoňová D, Kotková M, Ortega Y, McEvoy J, et al. *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Exp Parasitol.* 2012; 131(1):107–10. Epub 2012/04/03. doi: [10.1016/j.exppara.2012.03.016](#) PMID: [22465334](#).
17. Hikosaka K, Nakai Y. A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Parasitol Res.* 2005; 97(5):373–9. doi: [10.1007/s00436-005-1459-7](#) PMID: [16151744](#).
18. Murakoshi F, Fukuda Y, Matsubara R, Kato Y, Sato R, Sasaki T, et al. Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Vet Parasitol.* 2013; 196(1–2):184–8. doi: [10.1016/j.vetpar.2013.02.011](#) PMID: [23601844](#).
19. Feng Y, Yang W, Ryan U, Zhang L, Kváč M, Koudela B, et al. Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(1):34–41. doi: [10.1128/JCM.01329-10](#) PMID: [20980577](#); PubMed Central PMCID: PMC3020410.
20. Kváč M, Kodádková A, Sak B, Květoňová D, Jalovecká M, Rost M, et al. Activated CD8+ T cells contribute to clearance of gastric *Cryptosporidium muris* infections. *Parasite Immunol.* 2011; 33(4):210–6. doi: [10.1111/j.1365-3024.2010.01271.x](#) PMID: [21204850](#).



21. Kváč M, Sak B, Květoňová D, Secor WE. Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet Parasitol.* 2009; 163(1–2):33–8. doi: [10.1016/j.vetpar.2009.03.047](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.047) PMID: [19394145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19394145/).
22. Kváč M, Sak B, Květoňová D, Ditrich O, Hofmannová L, Modrý D, et al. Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Vet Parasitol.* 2008; 153(3–4):363–7. doi: [10.1016/j.vetpar.2008.01.033](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.033) PMID: [18343038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18343038/).
23. Melicherová J, Ilgova J, Kváč M, Sak B, Koudela B, Valigurová A. Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology.* 2014; 141(2):287–303. doi: [10.1017/S0031182013001637](https://doi.org/10.1017/S0031182013001637) PMID: [24128742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24128742/).
24. Modrý D, Hofmannová L, Antalová Z, Sak B, Kváč M. Variability in susceptibility of voles (Arvicolinae) to experimental infection with *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *Parasitol Res.* 2012; 111:471–3. Epub 2012/02/04. doi: [10.1007/s00436-012-2821-1](https://doi.org/10.1007/s00436-012-2821-1) PMID: [22302477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22302477/).
25. Jalovecká M, Sak B, Kváč M, Květoňová D, Kučerová Z, Salát J. Activation of protective cell-mediated immune response in gastric mucosa during *Cryptosporidium muris* infection and re-infection in immunocompetent mice. *Parasitol Res.* 2010; 106(5):1159–66. doi: [10.1007/s00436-010-1785-2](https://doi.org/10.1007/s00436-010-1785-2) PMID: [20155366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20155366/).
26. Chalmers RM, Sturdee AP, Bull SA, Miller A, Wright SE. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol Res.* 1997; 83(5):478–82. PMID: [9197396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9197396/).
27. Aydin Y, Ozkul IA. Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Vet Parasitol.* 1996; 66(3–4):257–62. Epub 1996/11/15. PMID: [9017888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9017888/).
28. Hůrková L, Hajdušek O, Modrý D. Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Siberian chipmunks. *J Wildl Dis.* 2003; 39(2):441–4. doi: [10.7589/0090-3558-39.2.441](https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.2.441) PMID: [12910775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12910775/).
29. Kváč M, Ondráčková Z, Květoňová D, McEvoy J, Vítovec J, Rost M, et al. The Lesser Egyptian Gerbil (*Gerbillus gerbillus*) is a suitable host for the long-term propagation of *Cryptosporidium andersoni*. *Exp Parasitol.* 2013; 134(4):438–42. doi: [10.1016/j.exppara.2013.04.007](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.04.007) PMID: [23644354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23644354/).
30. Koudela B, Modrý D, Vítovec J. Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. *Vet Parasitol.* 1998; 76(3):181–8. PMID: [9615952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9615952/).
31. Ryan U, Xiao L, Read C, Zhou L, Lal AA, Pavlásek I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(7):4302–7. Epub 2003/07/04. PMID: [12839819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12839819/); PubMed Central PMCID: [PMC165128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC165128/).
32. Neumayerová H, Koudela B. Effects of low and high temperatures on infectivity of *Cryptosporidium muris* oocysts suspended in water. *Vet Parasitol.* 2008; 153(3–4):197–202. doi: [10.1016/j.vetpar.2008.02.009](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.009) PMID: [18372114](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18372114/).
33. Lv C, Zhang L, Wang R, Jian F, Zhang S, Ning C, et al. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(24):7692–9. doi: [10.1128/AEM.01386-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01386-09) PMID: [19820152](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19820152/)
34. Rhee JK, So WS, Kim HC. Age-dependent resistance to *Cryptosporidium muris* (strain MCR) infection in golden hamsters and mice. *Korean J Parasitol.* 1999; 37(1):33–7. PMID: [10188381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10188381/); PubMed Central PMCID: [PMC2733047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2733047/).
35. Satoh M, Hikosaka K, Sasaki T, Suyama Y, Yanai T, Ohta M, et al. Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(1):691–2. PMID: [12514063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12514063/); PubMed Central PMCID: [PMC152376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC152376/).
36. Pavlásek I, Lávička M. [The first finding of a spontaneous gastric cryptosporidiosis infection in hamsters (*Phodopus roborovskii* Satunin, 1903)]. *Vet Med (Praha).* 1995; 40(8):261–3. PMID: [8585141](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8585141/).
37. Iseki M, Maekawa T, Moriya K, Uni S, Takada S. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitol Res.* 1989; 75(3):218–22. Epub 1989/01/01. PMID: [2523540](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2523540/).
38. Feng Y, Alderisio KA, Yang W, Blancero LA, Kuhne WG, Nadeski CA, et al. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a new york watershed. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(20):6475–83. doi: [10.1128/AEM.01034-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01034-07) PMID: [17720824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17720824/); PubMed Central PMCID: [PMC2075072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2075072/).
39. Warren KS, Swan RA, Morgan-Ryan UM, Friend JA, Elliot A. *Cryptosporidium muris* infection in bilbies (*Macrotis lagotis*). *Aust Vet J.* 2003; 81(12):739–41. PMID: [15080483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15080483/).
40. Esteban E, Anderson BC. *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *J Dairy Sci.* 1995; 78(5):1068–72. doi: [10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76723-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76723-6) PMID: [7622718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7622718/).
41. Trout JM, Santín M, Fayer R. *Giardia* and *Cryptosporidium* species and genotypes in coyotes (*Canis latrans*). *J Zoo Wildlife Med.* 2006; 37(2):141–4.

42. Dixon BR, Parrington LJ, Parenteau M, Leclair D, Santín M, Fayer R. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in the intestinal contents of ringed seals (*Phoca hispida*) and bearded seals (*Erignathus barbatus*) in Nunavik, Quebec, Canada. *J Parasitol*. 2008; 94(5):1161–3. Epub 2008/06/26. doi: [10.1645/ge-1485.1](https://doi.org/10.1645/ge-1485.1) PMID: [18576814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18576814/).
43. Qin SY, Zhang XX, Zhao GH, Zhou DH, Yin MY, Zhao Q, et al. First report of *Cryptosporidium* spp. in white yaks in China. *Parasit Vectors*. 2014; 7:230. doi: [10.1186/1756-3305-7-230](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-230) PMID: [24885747](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24885747/); PubMed Central PMCID: PMC4033679.
44. Rhee JK, Kim HC, Eun GS. Infection kinetics and developmental biology of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in Korean native kids and Corriedale lambs. *Korean J Parasitol*. 1998; 36(3):171–81. PMID: [9755588](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9755588/); PubMed Central PMCID: PMC2732928.
45. Ryan UM, Bath C, Robertson I, Read C, Elliot A, McInnes L, et al. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(9):4992–7. Epub 2005/09/10. doi: [10.1128/aem.71.9.4992-4997.2005](https://doi.org/10.1128/aem.71.9.4992-4997.2005) PMID: [16151078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16151078/); PubMed Central PMCID: PMCPMC1214644.
46. Anderson BC. Experimental infection in mice of *Cryptosporidium muris* isolated from a camel. *J Protozool*. 1991; 38(6):16S–7S. PMID: [1818148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1818148/).
47. Pospischil A, Stiglmeier-Herb MT, von Hegel G, Wiesner H. Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Vet Rec*. 1987; 121(16):379–80. PMID: [3424595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3424595/).
48. Kodádková A, Kváč M, Ditrich O, Sak B, Xiao L. *Cryptosporidium muris* in a reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). *J Parasitol*. 2010; 96(1):211–2. doi: [10.1645/GE-2212.1](https://doi.org/10.1645/GE-2212.1) PMID: [19685941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19685941/).
49. Deng MQ, Cliver DO. Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals. *Parasitol Res*. 1999; 85(8–9):733–6. PMID: [10431741](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10431741/).
50. Valigurová A, Hofmannová L, Koudela B, Vávra J. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *J Eukaryot Microbiol*. 2007; 54(6):495–510. PMID: [18070327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18070327/).
51. Siefker C, Rickard LG, Pharr GT, Simmons JS, O'Hara TM. Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. isolated from northern Alaskan caribou (*Rangifer tarandus*). *J Parasitol*. 2002; 88(1):213–6. doi: [10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0213:MCOCSI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0213:MCOCSI]2.0.CO;2) PMID: [12053974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12053974/).
52. Sak B, Petrželková KJ, Květoňová D, Mynařová A, Shutt KA, Pomajbíková K, et al. Long-term monitoring of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at different stages of habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *PLoS one*. 2013; 8(8):e71840. doi: [10.1371/journal.pone.0071840](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071840) PMID: [23951255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23951255/); PubMed Central PMCID: PMC3737207.
53. Laataamna AE, Wagnerová P, Sak B, Květoňová D, Xiao L, Rost M, et al. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Vet Parasitol*. 2015; 208(3–4):135–42. doi: [10.1016/j.vetpar.2015.01.007](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.007) PMID: [25638716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25638716/).
54. Wagnerová P, Sak B, McEvoy J, Rost M, Perec Matysiak A, Ježková J, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland. *Parasitol Res*. 2015; 114(4):1619–24. doi: [10.1007/s00436-015-4353-y](https://doi.org/10.1007/s00436-015-4353-y) PMID: [25722018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25722018/).
55. Katsumata T, Hosea D, Ranuh IG, Uga S, Yanagi T, Kohno S. Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Am J Trop Med Hyg*. 2000; 62(1):70–2. PMID: [10761726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10761726/)
56. Guyot K, Follet-Dumoulin A, Lelievre E, Sarfati C, Rabodonirina M, Nevez G, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(10):3472–80. PMID: [11574558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11574558/)
57. Dubey JP, Markovits JE, Killary KA. *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet Pathol*. 2002; 39(3):363–71. PMID: [12014500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12014500/).
58. Karim MR, Zhang S, Jian F, Li J, Zhou C, Zhang L, et al. Multilocus typing of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* from non-human primates in China. *Int J Parasitol*. 2014; 44:1039–47. doi: [10.1016/j.ijpara.2014.07.006](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.07.006) PMID: [25148945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25148945/).
59. Qi M, Huang L, Wang R, Xiao L, Xu L, Li J, et al. Natural infection of *Cryptosporidium muris* in ostriches (*Struthio camelus*). *Vet Parasitol*. 2014; 205:518–22. doi: [10.1016/j.vetpar.2014.06.035](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.035) PMID: [25178556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25178556/).
60. Tilley M, Upton SJ, Chrisp CE. A comparative study on the biology of *Cryptosporidium* sp. from guinea pigs and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *Can J Microbiol*. 1991; 37(12):949–52. PMID: [1806211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1806211/).

61. Pedraza-Diaz S, Ortega-Mora LM, Carrion BA, Navarro V, Gomez-Bautista M. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. *Vet Parasitol.* 2009; 160(3–4):204–10. Epub 2008/12/23. doi: [10.1016/j.vetpar.2008.11.003](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.003) PMID: [19101086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19101086/).
62. Rhee JK, Yook SY, Park BK. Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in mice. *Korean J Parasitol.* 1995; 33(4):377–82. PMID: [8591016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8591016/).
63. Matsue T, Fujino T, Kajima J, Tsuji M. Infectivity and oocyst excretion patterns of *Cryptosporidium muris* in slightly infected mice. *J Vet Med Sci.* 2001; 63(3):319–20. PMID: [11307934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11307934/).
64. Kváč M, Ondráčková Z, Květoňová D, Sak B, Vítovec J. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet Parasitol.* 2007; 143(3–4):229–33. Epub 2006/09/26. doi: [10.1016/j.vetpar.2006.08.031](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.031) PMID: [16997473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16997473/).
65. Miláček P, Vítovec J. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 1985; 32(1):50. Epub 1985/01/01. PMID: [2580763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2580763/).
66. Arrowood MJ, Sterling CR. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J Parasitol.* 1987; 73(2):314–9. PMID: [3585626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3585626/)
67. Kilani RT, Sekla L. Purification of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites by cesium chloride and Percoll gradients. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36(3):505–8. Epub 1987/05/01. PMID: [3034085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3034085/).
68. Sauch JF, Flanigan D, Galvin ML, Berman D, Jakubowski W. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57(11):3243–7. Epub 1991/11/01. PMID: [1723585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1723585/); PubMed Central PMCID: PMC183955.
69. Casemore DP. ACP Broadsheet 128: June 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J Clin Pathol.* 1991; 44(6):445–51. PMID: [1712367](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1712367/); PubMed Central PMCID: PMC496821.
70. Jiang J, Alderisio KA, Xiao L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(8):4446–54. Epub 2005/08/09. doi: [10.1128/AEM.71.8.4446-4454.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4446-4454.2005) PMID: [16085835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16085835/); PubMed Central PMCID: PMC1183313.
71. Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, et al. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(8):3386–91. PMID: [10427023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10427023/)
72. Sulaiman IM, Lal AA, Xiao L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J Parasitol.* 2002; 88(2):388–94. PMID: [12054017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12054017/)
73. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011; 28(10):2731–9. doi: [10.1093/molbev/msr121](https://doi.org/10.1093/molbev/msr121) PMID: [21546353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21546353/)
74. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003; 52(5):696–704. PMID: [14530136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14530136/).
75. Kváč M, Vítovec J. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J Vet Med B.* 2003; 50(9):451–7. Epub 2003/11/25. PMID: [14633200](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14633200/).
76. Tyzzer EE. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protistenkd.* 1912; 26:394–412.
77. Fayer R, Speer CA, Dubey JP. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R, editor. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1997. p. 1–42.
78. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(4):1578–83. PMID: [10103253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10103253/)
79. Ren X, Zhao J, Zhang L, Ning C, Jian F, Wang R, et al. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp Parasitol.* 2012; 130(3):274–81. Epub 2011/08/02. doi: [10.1016/j.exppara.2011.07.012](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.07.012) PMID: [21803038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21803038/).
80. Fayer R, Trout JM, Xiao L, Morgan UM, Lai AA, Dubey JP. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol.* 2001; 87(6):1415–22. Epub 2002/01/10. doi: [10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1415:ccnsfd\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[1415:ccnsfd]2.0.co;2) PMID: [11780831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11780831/).
81. Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J Eukaryot Microbiol.* 2002; 49(6):433–40. PMID: [12503676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12503676/)
82. Ng-Hublin JS, Singleton GR, Ryan U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rats and mice from rural communities in the Philippines. *Infect Genet Evol.* 2013; 16:5–12. doi: [10.1016/j.meegid.2013.01.011](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.011) PMID: [23376410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23376410/).

83. Sréter T, Egyed Z, Szell Z, Kovacs G, Nikolausz M, Marialigeti K, et al. Morphologic, host specificity, and genetic characterization of a European *Cryptosporidium andersoni* isolate. *J Parasitol.* 2000; 86(6):1244–9. doi: [10.1645/0022-3395\(2000\)086\[1244:MHSAGC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[1244:MHSAGC]2.0.CO;2) PMID: [11191899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11191899/).
84. Fayer R, Santín M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet Parasitol.* 2009; 164(2–4):192–200. Epub 2009/06/09. doi: [10.1016/j.vetpar.2009.05.011](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.011) PMID: [19501967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19501967/).
85. Vítovec J, Hamadejová K, Landová L, Kváč M, Květoňová D, Sak B. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *J Vet Med B.* 2006; 53(5):239–43. Epub 2006/05/31. doi: [10.1111/j.1439-0450.2006.00950.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00950.x) PMID: [16732883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16732883/).
86. Kváč M, Hofmannová L, Hlášková L, Květoňová D, Vítovec J, McEvoy J, et al. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Vet Parasitol.* 2014; 201(1–2):9–17. doi: [10.1016/j.vetpar.2014.01.014](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.014) PMID: [24529828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24529828/).
87. Robinson G, Wright S, Elwin K, Hadfield SJ, Katzer F, Bartley PM, et al. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *Int J Parasitol.* 2010; 40(13):1539–48. Epub 2010/07/06. doi: [10.1016/j.ijpara.2010.05.010](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.05.010) PMID: [20600069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20600069/).
88. Kváč M, McEvoy J, Loudová M, Stenger B, Sak B, Květoňová D, et al. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *Int J Parasitol.* 2013; 43:805–17. doi: [10.1016/j.ijpara.2013.04.007](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.04.007) PMID: [23791796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23791796/).
89. Nakai Y, Hikosaka K, Sato M, Sasaki T, Kaneta Y, Okazaki N. Detection of *Cryptosporidium muris* type oocysts from beef cattle in a farm and from domestic and wild animals in and around the farm. *J Vet Med Sci.* 2004; 66(8):983–4. Epub 2004/09/09. PMID: [15353852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15353852/).
90. Taylor MA, Marshall RN, Green JA, Catchpole J. The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. *Vet Parasitol.* 1999; 86(1):41–8. PMID: [10489201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10489201/).
91. McDonald V, Deer R, Uni S, Iseki M, Bancroft GJ. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect Immun.* 1992; 60(8):3325–31. PMID: [1639500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1639500/); PubMed Central PMCID: [PMC257318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC257318/).
92. Anderson BC. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet Pathol.* 1987; 24(3):235–8. PMID: [3603962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3603962/).
93. Tyzzer EE. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J Med Res.* 1910; 23:487–509. PMID: [19971982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19971982/)
94. Ozkul IA, Aydin Y. Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Vet Parasitol.* 1994; 55(1–2):129–32. PMID: [7886910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7886910/).
95. Anderson BC. Cryptosporidiosis in bovine and human health. *J Dairy Sci.* 1998; 81(11):3036–41. PMID: [9839243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9839243/)
96. Koyama Y, Satoh M, Maekawa K, Hikosaka K, Nakai Y. Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan. *Vet Parasitol.* 2005; 130(3–4):323–6. doi: [10.1016/j.vetpar.2005.03.014](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.014) PMID: [15878239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15878239/).

## 9. PUBLIKACE 3

**Rašková V**, Květoňová D, Sak B, McEvoy J, Edwinston A, Stenger B, Kváč M.  
Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum*  
isolates presumably transmitted from wild mice. *J. Clin. Microbiol.* 2013;  
51(1): 360–362.

# Human Cryptosporidiosis Caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* Isolates Presumably Transmitted from Wild Mice

Veronika Rašková,<sup>a,b</sup> Dana Květoňová,<sup>b</sup> Bohumil Sak,<sup>b</sup> John McEvoy,<sup>c</sup> Adam Edwinson,<sup>c</sup> Brianna Stenger,<sup>c</sup> Martin Kváč<sup>a,b</sup>

University of South Bohemia, Faculty of Agriculture, České Budějovice, Czech Republic<sup>a</sup>; Biology Centre Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic<sup>b</sup>; Department of Veterinary and Microbiological Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA<sup>c</sup>

**We report a case of severe human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* with an unusually high frequency of liquid stools. Wild mice were the most likely source of infection, demonstrating the potential for wild-mouse-borne *Cryptosporidium* to infect humans and highlighting the health risks associated with synantropic rodents.**

## CASE REPORT

A 25-year-old female who was trapping wild rodents at field sites and working with rodents under laboratory conditions became ill and displayed typical clinical signs of cryptosporidiosis, including nonbloody profuse diarrhea and dehydration (Table 1). Following the commencement of diarrhea, stool samples were examined daily for the presence of *Cryptosporidium* using a standard aniline-methyl-violet staining method (1). Course of infection indicators, including stool consistency and color, frequency of defecation, and infection intensity, were examined. The diarrhea was classified according to Chappell et al. (2). *Cryptosporidium* oocysts with typical staining characteristics were identified in fecal smears. Diarrheal illness was characterized by the passage of 124 unformed stools in a 168-h period (Table 1). A high defecation frequency, which peaked at 32 per day, was recorded during the first week following commencement of disease symptoms. Oocyst shedding was detected at the commencement of diarrhea and subsequently for 14 days (from 2 to 15 days of observation); however, the prepatent period is not known. No shedding was detected after resolution of symptoms. Oocyst shedding intensity during the diarrheal period ranged from 2,000 to 70,000 per ml of stool. The combined diarrhea and anorexia resulted in a loss of 4.5 kg of body weight during a 20-day period. The individual was examined on two occasions for the presence of exogenous protozoan stages, helminth eggs, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, amoebas, rotaviruses, and noroviruses. No other bacterial, viral, or parasitic pathogens were detected. Tests for HIV before and after the cryptosporidiosis were negative. The study was approved by the ethics committee of the Institute of Parasitology, Biology Centre Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic (protocol 1/2012).

To identify the *Cryptosporidium* spp. present, DNA was extracted and a nested PCR protocol was used to amplify a partial sequence of the *Cryptosporidium* 60-kDa glycoprotein (gp60) gene (3). PCR amplicons were either sequenced directly or were cloned (pGEM-T easy vector system; Promega, Madison, WI) before sequencing. Sequencing was carried out in both directions using an ABI 3130 sequencer analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The identity of obtained sequences was examined by a BLAST search ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Partial gp60 sequences recovered from the patient have been submitted to GenBank under the accession numbers JX445924 (*C. tyzzeri* IXb sub-

type), JX445925 (*C. tyzzeri* IXa subtype), and JX445926 (*C. parvum*). The gp60 sequences were from *C. tyzzeri* (IXaA8 and IXbA6 subtypes) and *C. parvum* (IIaA13G1R1 subtype). These subtypes of *C. tyzzeri* and *C. parvum* were also detected in the wild mice that the patient was in contact with (data not shown).

The *C. parvum* IIaA13G1R1 subtype detected in this study was previously reported in immunocompetent humans, HIV/AIDS patients, and domestic animals in Malaysia (4). A single case of human cryptosporidiosis caused by *C. tyzzeri* (incorrectly reported as the *C. parvum* II family, A6 subtype) was reported previously in a Kuwaiti child (5); however, the source of the infection was not identified. In immunocompetent hosts, cryptosporidiosis is usually a self-limited disease lasting 10 to 14 days, while infection in immunocompromised hosts may cause severe and persistent disease. Experimental infections of healthy volunteers have been undertaken to address gaps in our understanding of the duration and intensity of infection and oocyst shedding patterns in immunocompetent hosts (2, 6, 7). Adding to these data, we report a well-characterized natural infection in a healthy individual. The duration, signs, and symptoms of illnesses are generally similar to previous reports. The median duration of diarrhea and/or gastrointestinal symptoms in this case study (144 h of liquid diarrhea) was similar to reports in volunteers infected with *C. parvum* (155 h; range, 41 to 336), *C. hominis* (137 h; range, 49 to 518), and *C. meleagridis* (77 h; range, 50 to 105) (2, 6, 7). However, the total number of unformed stools detected in this case study (124) is far greater than that detected in volunteers infected with *C. parvum* (mean, 10; range, 3 to 15), *C. hominis* (mean, 9; range, 2 to 19), and *C. meleagridis* (mean, 8; range, 3 to 15). This higher number of unformed stools in the present case may be due to the coinfection of *C. parvum* with *C. tyzzeri*.

This report demonstrates that transmission of *Cryptosporidium* spp. from synanthropic rodents to humans can occur. Our

Received 6 September 2012 Returned for modification 9 October 2012

Accepted 17 October 2012

Published ahead of print 24 October 2012

Address correspondence to Martin Kváč, [kvac@paru.cas.cz](mailto:kvac@paru.cas.cz).

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02346-12

TABLE 1 Clinical symptoms during the course of a *C. tyzzeri* and *C. parvum* infection in an immunocompetent patient<sup>a</sup>

Day	Defecation frequency (stools per day)	Infection intensity (oocyst per ml)	Stool consistency	Stool color	Symptom
-3	0	ND	ND	ND	No symptoms
-2	1	ND	Pellets	Brown	No symptoms
-1	0	ND	ND	ND	No symptoms
1	2	ND	Liquid/paste	Brown-gray	Diarrhea, nausea, abdominal pain, sweat, trembling
2	32	2,000	Liquid	Green-gray	Diarrhea, nausea, abdominal pain, fatigue, vomiting
3	26	2,000	Liquid	Green-gray	Diarrhea, nausea, abdominal pain, fatigue
4	22	4,500	Liquid	Gray-green	Diarrhea, nausea, abdominal pain, fatigue
5	17	40,000	Liquid	Gray-green	Diarrhea, nausea, abdominal pain, fatigue
6	15	70,000	Liquid	Gray-green	Diarrhea, nausea, fatigue
7	10	40,000	Liquid/paste	Brown-gray	Diarrhea, nausea, fatigue
8	4	40,000	Paste	Brown-orange	Diarrhea, nausea, fatigue
9	5	50,000	Paste	Orange	Diarrhea, nausea, fatigue
10	6	25,000	Dense paste	Orange	Diarrhea, nausea, fatigue
11	4	15,000	Paste with pellets	Brown-orange	Diarrhea, nausea, fatigue
12	4	25,000	Paste with pellets	Brown-orange	Diarrhea, nausea, fatigue
13	3	18,000	Paste with pellets	Brown-orange	Nausea
14	4	10,000	Thinner pellets	Brown	Nausea, diarrhea
15	3	5,000	Thinner pellets	Brown	Nausea
16	2	0	Pellets	Brown	Nausea
17	1	0	Pellets	Brown	Nausea
18	1	0	Pellets	Brown	No symptoms
19	0	0	ND	ND	No symptoms
20	1	0	Pellets	Brown	No symptoms

<sup>a</sup> ND, not determined.

data suggest that *Cryptosporidium tyzzeri*, which is considered to have a narrow host range, can be zoonotic.

*Cryptosporidium*, a ubiquitous protozoan parasite of vertebrate species, causes cryptosporidiosis, a diarrheal disease that can become chronic and life threatening in the absence of a competent immune response. *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* are responsible for most human cases of cryptosporidiosis. However, at least 17 other *Cryptosporidium* spp. have been reported to be infectious to humans (8–10). Most human cryptosporidiosis is reported to be caused by a single species; however, it is evident that both humans and animals can have mixed species and genotypes. Although Cama et al. (11) showed that mixed *Cryptosporidium* infections are not uncommon, they noted that mixed infections may be underreported due to the preferential amplification of the predominant species or genotype by PCR.

*Cryptosporidium parvum* and *C. tyzzeri* are reported to have different host ranges. While *C. tyzzeri* is primarily restricted to rodents and appears to be adapted to house mice (8), *C. parvum* is common in farm animals (12), is zoonotic, and is one of the most frequent causes of human cryptosporidiosis. Although adult mice are generally not susceptible to experimental infections with *C. parvum*, pet and wild rodents are reportedly susceptible to infection with this species (8). Although wildlife animals can be reservoirs for various zoonotic pathogens, including protozoan parasites, it has been suggested that they are not a significant source of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. (13). However, the

commensal relationship that house mice have with humans distinguishes them from most other wildlife. The evidence from this study suggests that *Cryptosporidium* from house mice can cause disease in an immunocompetent human and shows that *C. tyzzeri*, a species considered to be restricted to rodents, can be zoonotic. Moreover, the detection of both IXa and IXb subtypes of *C. tyzzeri*, which appear to be geographically isolated and specific for Western house mice and Eastern house mice, respectively (unpublished data), suggests that multiple exposures to infection are possible.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by a project from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LH11061), by the Grant Agency of the University of South Bohemia (022/2010/Z), and by NIH grant 2P20 RR015566 from the National Center for Research Resources.

#### REFERENCES

- 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. (Praha)* 32:50.
- Chappell CL, Okhuysen PC, Sterling CR, Wang C, Jakubowski W, DuPont HL. 1999. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60:157–164.
- Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41:2744–2747.
- Iqbal A, Lim YA, Surin J, Sim BL. 2012. High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *PLoS One* 7:e31139. doi:10.1371/journal.pone.0031139.

5. Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, Iqbal J, Khalid N, Xiao L. 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin. Microbiol.* 43:2805–2809.
6. Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry R, Widmer G, Akiyoshi DE, Tanriverdi S, Tzipori S. 2006. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:851–857.
7. Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry RC, Akiyoshi DE, Widmer G, Tzipori S. 2011. *Cryptosporidium meleagridis*: infectivity in healthy adult volunteers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85:238–242.
8. Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Crouch ND, Chalmers RM. 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.
9. Kváč M, Květoňová D, Sak B, Ditrich O. 2009. *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. *Emerg. Infect. Dis.* 15:982–983.
10. Waldron LS, Cheung-Kwok-Sang C, Power ML. 2010. Wildlife-associated *Cryptosporidium fayeri* in human, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 16:2006–2007.
11. Cama V, Gilman RH, Vivar A, Ticona E, Ortega Y, Bern C, Xiao L. 2006. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. *Emerging Infect. Dis.* 12:1025–1028.
12. Watanabe Y, Yang CH, Ooi HK. 2005. *Cryptosporidium* infection in livestock and first identification of *Cryptosporidium parvum* genotype in cattle feces in Taiwan. *Parasitol. Res.* 97:238–241.
13. Simpson VR. 2002. Wild animals as reservoirs of infectious diseases in the UK. *Vet. J.* 163:128–146.



## 10. REFERENCE

- Abdou AG, Harba NM, Afifi AF, Elnaidany NF. Assessment of *Cryptosporidium parvum* infection in immunocompetent and immunocompromised mice and its role in triggering intestinal dysplasia. *Int. J. Infect. Dis.* 2013; 17: 593–600.
- Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science.* 2004; 304: 441–445.
- Adeyemi OO, Idowu ET, Ikenweije JC, Otubanjo OA. Status of *Eimeria* infections of sheep and goat sold at small ruminant markets in Lagos state, Southwest, Nigeria. *J. Parasitol.* 2021; 42(1): 137–146.
- Ajjampur SS, Gladstone BP, Selvapandian D, Muliylil JP, Ward H, Kang, G. Molecular and spatial epidemiology of cryptosporidiosis in children in a semi-urban community in south India. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 915–920.
- Akiyoshi DE, Mor S, Tzipori S. Rapid displacement of *Cryptosporidium parvum* type 1 by type 2 in mixed infections in piglets. *Infect. Immun.* 2003; 71: 5765–5771.
- Al Mawly J, Grinberg A, Prattley D, Moffat J, Marshall J, French N. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *Vet. J.* 2015; 203: 155–160.
- Albrechtová J, Albrecht T, Baird SJE, Macholán M, Rudolfsen G, Munclinger P, Tucker PK, Piálek J. Sperm-related phenotypes implicated in both maintenance and breakdown of a natural species barrier in the house mouse. *Proc. R. Soc. B.* 2012; 279: 4803–4810.

- Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 2744–2747.
- Alves M, Xiao L, Antunes FF, Matos O. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol. Res.* 2006; 99: 287–292.
- Amadi B, Mwiya M, Musuku J, Watuka A, Sianongo S, Ayoub A, Kelly P. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002; 360: 1375–1380.
- Amadi B, Mwiya M, Sianongo S, Payne L, Watuka A, Katubulushi M, Kelly P. High dose prolonged treatment with nitazoxamide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. *BMC Infect. Dis.* 2009; 9: 195.
- Anderson BC. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.* 1987; 24: 235–238.
- Anderson BC. Cryptosporidiosis in bovine and human health. *J. Dairy Sci.* 1998; 81(11): 3036–3041.
- Armson A, Meloni BP, Reynoldson JA, Thompson RCA. Assessment of drugs against *Cryptosporidium parvum* using a simple in vitro screening method. *FEMS Microbiol. Letters.* 1999; 178: 227–233.
- Arrowood MJ, Sterling CR. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradient. *J. Parasitol.* 1987; 73: 314–319.
- Auffray JC, Britton-Davidian J. The house mouse and its relatives: systematics and taxonomy. In: Macholán M, Baird SJE, Munclinger P, Piálek J (eds.). *Evolution of the house mouse.* Cambridge University Press, 2012; 1–34.
- Aydin Y. The ultrastructure of the parasite and the mucus cell relationship and endogenous stages of *Cryptosporidium muris* in the stomach of laboratory mice. *Tr. J. Vet. A. Sci.* 1997; 23: 117–125.

- Aydin Y, Özkul IA. Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Vet. Parasitol.* 1996; 66: 257–262.
- Baird SJE, Macholán M. What can the *Mus musculus musculus*/*M. m. domesticus* hybrid zone tell us about speciation? In: Macholán M, Baird SJE, Munclinger P, Piálek J (eds.). *Evolution of the house mouse*. Cambridge University Press, 2012; 334–372.
- Baird SJE, Ribas A, Macholán M, Albrecht T, Piálek J, Goüy de Bellocq J. Where are all the wormy mice? A reexamination of hybrid parasitism in the European house mouse hybrid zone. *Evolution.* 2012; 66: 2757–2772.
- Bajer A. Between-year variation and spatial dynamics of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infections in naturally infected rodent populations. *Parasitology.* 2008; 135: 1629–1649.
- Bajer A, Bednarska M, Sinski E. The ecology of *Cryptosporidium parvum* infection in small rodent populations. *Wiad. Parazytol.* 2001; 47: 747–753.
- Bajer A, Bednarska M, Pawelczyk A, Behnke JM, Gilbert FS, Sinski E. Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology.* 2002; 125: 21–34.
- Bajer A, Cacciò S, Bednarska M, Behnke JM, Pieniayek NJ, Sinski E. Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents Poland. *J. Parasitol.* 2003; 89: 1053–1055.
- Baskin GB. *Cryptosporidium* of the conjunctiva in SIV-infected rhesus monkeys. *J. Parasitol.* 1996; 82: 630–632.
- Bednarska M, Bajer A, Kulis K, Sinski E. 2003: Biological characterisation of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2003; 10: 163–169.
- Bednarska M, Bajer A, Sinski E, Girouard AS, Tamang L, Graczyk TK. Fluorescent *in situ* hybridization as a tool to retrospectively identify *Cryptosporidium*

*parvum* and *Giardia lamblia* in samples from terrestrial mammalian wildlife. Parasitol. Res. 2007; 100: 455–460.

Benamrouz S, Guyot K, Gazzola S, Mouray A, Chassat T, Delaire B, Chabé M, Gosset P, Viscogliosi E, Dei-Cas E, Creusy C, Conseil V, Certad G. *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice infected with only one oocyst: qPCR assesment of parasite replication in tissues and development of digestive cancer. PLoS One. 2012; 7: 1–7.

Berry RJ. Town mouse, country mouse: adaptation and adaptability in *Mus domesticus* (*Mus musculus d.*). Mammal Rev. 1981; 11: 91–136.

Betancourt WQ, ROSE JB. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Vet. Parasitol. 2004; 126: 219–234.

Bringman SA, Robertson RM, Syed Q, Speed N, Andrews N, Hunter PR. Outbreak of cryptosporidiosis associated with a disinfected groundwater supply. Epidemiol. Infect. 1995; 115: 555–556.

Bonhomme F, Searle JB. House mouse phylogeography. In: Macholán M, Baird SJE, Munclinger P, Piálek J (eds.). Evolution of the house mouse. Cambridge University Press, 2012; 278–296.

Boursot P, Auffray JC, Britton-Davidian J, Bonhomme F. The evolution of house mice. Annu. Rev. Ecol. Syst. 1993; 24: 119–152.

Bukhari Z, McCuin RM, Fricker CR, Clancy JL. Medium-pressure UV light for oocyst inactivation. J. Am. Water Works Assoc. 1999; 91: 86–94.

Cacciò SM. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. Parasitologia. 2005; 47: 185–192.

Cacciò SM, Putignani L. Epidemiology of human cryptosporidiosis. In: Cacciò SM, Widmer G (eds.). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer, 2014; 43–79.

- Cama VA, Gilman RH, Vivar A, Ticona E, Ortega Y, Bern C, Xiao L. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12: 1025–1028
- Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, Gilman RH, Xiao L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children in Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14: 1567–74.
- Carreno RA, Martin DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 1999; 85: 899–904.
- Casemore DP. ACP Broadsheet 128: June 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J. Clin. Pathol.* 1991; 44(6): 445–451.
- Causser LM, Handzel T, Welch P, Carr M, Culp D, Lucht R, Mudahar K, Robinson D, Neavear E, Fenton S, Rose C, Craig L, Arrowood M, Wahlquist S, Xiao L, Lee YM, Mirel L, Levy D, Beach MJ, Poquette G, Dworkin MS. An outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection at an Illinois recreational waterpark. *Epidemiol. Infect.* 2006; 134: 147–156.
- Cevallos AM, Zhang X, Waldor MK, Jaison S, Zhou X, Tzipori S, Neutra MR, Ward HD. Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infect. Immun.* 2000; 68: 4108–4116.
- Cucchi T, Auffray JC, Vigne JD. History of house mouse synanthropy and dispersal in the Near East and Europe: a zooarchaeological insight. In: Macholán M, Baird SJE, Munclinger P, Piálek J (eds.). *Evolution of the house mouse*. Cambridge University Press, 2012; 65–93.
- Current WL. Cryptosporidiosis, a protozoologist's view of an emerging zoonosis. *Microecol. Ther.* 1985; 15: 165–200.
- Current WL. The biology of *Cryptosporidium*. *ASM News.* 1988; 54: 605–611.

- Current WL, Upton SJ, Haynes TB. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. J. Protozool. 1986; 33: 289–296.
- Current WL, Reese NC. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. J. Eukar. Microbiol. 1987; 33: 98–108.
- Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. Clin. Microbiol. Rev. 1991; 4: 325–358.
- Čondlová Š, Horčíčková M, Sak B, Květoňová D, Hlásková L, Konečný R, Stanko M, McEvoy J, Kváč M. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. Eur. J. Parasitol. 2018; 63: 1–12.
- Čondlová Š, Horčíčková M, Havrdová N, Sak B, Hlásková L, Perec-Matysiak A, Kicia M, McEvoy JM, Kváč M. Diversity of *Cryptosporidium* spp. in *Apodemus* spp. in Europe. Eur. J. Protistol. 2019; 69: 1–13.
- da Silva AJ, Cacciò SM, Williams C, Won K. Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. Vet. Parasitol. 2003; 111(4): 297–307.
- Damana N, Furgasa W, Sibhat B. Prevalence and associated risk factors of *Eimeria* infections in dairy calves in Haramaya University, Haramaya and Harar towns. SOJ Vet. Sci. 2018; 4(2): 1–4.
- Danišová O, Valenčáková A, Stanko M, Luptáková L, Hatalová E, Čanády A. 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. muscrat* genotypes I and II of rodents in Europe. Acta Trop. 2017; 172: 29–35.
- Darabus G, Olariu R. The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. Pol. J. Vet. Sci. 2003; 6(3): 225–228.
- Dawson D. Foodborne protozoan parasites. Int. J. Food Microbiol. 2005; 103: 207–227.

- de Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 1999; 29: 1269–1287.
- de Waele V, Speybroeck N, Berkvens D, Mulcahy G, Murphy TM. Control of cryptosporidiosis in neonatal calves: use of halofuginone lactate in two different calf rearing systems. *Prev. Vet. Med.* 2010; 96(3): 143–151.
- Del Coco VF, Córdoba MA, Bilbao G, de Almeida Castro AP, Basualdo JA, Fayer R, Santín M. *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. *Res. Vet. Sci.* 2014; 96: 311–314.
- Deng L, Li W, Zhong Z, Gong C, Cao X, Song Y, Wang W, Huang X, Liu X, Hu Y, Fu H, He M, Wang Y, Zhang Y, Wu K, Peng G. Occurrence and genetic characteristics of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium andersoni* in horses from southwestern China. *J. Eukar. Microbiol.* 2017; 64(5): 716–720
- Deng L, Chai Y, Luo R, Yang L, Yao J, Zhong Z, Wang W, Xiang L, Fu H, Liu H, Zhou Z, Yue Ch, Chen W, Peng G. Occurrence and genetic characteristics of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in pet red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in China. *Sci. Rep.* 2020; 10: 1026.
- Desai NT, Sarkar R, Kang G. Cryptosporidiosis: An under-recognized public health problem. *Trop. Parasitol.* 2012; 2: 91–98.
- Diaz P, Quilez J, Prieto A, Navarro E, Perez-Creo A, Fernandez G, Panadero R, Lopez C, Diez-Banos P, Morrondo P. 2015: *Cryptosporidium* species and subtype analysis in diarrhoeic pre-weaned lambs and goat kids from north-western Spain. *Parasitol. Res.* 2015; 114: 4099–4105.
- Diaz P, Navarro E, Prieto A, Perez-Creo A, Vina M, Diaz-Cao JM, Lopez CM, Panadero R, Fernandez G, Diez-Banos P, Morrondo P. *Cryptosporidium* species in post-weaned and adult sheep and goats from NW Spain: Public and animal health significance. *Vet. Parasitol.* 2018; 254: 1–5.

- Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect.* 2002; 4: 1059–1066.
- Djuretic T, Wall PG, Nichols G. General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. *Commun. Dis. Rep.* 1997; 7: 41–45.
- Domenéch-Sánchez A, Olea F, Berrocal CI. Infection related to recreational waters. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2008; 11: 26–27.
- Du SZ, Zhao GH, Shao JF, Fang YQ, Tian GR, Zhang LX, Wang RJ, Wang HY, Qi M, Yu SK. *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in captive non human primates in Qinling mountains. *Korean J. Parasitol.* 2015; 53: 395–402.
- Dubey JP, Hamir AN, Sonn RJ, Topper MJ. Cryptosporidiosis in a bat (*Eptesicus fuscus*). *J. Parasitol.* 1998; 84: 622–623.
- Dubey JP, Markovits JE, Killary KA. *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet. Pathol.* 2002; 39: 363–371.
- Duhain GL, Minnaar A, Buys EM. Effect of chlorine, blanching, freezing and microwave heating on *Cryptosporidium parvum* viability inoculated on green peppers. *J. Food Prot.* 2012; 75: 936–941.
- DuPont H, Chapell C, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakobowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 855–859.
- Duvaux L, Belkhir K, Boulesteix M, Boursot P. Isolation and gene flow: inferring the speciation history of European house mice. *Mol. Ecol.* 2011; 20: 5248–5264.
- Đureje L, Macholán M, Baird SJE, Piálek J. The house mouse hybrid zone in central Europe: from morphology to molecules. *Folia Zool.* 2012; 61: 308–318.
- Ehsan AM, Geurden T, Casaert S, Parvin SM, Islam TM, Ahmed UM, Levecke B, Vercruyse J, Claerebout E. Assessment of zoonotic transmission of *Giardia*



- and *Cryptosporidium* between cattle and humans in rural villages in Bangladesh. PLoS One. 2015; 10: 19: 1–11.
- Elsheikha HM, Clayton SJ, Morsy TA, Yon LK. Parasitic zoonoses at the rodent–captive primate–human health interface. J. Egypt. Soc. Parasitol. 2009; 39: 447–460.
- Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Crouch ND, Chalmers RM. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. Int. J. Parasitol. 2012; 42: 675–682.
- Enemark HL, Ahrens P, Lowery CJ, Thamsborg SM, Enemark JMD Bille-Hansen V, Lind P. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterisation. Vet. Parasitol. 2002; 107: 37–49.
- Esteban E, Anderson BC. *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. J. Dairy Sci. 1995; 78: 1068–1072.
- Fayer R. The general biology of *Cryptosporidium*. CRC Press, 1997; 12: 1–41.
- Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 2004; 126: 37–56.
- Fayer R. The general biology. In: Fayer R, Xiao L (eds.). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, 2008; 2–33.
- Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp. Parasitol. 2010; 124: 90–97.
- Fayer R, Ungar BLP. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. Microbiol. Rev. 1986; 50: 458–483.
- Fayer R, Phillips L, Anderson BC, Bush M. Chronic cryptosporidiosis in a Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). J. Zoo. Wildl. Med. 1991; 22: 228–232.
- Fayer R, Trout JM, Nerad T. Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J. Eukar. Microbiol. 1996; 43: 64.

- Fayer R, Speed CA, Dubey JP. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R, Xiao L (eds.). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, 1997; 419–436.
- Fayer R, Trout JM, Jenkins MC. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 1998; 84: 1165–1169.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30: 1305–1322.
- Fayer R, Trout JM, Xiao L, Morgan U, Lal AA, Dubey JP. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 2001; 87: 1415–1422.
- Fayer R, Santín M, Xiao L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 2005; 91: 624–629.
- Fayer R, Santín M, Trout JM. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 2008; 156: 191–198.
- Fayer R, Santín M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 2009; 164: 192–200.
- Fayer R, Santín M, Macarasin D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 2010; 172: 23–32.
- Faubert GM, Litvinsky Y. Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. *J. Parasitol.* 2000; 86: 495–500.
- Feliu C, López M, Gómez MS, Torres J, Sánchez S, Miquel J, Abreu-Acosta N, Segovia JM, Martín-Alonso A, Montoliu I, Villa M, Fernández-Álvarez Á, Bakhoun AJS, Valladares B, Orós J, Foronda P. Parasite fauna of rodents (Murinae) from El Hierro (Canary Islands, Spain): a multidisciplinary approach. *Acta Parasitol.* 2012; 57(2): 1171–1178.
- Feltus DC, Giddings CW, Schneck BL, Monson T, Warshauer D, McEvoy J. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(12): 4303–4308.

- Feng Y. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp. Parasitol.* 2010; 124: 128–137.
- Feng Y, Alderisio KA, Yang W, Blancero LA, Kuhne WG, Nadareski CA, Reid M, Xiao L. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 76: 6475–6483.
- Feng Y, Yang W, Ryan U, Zhang L, Kváč M, Koudela B, Modrý D, Li N, Rayer R, Xiao L. Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J. Clin. Microbiol.* 2011a; 49: 34–41.
- Feng Y, Lal AA, Li N, Xiao L. Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp. Parasitol.* 2011b; 127: 238–242.
- Firrozi Z, Sazmand A, Zahedi A, Astani A, Fattahi-Bafghi A, Kiani-Salmi N, Ebrahimi B, Dehghani-Tafti A, Ryan U, Akrami-Mohajeri F. Prevalence and genotyping identification of *Cryptosporidium* in adult ruminants in central Iran. *Parasit. Vectors.* 2019; 12: 510.
- Fleta J, Sánchez-Acedo C, Clavel A, Quílez J. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extraintestinal tissues of sheep and pigs. *Vet. Parasitol.* 1995; 59: 201–205.
- Foo C, Farrell J, Boxell A, Robertson I, Ryan UM. Novel *Cryptosporidium* genotype in wild Australian mice (*Mus domesticus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73: 7693–7696.
- Froeschke G, Sommer S. MHC class II DRB variability and parasite load in the striped mouse (*Rhabdomys pumilio*) in the Southern Kalahari. *Mol. Biol. Evol.* 2005; 22: 1254–1259.
- Gait R, Soutar RH, Hanson M, Fraser C, Chalmers RM. Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. *Vet. Rec.* 2008; 162: 843–845.
- Galván AL, Magnet A, Izquierdo F, Fernández Vadillo C, Peralta RH, Angulo S, Fenoy S, del Aguila C. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. *Sci. Total Env.* 2014; 468–469: 368–375.

- García-Livia K, Martín-Alonso A, Foronda P. Diversity of *Cryptosporidium* spp. In wild rodents from the Canary Islands, Spain. *Parasit.Vectors*. 2020; 13:445.
- Gatei W, Ashford RW, Beeching NJ, Kang'ethe Kamwati S, Greensill J, Hart CA. *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. *Emerg. Infect. Dis*. 2002; 8(2): 204–206.
- Gatei W, Hart CA, Gilman RH, Das P, Cama V, Xiao L. Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*. *J. Eukaryot. Microbiol*. 2006; 53: S43–S48.
- Gatei W, Das P, Dutta P, Sen A, Cama V, Lal AA, Xiao L. Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infect. Gen. Evol*. 2007; 7: 197–205.
- Gatei W, Barrett D, Lindo JF, Eldemire-Shearer D, Cala V, Xiao L. Unique *Cryptosporidium* population in HIV-infected persons, Jamaica. *Emerg. Infect. Dis*. 2008; 14: 841–843.
- Geraldes A, Basset P, Gibson B, Smith KL, Harr B, Yu HT, Bulatova N, Ziv Y, Nachman MW. Inferring the history of speciation in house mice from autosomal, X-linked, Y-linked and mitochondrial genes. *Mol. Ecol*. 2008; 17: 5349–5363.
- Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. Recombination in the hemagglutinin gene of the 1918 „Spanish flu“. *Science*. 2001; 239: 1842–1845.
- Giles M, Webster KA, Marshall JA, Catchpole J, Goddard TM. Experimental infection of a lamb with *Cryptosporidium parvum* genotype I. *Vet. Rec*. 2001; 149(17): 523–525.
- Giles M, Chalmers RM, Pritchard G, Elwin K, Mueller-Doblies D, Clifton-Hadley F. *Cryptosporidium hominis* in a goat and a sheep in the UK. *Vet. Rec*. 2009; 164(1): 24–25.
- Goodstein RF, Colombo CS, Illfelder MA, Skaggs RE. Bronchial and gastrointestinal cryptosporidiosis in AIDS. *J. Am. Ostiopath. Assoc*. 1989; 89: 195–197.

- Goüy de Bellocq JG, Wasimuddin, Ribas A, Bryja J, Piálek J, Baird SJE. Holobiont suture zones: parasite evidence across the European house mouse hybrid zone. *Mol. Ecol.* 2018; 27(24): 5214–5227.
- Griffiths JK. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. *Adv. Parasitol.* 1998; 40: 37–85.
- Guénet JL, Bonhomme F. Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet.* 2003; 19: 24–31.
- Guk SM, Yong TS, Park SJ, Park JH, Chai JY. Genotype and animal infectivity of human isolate of *Cryptosporidium parvum* in the Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* 2004; 42: 85–89.
- Guselle NJ, Appelbee AJ, Olson ME. Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet. Parasitol.* 2003; 113: 7–18.
- Guyot K, Follet-Dummouli N, Lelièvre E, Sarfati C, Rabodoniriana M, Nevez G, Cailliez JC, Camus D, Dei-Cas E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 3472–3480.
- Haas F, Brodin A. The crow *Corvus corone* hybrid zone in southern Denmark and northern Germany. *Ibis.* 2005; 147: 649–656.
- Hajdušek O, Ditrich O, Šlapeta J. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. In animal and human hosts from the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 2004; 122(3): 183–192.
- Hannah J, Riordan T. Case to case spread of cryptosporidiosis; evidence from a day nursery outbreak. *Public Health.* 1988; 102(6): 539–544.
- Hasajová A, Valenčáková A, Malčecová B, Danišová O, Halán M, Goldová M, Sak B, Květoňová D, Kváč M, Halánová M. Significantly higher occurrence of *Cryptosporidium* infection in Roma children compared with non-Roma children in Slovakia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 33: 1401–1406.

- Hausmann K, Hülsmann N. Systém prvoků. Protozoologie. Academia, 2003; 58–61.
- Herges GR, Widmer G, Clark ME, Khan E, Giddings CW, Brewer M, McEvoy J. Evidence that *Cryptosporidium parvum* populations are panmictic and unstructured in the Upper Midwest of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(22): 8096–8101.
- Hijjawi NS, Meloni BP, Ryan UM, Thompson RCA. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31: 1048–1055.
- Hijjawi N, Ng J, Yang R, Atoum MF, Ryan U. Identification of rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in human isolates from Jordan. *Exp. Parasitol.* 2010; 125: 161–164.
- Hikosaka K, Nakai Y. A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Parasitol. Res.* 2005; 97: 373–379.
- Hinnant K, Swartz A, Rotterdam H, Rudsk C. Cytomegaloviral and cryptosporidial cholecystitis in two patients with AIDS. *Am. J. Surg. Pathol.* 1989; 13: 57–60.
- Hofmannová L, Hauptman K, Huclová K, Květoňová D, Sak B, Kváč M. *Cryptosporidium erinacei* and *C. parvum* in a group of overwintering hedgehogs. *Eur. J. Protist.* 2016; 56: 15–20.
- Holubová N, Tůmová L, Sak B, Hejzlarová A, Konečný R, McEvoy JM, Kváč M. Description of *Cryptosporidium ornitophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. *Parasit. Vectors.* 2020; 13: 340.
- Horčíčková M, Čondlová Š, Holubová N, Sak B, Květoňová D, Hlásková L, Konečný R, Sedláček F, Clark M, Giddings C, McEvoy JM, Kváč M. Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology.* 2019; 146(2): 220–233.

- Huang K, Akiyoshi DE, Feng X, Tzipori S. Development of patent infection in immunosuppressed C57BI/6 mice with a single *Cryptosporidium meleagridis* oocyst. *J. Parasitol.* 2003; 89: 620–622.
- Hunter RP, Thompson RCA. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* 2005; 35: 1181–1190.
- Hůrková L, Hajdušek O, Modrý D. Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Siberian chipmunks. *J. Wildl. Dis.* 2003; 39(2): 441–444.
- Chacín-Bonilla L: *Cryptosporidium*: phylogeny and taxonomy. *Invest. Clin.* 2007; 48: 1–4.
- Chalmers RM, Sturdee AP, Casemore DP, Curry A, Miller A, Parker ND, Richmond TM. *Cryptosporidium muris* in wild house mice (*Mus musculus*): First report in the UK. *Eur. J. Protistol.* 1994; 30(2): 151–155.
- Chalmers RM, Sturdee AP, Bull SA, Miller A, Wright SE. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol. Res.* 1997; 83: 478–482.
- Chalmers RM, Hadfield SJ, Jackson CJ, Elwin K, Xiao L, Hunter P. Geographic linkage and variation in *Cryptosporidium hominis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14: 496–498.
- Chalmers RM, Davies AP. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.* 2010; 124(1): 138–146.
- Chappell CL, Okhuysen PC, Sterling CR, CuPont HL. *Cryptosporidium parvum*: Intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *J. Infect. Dis.* 1996; 173: 232–236.
- Chappell CL, Okhuysen PC, Sterling CR, Wang C, Jakubowski W, DuPont HL. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60: 157–164.

- Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry RC, Widmer G, Akiyoshi DE, Tanriverdi S, Tzipori S. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75: 851–857.
- Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry RC, Akiyoshi DE, Widmer G, Tzipori S. *Cryptosporidium meleagridis*: infectivity in healthy adult volunteers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 85: 238–242.
- Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry RC, Lopu PJ, Widmer G, Tzipori S. *Cryptosporidium muris*: infectivity and illness in healthy adult volunteers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015; 92: 50–55.
- Chen L, Hu S, Jiang W, Zhao J, Li N, Guo Y, Liao C, Han Q, Feng Y, Xiao L. *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* subtypes in crab-eating macaques. *Parasit. Vectors.* 2019; 12: 350.
- Iqbal A, Lim YA, Surin J, Sim BL. High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targetting GP60 gene. *PLoS One.* 2012; 7: 1–9.
- Iseki M. 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn. J. Parasitol.* 1979; 28: 285–307.
- Iseki M. Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Parasitol.* 1986; 35: 521–526.
- Iseki M, Maekawa T, Moriya K, Uni S, Takada S. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 1989; 75: 218–222.
- Jablonski D, Sillero N, Oskyrko O, Bellati A, Čeirans A, Cheylan M, Cogalniceanu D, Crnobrnja-Isailovic J, Crochet PA, Crottini A, Doronin I, Džukic G, Geniez P, Ilgaz C, Iosif R, Jandzik D, Jelic D, Litvinchuk S, Ljubisavljevic K, Lymberakis P, Mikulíček P, Mizsei E, Moravec J, Najbar B, Pabijan M, Pupins M, Sourrouille P, Strachinis I, Szabolcs M, Thanou E, Tzoras E, Vergilov V, Vörös J, Gvoždík V. The distribution and biogeography of slow



worms (*Anguis*, Squamata) across the Western Palearctic, with an emphasis on secondary contact zones. *Amph. Rept.* 2021; 42: 1–12.

Jalovecká M, Sak B, Kváč M, Květoňová D, Kučerová Z, Salát J. Activation of protective cell-mediated immune response in gastric mucosa during *Cryptosporidium muris* infection and re-infection in immunocompetent mice. *Parasitol. Res.* 2010; 106(5): 1159–1166.

Jellison KL, Hemond HF, Schauer DB. Sources and species of *Cryptosporidium* oocysts in the Wachusett Reservoir watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68: 569–575.

Ježková J, Prediger J, Holubová N, Sak B, Konečný R, Feng Y, Xiao L, Rost M, McEvoy J, Kváč M. *Cryptosporidium ratti* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in the Czech Republic. *Parasitology.* 2021a; 148(1): 84–97.

Ježková J, Limpouchová Z, Prediger J, Holubová N, Sak B, Konečný R, Květoňová D, Hlásková L, Rost M, McEvoy J, Rajský D, Feng Y, Kváč M. *Cryptosporidium myocastoris* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae), the species adapted to the nutria (*Myocastor coypus*). *Microorganisms.* 2021b; 9(4): 813.

Jian F, Liu A, Wang R, Zhang S, Qi M, Zhao W, Shi Y, Wang J, Wei J, Zhang L, Xiao L. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in horses and donkeys. *Infect. Gen. Evol.* 2016; 43: 261–266.

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

Jiang Y, Ren J, Yuan Z, Liu A, Zhao H, Liu H, Chu L, Pan W, Cao J, Lin Y, Shen Y. *Cryptosporidium andersoni* as a novel predominant *Cryptosporidium* species in outpatients with diarrhea in Jiangsu Province, China. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 555.

- Johson DC, Reynolds KA, Gerba CP, Pepper IL, Rose JB. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. *Water Sci. Technol.* 2000; 31: 439–442.
- Jones M, Boccia D, Kealy M, Salkin B, Ferrero A, Nichols G, Stuart JM. *Cryptosporidium* outbreak linked to interactive water feature, U. K.: importance of guidelines. *Eurosurveillance.* 2006; 11: 126–128.
- Jones EP, Jensen JK, Magnussen E, Gregersen N, Hansen HS, Searle JB. A molecular characterization of the charismatic Faroe house mouse. *Biol. J. Linn. Soc.* 2011; 102: 471–482.
- Kahn DG, Garfinkle JM, Kionoff DC, Pembroke LJ, Morrow DJ. Cryptosporidial and cytomegaloviral hepatitis and cholecystitis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1987; 111: 879–881.
- Katsumata T, Hosea D, Ranuh IG, Uga S, Yanagi T, Kohno S. Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 62: 70–72.
- Karanis P, Plutzer J, Halim NA, Igori K, Nadasawa H, Ongerth J, Liqing M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. *Parasitol. Res.* 2007; 101: 1575–1580.
- Kelley K. Methods for the behavioral, educational, and social sciences: an R package. *Behav. Res. Methods.* 2007; 39: 979–984.
- Kellnerová K, Holubová N, Jandová A, Vejčík A, McEvoy JM, Sak B, Kváč M. First description of *Cryptosporidium ubiquitum* XIIa subtype family in farmed fur animals. *Eur. J. Protistol.* 2017; 59: 108–113.
- Kilani RT, Sekla L. Purification of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites by cesium chloride and Percoll gradients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 36: 505–508.
- Kimura A, Edagawa A, Okada K, Takimoto A, Yonesho S, Karanis P. Detection and genotyping of *Cryptosporidium* from brown rats (*Rattus norvegicus*) captured in an urban area of Japan. *Parasitol. Res.* 2007; 100: 1417–1420.

- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; 16: 111–120.
- King KC, Stelkens RB, Webster JP, Smith DF, Brockhurst MA. Hybridization in parasites: consequences for adaptive evolution, pathogenesis and public health in a changing world. *PLOS Pathogens.* 2015; 11: 1–12.
- Kodádková A, Kváč M, Ditrich O, Sak B, Xiao L. *Cryptosporidium muris* in a reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). *J. Parasitol.* 2010; 96(1): 211–212.
- Koehler AV, Whipp MJ, Haydon SR, Gasser RB. *Cryptosporidium cuniculus* – new records in human and kangaroo in Australia. *Parasit. Vectors.* 2014; 7: 492.
- Koyama Y, Satoh M, Maekawa K, Hikosaka K, Nakai Y. Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type on slaughterhouse in the northern island of Japan. *Vet. Parasitol.* 2005; 130: 323–326.
- Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K. Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10: 2067–2072.
- Kváč M, Vítovec J. Prevalence and patogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med.* 2003; 5: 451–457.
- Kváč M, Květoňová D, Půžová G, Ditrich O. Comparison of selected diagnostic methods for identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* in routine examination of faeces. *J. Vet Med. Ser. B.* 2003; 50:405–411.
- Kváč M, Ondráčková Z, Květoňová D, Sak B, Vítovec J. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 2007; 143: 229–233.
- Kváč M, Sak B, Květoňová D, Ditrich O, Hofmannová L, Modrý D, Vítovec J, Xiao L. Infectivity, pathogenicity and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Vet. Parasitol.* 2008a; 153: 363–367.

- Kváč M, Hofmannová L, Bertolino S, Wauters L, Tosi G, Modrý D. Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitol.* 2008b; 55(2): 95–99.
- Kváč M, Květoňová D, Sak B, Ditrich O. *Cryptosporidium* pig genotype II in an immunocompetent human patient. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15: 982–983.
- Kváč M, Kodádková A, Sak B, Květoňová D, Jalovecká M, Rost M, Salát J. Activated CD8+ T cells contribute to clearance of gastric *Cryptosporidium muris* infections. *Parasitol. Immunol.* 2011; 33(4) 210–216.
- Kváč M, Kestřánová M, Květoňová D, Kotková M, Ortega Y, McEvoy JM, Sak B. *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Exp. Parasitol.* 2012; 131: 107–110.
- Kváč M, Kestřánová M, Pinková M, Květoňová D, Kalinová J, Wagnerová P, Kotková M, Vítovec J, Ditrich O, McEvoy J, Stenger B, Sak B. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet. Parasitol.* 2013a; 191: 218–227.
- Kváč M, Ondráčková Z, Květoňová D, McEvoy JM, Vítovec J, Rost M, Sak B. The lesser Egyptian Gerbil (*Gerbillus gerbillus*) is a suitable host port he long-term propagation of *Cryptosporidium andersoni*. *Exp. Parasitol.* 2013b; 134(4): 438–442.
- Kváč M, Hofmannová L, Hlásková L, Květoňová D, Vítovec J, McEvoy J, Sak B. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Vet. Parasitol.* 2014; 201: 9–17.
- Kváč M, Vlnatá G, Ježková J, Horčíčková M, Konečný R, Hlásková L, McEvoy J, Sak B. *Cryptosporidium occultus* sp. N. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *Eur. J. Parasitol.* 2018; 63: 96–104.
- Kváč M, Myšková E, Holubová N, Kellnerová K, Kicia M, Rajský D, McEvoy J, Feng Y, Hanzal V, Sak B. Occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium*

- spp. In wild foxes, wolves, jackals and bears in central Europe. *Folia Parasitol.* 2021; 68: 2.
- Laakkonen J, Soveri T, Henttonen H. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in peak density *Microtus agrestis*, *Microtus oeconomus* and *Clethrionomys glareolus* populations. *J. Wildl. Dis.* 1994; 30: 110–111.
- Laatamna A, Wagnerová P, Sak B, Květoňová D, Xiao L, Rost M, McEvoy J, Saadi A, Aissi M, Kváč M. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: Detection of a novel *Cryptosporidium* hominis subtype family (Ik) in a horse. *Vet. Parasitol.* 2015; 208: 135–142.
- Langer RC, Riggs MW. *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 1999; 67: 5282–5291.
- Le Blancq SM, Khrantsov NV, Zamani F, Upton SJ, Wu TW. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997; 90: 463–478.
- Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedrazza-Diaz S, McLauchlin J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55: 703–707.
- Li N, Xiao L, Alderisio K, Elwin K, Cebelinski E, Chalmers RM, Santín M, Fayer R, Kváč M, Ryan U, Sak B, Stanko M, Guo Y, Wang L, Zhang L, Cai J, Roellig D, Feng Y: Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20: 217–224.
- Li N, Li L, Tao W, Jiang Y, Wan Q, Lin Y, Li W. Molecular investigation of *Cryptosporidium* in small caged pets in northeast China: host specificity and zoonotic implications. *Parasitol Res.* 2016; 115: 2905–2911.
- Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apikomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukar. Microbiol.* 2000; 47: 91–95.

- Liu A, Ji H, Wang E, Liu J, Xiao L, Shen Y, Li Y, Zhang W, Ling H. Molecular identification and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis* in raw urban wastewater in Harbin, China. *Parasitol. Res.* 2011; 109: 913–918.
- Liu X, Xie N, Li W, Zhou Z, Zhong Z, Shen L, Cao S, Yu X, Hu Y, Chen W, Peng G. Emergence of *Cryptosporidium hominis* monkey genotype II and novel subtype family Ik in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) in China. *PLoS One.* 2015; 10: 1–10.
- Loudová M. Biologie a genetická variabilita *Cryptosporidium* mouse genotype I. [bakalářská práce] – Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic 2011, 56 s.
- Lv C, Zhang L, Wang R, Jian F, Zhang S, Ning C, Wang H, Feng C, Wang X, Ren X, Qi M, Xiao L. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75: 7692–7699.
- Ma J, Cai J, Ma J, Feng Y, Xiao L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in yaks (*Bos grunniens*) in China. *Vet. Parasitol.* 2014; 202(3–4): 113–118.
- Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JP. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Eng. J. Med.* 1994; 331: 161–167.
- MacDougall-Shackleton EA, Derryberry EP, Foutopoulos J, Dobson AP, Hahn TP. Parasite-mediated heterozygote advantage in an outbred songbird population. *Biol. Lett.* 2005; 1: 105–107.
- Mackenstedt U, Jenkins D, Romiq T. The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2015; 4: 71–79.
- Mahdi NK, Ali NH. Cryptosporidiosis among animal handlers and their livestock in Basrah, Iraq. *East Afr. Med. J.* 2002; 79: 550–553.

- Macholán M, Kryštůfek B, Vohralík V. The location of the *Mus musculus/M. domesticus* hybrid zone in the Balkans: clues from morphology. *Acta Theriol. (Warzs)*. 2003; 48: 177–188.
- Macholán M, Munclinger P, Šugerková M, Dufková P, Bímová B, Božíková E, Zima J, Piálek J. Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution*. 2007; 61: 746–771.
- Macholán M, Baird SJE, Munclinger P, Dufková P, Bímová B, Piálek J. Genetic conflict outweighs heterogametic incompatibility in the house mouse hybrid zone? *BMC Evol. Biol.* 2008; 8: 271–284.
- Macholán M, Baird SJE, Dufková P, Munclinger P, Vošlajerová Bímová B, Piálek J. Assessing multilocus introgression patterns: a case study on the mouse X chromosome in Central Europe. *Evolution*. 2011; 65: 1428–1446.
- Majeed QAH, El-Azazy OME, Abdou NEMI, Al-Aal ZA, El-Kabbany AI, Tahrani LMA, AlAzemi MS, Wang YF, Feng YY, Xiao L. Epidemiological observations on cryptosporidiosis and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats in Kuwait. *Parasitol. Res.* 2018; 117: 1631–1636.
- Masuno K, Yanai T, Sakai H, Satoh M, Kai Ch. Nakai Y. Pathological features of *Cryptosporidium andersoni*-induced lesions in SCID mice. *Exp. Parasitol.* 2013; 134(3): 381–383.
- Mathieu E, Levy DA, Veverka F, Parrish MK, Sarisky J, Shapiro N, Johnston S, Handzel T, Hightower A, Xiao L, Lee YM, York S, Arrowood M, Lee R, Jones JL. Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004; 71: 582–589.
- Matos O. Zoo and wild mammals. In: Fayer R, Xiao L (eds.). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC Press, 2008; 419–436.

- Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M, Hajiri T, Tani H, Sasai K, Baba E. Infectivity of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 2005; 129: 165–168.
- Matsui T, Fujino T, Tsuji M. Infectivity of hosts of the endogenous stages of chicken and murine *Cryptosporidium*. *J. Vet. Med. Sci.* 1999; 61: 471–474.
- McDonald V, Deer R, Uni S, Iseki M, Bancroft GJ. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect. Immun.* 1992; 60(8): 3325–3331.
- Meamar AR, Rezaian M, Rezaie S, Mohraz M, Kia EB, Houpt ER, Solaymani-Mohammadi S. *Cryptosporidium parvum* bovine genotype oocysts in the respiratory samples of an AIDS patient: efficacy of treatment with a combination of azithromycin and paromomycin. *Parasitol. Res.* 2006; 98: 593–595.
- Melicherová J, Ilgová J, Kváč M, Sak B, Koudela B, Valigurová A. Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology.* 2014; 141: 287–303.
- Meyer-Lucht Y, Sommer S. MHC diversity and the association to nematode parasitism in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*). *Mol. Ecol.* 2005; 14: 2233–2243.
- Minarovičová J, Kaclíková E, Krascenicsová K, Siekel P. Detection of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction. *J. Food Nutr. Res.* 2007; 46: 58–62.
- Miláček P, Vítovec J. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 1985; 32: 50.
- Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RCA. Comparison of PRC and microscopy for detection of *Cryptosporidium*



- parvum* in human fecal specimens: clinical trial. J. Clin. Microbiol. 1998a; 36(4): 995–998.
- Morgan UM, Sargent KD, Deplazes P, Forbes DA, Spano F, Hertzberg H, Elliot A, Thompson RCA. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* from various hosts. Parasitology. 1998b; 117: 31–37
- Morgan UM, Sturdee AP, Singleton G, Gomez MS, Gracenta M, Torres J, Hamilton SG, Woodside DP, Thompson RCA. The *Cryptosporidium* “mouse” genotype is conserved across geographic areas. J. Clin. Microbiol. 1999a; 37: 1302–1305.
- Morgan UM, Xiao L, Fayer R, Graczyk TK, Lal AA, Deplazes P, Thompson RCA. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from random captive reptiles using 18S rDNA sequence data and random amplified polymorphic DNA analysis. J. Parasitol. 1999b; 85(3): 525–530.
- Morgan UM, Xiao L, Monis P, Sulaiman I, Pavlásek I, Blagburn B, Olson M, Upton SJ, Kramtsov NV, Lal AA, Elliot A, Thompson RCA. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* from various hosts. Parasitology. 2000; 120: 457–464.
- Morgan UM, Monis PT, Xiao L, Limor J, Sulaiman I, Raidal S, O’Donoghue P, Gasser R, Murray A, Fayer R, Blagburn BL, Lal AA, Thompson RC. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. Int. J. Parasitol. 2001; 31: 289–296.
- Mullis KB. Process for amplifying nucleic acid sequences. U. S. Patent 4.683.202, 1985.
- Nakai Y, Hikosaka K, Sato M, Sasaki T, Kaneta Y, Okazaki N. Detection of *Cryptosporidium muris* type oocysts from beef cattle in a farm and from domestic and wild animals in and around the farm. J. Vet. Med. Sci. 2004; 66(8): 983–984.

- Neumayerová H, Koudela B. Effects of low and high temperatures on infectivity of *Cryptosporidium muris* oocysts suspended in water. *Vet. Parasitol.* 2008; 153(3-4): 197–202.
- Němejc K, Sak B, Květoňová D, Hanzal V, Jeníková M, Kváč M. The first report on *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) (Czech Republic). *Vet. Parasitol.* 2012; 184(2-4): 122–125.
- Němejc K, Sak B, Květoňová D, Kernerová N, Rost M, Cama VA, Kváč M. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitol. Res.* 2013; 112: 1143–1154.
- Ng J, Pavlásek I, Ryan U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 7548–7553.
- Ng-Hublin JS, Singleton GR, Ryan U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rats and mice from rural communities in the Philippines. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 16: 5–12.
- Nichols RA, Connelly L, Sullivan CB, Smith HV. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in Scottish raw and drinking waters during a one-year monitoring period. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76: 5977–5986.
- Nimri FL, Batchoun R. Prevalence of *Cryptosporidium* species in elementary school children. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 1040–1042.
- O'Brien E, McInnes L, Ryan U. *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. *Exp. Parasitol.* 2008; 118: 118–121.
- O'Donohue PJ. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *J. Parasitol.* 1995; 25: 139–195.
- O'Hara SP, Huang BQ, Chen XM, Nelson J, LaRusso NF. Distribution of *Cryptosporidium parvum* sporozoite apical organelles during attachment to

- and internalization by cultured biliary epithelial cells. *J. Parasitol.* 2005; 91: 995–999.
- Özkul IA, Aydin Y. Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 1994; 55: 129–132.
- Palmer CJ, Xiao L, Terashima A, Guerra H, Gotuzzo E, Saldías G, Bonilla JA, Zhou L, Lindquist, Upton SJ. *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen recovered from a human in Perú. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9: 1174–1176.
- Paparini A, Jackson B, Ward S, Young S, Ryan UM. Multiple *Cryptosporidium* genotypes detected in wild black rats (*Rattus rattus*) from norther Australia. *Exp. Parasitol.* 2012; 131: 404–412.
- Pavlásek I, Lávička M. The first finding of a spontaneous gastric cryptosporidiosis infection in hamsters (*Phodopus roborovskii* Satunin, 1903) *Vet. Med.* 1995; 40: 261–263.
- Pavlásek I, Ryan U. The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Vet. Parasitol.* 2007; 144(3–4): 349–352.
- Pedersen C, Danner S, Lazzarin A, Glauser MP, Weber R, Katlama C, Barton SE, Lundgren JD. Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients. *Genitourin Med.* 1996; 72(2): 128–131.
- Pedraza-Díaz S, Amar C, McLauchlin J. The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiol. Leters.* 2000; 189(2): 189–194.
- Pedraza-Díaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7(1): 49–56.
- Pedraza-Díaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7: 49–56.

- Pedraza-Díaz S, Ortega-Mora LM, Carrión BA, Navarro V, Gómez-Bautista M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. *Vet. Parasitol.* 2009; 160: 204–210.
- Perec-Matysiak A, Bunkowska-Gawlik K, Zalesny G, Hildebrand J. Small rodents as reservoirs of *Cryptosporidium* spp. And *Giardia* spp. in south-western Poland. *Ann. Agricult. Environ. Med.* 2015; 22(1): 1–5.
- Perron GG, Lee AE, Wang Y, Huang WE, Barraclough TG. Bacterial recombination promotes the evolution of multi-drug-resistance in functionally diverse populations. *Proc. Biol. Sci.* 2012; 279: 1477–1484.
- Perz JF, le Blancq SM. *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(3): 1154–1162.
- Piálek J, Vyskočilová M, Bimová B, Havelková D, Piálková J, Dufková P, Bencová V, Ďureje L, Albrecht T, Hauffe HC, Macholán M, Munclinger P, Storchová R, Zajíčková A, Holáň V, Gregorová S, Forejt J. Development of unique house mouse resources suitable for evolutionary studies of speciation. *J. Hered.* 2008; 99: 34–44.
- Pinto DJ, Vinayak S. *Cryptosporidium*: Host-parasite interactions and pathogenesis. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 2021; 8: 62–67.
- Pospischil A, Stiglmair-Herb MT, von Hegel G, Wiesner H. Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Vet. Rec.* 1987; 121(16): 379–380.
- Power ML, Ryan UM. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J. Parasitol.* 2008; 95: 1114–1117.
- Prediger J, Horčíčková M, Hofmannová L, Sak B, Ferrari N, Mazzamuto MV, Romeo C, Wauters LA, McEvoy J, Kváč M. Native and introduced squirrels in Italy host different *Cryptosporidium* spp. *Eur. J. Protist.* 2017; 61: 64–75.
- Preiser G, Preiser L, Madeo L. An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. *Vet. Record.* 2003; 51: 213–215.

- Puleston RL, Mallaghan CM, Modha DE, Hunter PR, Nguyen-Van-Tam JS, Regan CM, Nichols GL, Chalmers RM. The first recorded outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium cuniculus* (formerly rabbit genotype), following a water quality incident. *J. Water Health*. 2014; 12(1): 41–50.
- Rahman AS, Sanyal SC, Al-Mahmud KA, Sobhan A. *Cryptosporidium* diarrhoea in calves and their handlers in Bangladesh. *Indian J. Med. Res.* 1985; 82: 510–516.
- Rajabi-Maham H, Orth A, Bonhomme F. Phylogeography and postglacial expansion of *Mus musculus domesticus* inferred from mitochondrial DNA coalescent, from Iran to Europe. *Mol. Ecol.* 2008; 17: 627–641.
- Randler C. Assortative mating of carrion *Corvus corone* and hooded crows *C. cornix* in the hybrid zone in eastern Germany. *Ardea*. 2009; 95(1): 143–149.
- Rasmussen KR, Healey MC. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. *Infect. Immun.* 1992; 60: 1648–1652.
- Ren X, Zhao L, Zhang L, Ning Ch, Jian F, Wang R, Lv Ch, Wang R, Arrowood MJ, Xiao L. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.* 2012; 130: 274–281.
- Rhee JK, Kim HC, Eun GS. Infection kinetics and developmental biology of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in Korean native kids and Corriedale lambs. *Korean J. Parasitol.* 1998; 36: 171–181.
- Ribeiro CD, Palmer SR. Family outbreak of cryptosporidiosis. *Brit. Med. J.* 1986; 292: 377.
- Riggs MW, Stone AL, Yount PA, Langer RC, Arrowood MJ, Bentley DL. Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *J. Immunol.* 1997; 158: 1787–1795.
- Robertson LJ, Greig JD, Gjerde B, Fazil A. The potential for acquiring cryptosporidiosis or giardiasis from consumption of mung bean sprouts in

- Norway, a preliminary step-wise risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 2005; 98: 291–300.
- Robertson LJ, Björkman C, Axén C, Fayer R. Cryptosporidiosis in farmed animals. In: Cacciò SM, Widmer G (eds.). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer, 2014; 149–235.
- Robinson G, Wright S, Elwin K, Hadfield SJ, Katzer F, Bartley PM, Hunter PR, Nath M, Innes EA, Chalmers RM. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* 2010; 40(13): 1539–1548.
- Robinson G, Chalmers RM, Stapleton C, Palmer SR, Watkins J, Francis C, Kay D. A whole water catchment approach to investigating the origin and distribution of *Cryptosporidium* species. *J. Appl. Microbiol.* 2011; 111: 717–730.
- Rose JB. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Ann. Rev. Publ. Health.* 1997; 18: 135–171.
- Ruecker NJ, Matsune JC, Wilkes G, Lapen DR, Topp E, Edge TA, Sensen CW, Xiao L, Neumann NF. Molecular and phylogenetic approaches for assessing sources of *Cryptosporidium* contamination in water. *Water Res.* 2012; 46: 5135–5150.
- Ryan UM, Xiao L, Read C, Zhou L, Lal AA, Pavlásek I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69: 4302–4307.
- Ryan UM, Bath C, Robertson I, Read C, Elliot A, McInnes L, Traub R, Besier B. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Appl. Env. Microbiol.* 2005; 71: 4992–4997.
- Ryan UM, Xiao L. Taxonomy and molecular taxonomy. In: Cacciò SM, Widmer G (eds.). *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer, 2014; 3–42.

- Ryan UM, Paparini A, Tong K, Yang R, Gibson-Kueh SS, O'Hara A, Lymbery A, Xiao L. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp. Parasitol.* 2015; 150: 31–35.
- Saitou N. Property and efficiency of the maximum likelihood method for molecular phylogeny. *J. Mol. Evol.* 1988; 27: 261–273.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4(4): 406–425.
- Sak B, Kváč M, Květoňová D, Albrecht T, Piálek J. The first report on natural *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. Infections in wild east-European house mice (*Mus musculus musculus*) and west-European house mice (*Mus musculus domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic-Germany border. *Vet. Parasitol.* 2011; 178: 246–250.
- Sak B, Petrželková KJ, Květoňová D, Mynářová A, Shutt KA, Pomajbíková K, Kalousová B, Modrý D, Benavides J, Todd A, Kváč M. Long-term monitoring of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at different stages of habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *PLoS One.* 2013; 8: 1–10.
- Santín M, Dixon BR, Fayer R. Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from ringed seals (*Phoca hispida*) in Northern Quebec, Canada. *J. Parasitol.* 2005; 91: 712–716.
- Santín M, Trout JM, Fayer R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet. Parasitol.* 2007; 146: 17–24.
- Santín M, Trout JM. Livestock. In: Fayer R, Xiao L (eds.). *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. CRC Press, 2008, 451–483.
- Satoh M, Hikosaka K, Sasaki T, Suyama Y, Yanai T, Ohta M, Nakai Y. Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69: 691–692.

- Sauch JF, Flanigan D, Galvin ML, Berman D, Jakubowski W. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991; 57: 3243–3247.
- Searle JB, Jamieson PM, Gündüz I, Stevens MI, Jones EP, Gemmill CE, King CM. The diverse origins of New Zealand house mice. *Proc. Biol. Sci.* 2009; 276: 209–217.
- Shahiduzzaman M, Dauschies A. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Vet. Parasitol.* 2012; 188: 203–214.
- Silva SO, Richtzenhain LJ, Barros IN, Gomes AMMC, Silva AV, Kozerski ND, Araújo Ceranto JB, Keid LB, Soares RM. A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. *Exp. Parasitol.* 2013; 135: 551–557.
- Silverlas C, Bosaeus-Reineck H, Naslund K, Bjorkman C. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? *Int. J. Parasitol.* 2012; 43(2): 155–161.
- Simpson VR. Wild animals as reservoirs of infectious diseases in the UK. *Vet. J.* 2002; 163: 128–146.
- Sinski E, Hlebowicz E, Bednarska M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* infection in wild small mammals in District of Mazury Lake (Poland). *Acta Parasitol.* 1993; 38: 59–61.
- Sinski E, Bednarska M, Bajer A. The role of wild rodents in ecology of cryptosporidiosis in Poland. *Folia Parasitol.* 1998; 45: 173–174.
- Smith HV, Cacciò SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RCA. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol.* 2006; 22: 160–167.
- Soba B, Logar J. Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology.* 2008; 135(11): 1263–1270.



- Song J, Kim CY, Chang SN, Abdelkader TS, Han J, Kim TH, Oh H, Lee JM, Kim DS, Kim JT, Oh HS, Hur M, Suh JH, Park JH. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rodents and insectivores in South Korea. *The Korean J. Parasitol.* 2015; 53: 737–743.
- Spano F, 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. Letters.* 1997; 150: 209–217.
- Spano F, Putignani L, Naitza S, Puri C, Wright S, Crisanti A. Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1998; 92: 147–162.
- Sponseller JK, Griffiths JK, Tzipori S. The evolution of respiratory cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(3): 575–586.
- Sréter T, Egyed Z, Szell Z, Kovacs G, Nikolausz M, Marialigeti K, Varga I. Morphologic, host specificity and genetic characterization of a European *Cryptosporidium andersoni* isolate. *J. Parasitol.* 2000; 86(6): 1244–1249.
- Stensvold CR, Beser J, Axén C, Lebbad M. High applicability of a novel method for gp60-based subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 2311–2319.
- Stenger BL, Clark ME, Kváč M, Khan E, Giddings CW, Dyer NW, Schultz JL, McEvoy JM. Highly divergent 18S rRNA gene paralogs in a *Cryptosporidium* genotype from eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Infect. Genet. Evol.* 2015; 32: 113–123.
- Stenger BLS, Horčíčková M, Clark ME, Kváč M, Čondlová Š, Khan E, Widmer G, Xiao L, Giddings CW, Pennil C, Stanko M, Sak B, McEvoy JM. *Cryptosporidium* infecting wild cricetid rodents from subfamilies Arvicolinae and Neotominae. *Parasitology.* 2018; 145(3): 326–334.

- Stuart P, Golden O, Zint A, de Waal T, Mulcahy G, McCarthy E, Lawton C. A coprological survey of parasites of wild carnivores in Ireland. *Parasitol. Res.* 2013; 112: 3587–3593.
- Sturdee AP, Chalmers RM, Bull SA. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Vet. Parasitol.* 1999; 80(4): 273–280.
- Sulaiman IM, Lal AA, Xiao L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J. Parasitol.* 2002; 88: 388–394.
- Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Sheweiki HM, Iqbal J, Khalid N, Xiao L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43, 2805–2809.
- Sunnotel O, Lowery CJ, Moore JE, Dooley JSG, Xiao L, Millar BC, Rooney PJ, Snelling WJ. *Cryptosporidium*. *Letters Appl. Microbiol.* 2006; 43(1): 7–16.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28: 2731–2739.
- Tanriverdi S, Arslan MO, Akiyoshi DE, Tzipori S. Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. *Mol. Bioch. Parasitol.* 2003; 130(1): 13–22.
- Tanriverdi S, Markovics A, Arslan O, Itik A, Shkap V, Widmer G. Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 2507–2513.
- Tarazona R, Blewett DA, Carmona MD. *Cryptosporidium parvum* in experimentally infected mice: infection dynamics and effect of immunosuppression. *Folia Parasitol.* 1998; 45: 101–107.
- Taylor MA, Marshall RN, Green JA, Catchpole J. The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. *Vet. Parasitol.* 1999; 86: 41–48.

- Teeter KC, Thibodeau LM, Gompert Z, Buerkle CA, Nachman MW, Tucker PK. The variable genomic architecture of isolation between hybridizing species of house mice. *Evolution*. 2010; 64: 472–485.
- Tiangtip R, Jongwutiwes S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health*. 2002; 7: 357–364.
- Tilley M, Upton SJ, Chrisp CE. A comparative study on the biology of *Cryptosporidium* sp. from guinea pigs and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *Can. J. Microbiol.* 1991; 37: 949–952.
- Thompson RCA, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi NS. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 2005; 59: 77–158.
- Torres J, Gracenea M, Gomez MS, Arrizabalaga A, Gonzalez-Moreno O. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Vet. Parasitol.* 2000; 92: 253–260.
- Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, Martin SW, Nydam DV, Jamieson F, Xiao L. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitol. Res.* 2006; 99(4): 346–52.
- Trout JM, Santín M, Fayer R. *Giardia* and *Cryptosporidium* species and genotypes in coyotes (*Canis latrans*). *J. Zoo. Wildlife Med.* 2006; 37: 141–144.
- Tsuchiya K, Miyashita N, Wang CH, Wu XL, He QX, Jin ML, Li H, Wang FS, Shi LM, Moriwaki K. Taxonomic study of the genus *Mus* in China, Korea and Japan – morphologic identification. In: Moriwaki K, Shiroishi T, Yonekawa H (eds.). *Genetics and wild mice*. Jpn. Sci. Soc. Press, 1994; 3–12.
- Tyzzar EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1907; 5: 12–13.
- Tyzzar EE. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et. sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 1910; 23: 487–509.

- Tyzzar EE. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenkd. 1912; 26: 394–412.
- Tzipori S. Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol. Rev. 1983; 47: 84–96.
- Upton SJ, Current WL. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. J. Parasitol. 1985; 71: 625–629.
- Umemiya R, Fukuda M, Fujisaki K, Matsui T. Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice. J. Parasitol. 2005; 91: 1034–1039.
- Valigurová A, Jirků M, Koudela B, Gelnar M, Modrý D, Šlapeta J. *Cryptosporidia*: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. Int. J. Parasitol. 2008; 38: 913–922.
- Valigurová A, Perková R, Doležal K, Sak B, Květoňová D, Kváč M, Nurcahyo W, Foitová I. Folia Parasitol. 2018; 65: 1–17.
- Valenzuela O, González-Díaz M, Garybay-Escobar A, Burgara-Estrella A, Cano M, Durazo M, Bernal RM, Hernandez J, Xiao L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in children from Mexico. PLoS One. 2014; 9: 1–5.
- Van de Peer Y, De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Comput. Appl. Biosci. 1994; 10, 569–570.
- Van Dyke MI, Ong CSL, Prystajek NA, Isaac-Renton JL, Huck PM. Identifying host sources, human health risk and indicators of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a Canadian watershed influenced by urban and rural activities. J. Water Health. 2012; 10(2): 311–323.
- Vetterling JM, Takeuchi A, Madden PA. Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. J. Protozool. 1971; 18: 248–260.

- Villacorta I, Peeters JE, Vanopdenbosch E, Ares-Mazás E, Theys H. Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1991; 35(2): 283–287.
- Vítovec J, Hamadejová K, Landová L, Kváč M, Květoňová D, Sak B. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *J. Vet. Med. B.* 2006; 53(5): 239–243.
- Wagnerová P, Sak B, McEvoy J, Rost M, Matysiak A, Ježková J, Kváč M. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland. *Parasitol. Res.* 2015; 114: 1619–1624.
- Waldron LS, Cheung-Kwok-Sang C, Power ML. Wildlife-associated *Cryptosporidium fayeri* in human., Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 12: 2006–2007.
- Wang L, Luzynski K, Pool JE, Janoušek V, Dufková P, Vyskočilová MM, Teeter KC, Nachman MW, Munclinger P, Macholán M, Piálek J, Tucker PK. Measures of linkage disequilibrium among neighbouring SNPs indicate asymmetries across the house mouse hybrid zone. *Mol. Ecol.* 2011; 20: 2985–3000.
- Wang L, Cao L, Zheng S, Chang Y, Zhang K, Zhang S, Zhang L. Molecular identification and biological characterization of *Cryptosporidium muris* from camels (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasit. Vectors.* 2021; 14(1): 365.
- Wang R, Wang J, Sun M, Dang H, Feng Y, Ning C, Jian F, Zhang L, Xiao L. Molecular characterization of the *Cryptosporidium cervine* genotype from a sika deer (*Cervus nippon Temnick*) in Zhengzhou, China and literature review. *Parasitol. Res.* 2008; 103: 865–869.
- Wang R, Jian F, Zhang L, Ning C, Liu A, Zhao J, Feng Y, Qi M, Wang H, Lv C, Zhao G, Xiao L. Multilocus sequence subtyping and genetic structure of *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *PLoS One.* 2012; 7: 1–8.

- Wang T, Chen Z, Xie Y, Hou R, Wu Q, Gu X, Lai W, Peng X, Yang G. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) in Sichuan province, China. *Parasit. Vectors.* 2015; 8: 344.
- Wang Y, Feng Y, Cui B, Funchun J, Ning C, Wang R, Zhang L, Xiao L. Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. *Parasitol. Res.* 2010; 106: 341–347.
- Wasimuddin W, Čížková D, Bryja J, Albrechtová J, Hauffe HC, Piálek J. High prevalence and species diversity of *Helicobacter* spp. Detected in wild house mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78: 8158–8160.
- Watanabe Y, Yang CH, Ooi HK. *Cryptosporidium* infection in livestock and first identification of *Cryptosporidium parvum* genotype in cattle feces in Taiwan. *Parasitol. Res.* 2005; 97: 238–241.
- Wetzel DM, Schmidt J, Kuhlenschmidt MS, Dubey JP, Sibley LD. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect. Immun.* 2005; 73: 5379–5387.
- Widerström M, Schönning C, Lilja M, Lebbad M, Ljung T, Allestam G, Ferm M, Björkholm B, Hansen A, Hiltula J, Långmark J, Löfdahl M, Omberg M, Reuterwall C, Samuelsson E, Widgren K, Wallensten A, Lindh J. Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(4): 581–589.
- Widmer G, Klein P, Bonilla R. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology.* 2007; 134: 1583–1588.
- Wielinga PR, de Vries A, van der Groot TH, Mank T, Mars MH, Kortbeek LM, van der Giessen JW. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int. J. Parasitol.* 2008; 38(7): 809–817.
- Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 2010; 124(1): 80–89.

- Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RCA, Fayer R, Lal AA. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999a; 65(8): 3386–3391.
- Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Rayer R, Lal AA. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999b; 65(4): 1578–1583.
- Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000a; 66: 5492–5498.
- Xiao L, Limor J, Morgan UM, Sulaiman IM, Thompson RCA, Lal AA. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000b; 66(12): 5499–5502.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004a; 72–97.
- Xiao L, Ryan UM, Graczyk TK, Limor J, Lixia L, Kombert M, Junge R, Sulaiman IM, Zhou L, Arrowood MJ, Koudela B, Modrý D, Lal AA. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Appl. Env. Microbiol.* 2004b; 70: 891–899.
- Xiao L, Ryan UM. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2004; 17: 483–490.
- Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* 2008; 38: 1239–1255.
- Xiao L, Feng Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008; 52: 309–323.

- Yamamoto N, Urabe K, Takaoka M, Nakazawa K, Gotoh A, Haga M, Fuchigami H, Kimata I, Iseki M. Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. *Kansenshogaku Zasshi*. 2000; 74: 518–526.
- Yamura H, Shirasaka R, Asahi H, Koyama T, Motoki M, Ito H. Prevalence of *Cryptosporidium* infection among house rats, *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, in Tokyo, Japan and experimental cryptosporidiosis in roof rats. *Jpn. J. Parasitol.* 1990; 39: 439–444.
- Ye J, Xiao L, Wang Y, Wang L, Amer S, Roelling DM, Guo Y, Feng Y. Periparturient transmission of *Cryptosporidium xiaoi* from ewes to lambs. *Vet. Parasitol.* 2013; 197: 627–633.
- Zahedi A, Paparini A, Jian F, Robertson I, Ryan U. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: clinical insights into better drinking water management. *Int. J. Parasitol.: Parasit. Wildl.* 2016; 5: 88–109.
- Zhao GH, Ren WX, Gao M, Bian QQ, Hu B, Cong MM, Lin Q, Wang RJ, Qi M, Qi MZ, Zhu XQ, Zhang LX. Genotyping *Cryptosporidium andersoni* in cattle in Shaanxi province, northwestern China. *PLoS One*. 2013; 8: 1–7.
- Zhao GH, Du SZ, Wang HB, Hu XF, Deng MJ, Yu SK, Zhang LX, Zhu XQ. First report of zoonotic *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in golden takins (*Budorcas taxicolor bedfordi*). *Infect. Genet. Evol.* 2015a; 34: 394–401.
- Zhao Z, Wang R, Zhao W, Qi M, Zhao J, Zhang L, Li J, Liu A. Genotyping and subtyping of *Giardia* and *Cryptosporidium* isolates from commensal rodents in China. *Parasitology*. 2015b; 142: 800–806.
- Zhou L, Singh A, Jiang J, Xiao L. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 5254–5257.



- Zhou L., Fayer R, Trout JM, Ryan UM, Schaefer FW III., Xiao L. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 7574–7577.
- Ziegler PE, Wade SE, Schaaf SL, Chang YF, Mohammed HO. *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York city watershed. *J. Wildl. Dis.* 2007; 43(4): 586–596.
- Zintl A, Proctor AF, Read C, Dewaal T, Shanaghy N, Fanning S, Mulcahy G. The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. *Epidemiol. Infect.* 2009; 137: 270–277.
- Zintl A, Ezzaty-Mirashemi M, Chalmers RM, Elwin K, Mulcahy G, Lucy FE, De Waal T. Longitudinal and spatial distribution of GP60 subtypes in human cryptosporidiosis cases in Ireland. *Gastroint. Infect.* 2011; 139: 1945–1955.
- Zolotareva KI, Belokon MM, Belokon YS, Rutovskaya MV, Hlyap LA, Starykov VP, Politov DV, Lebedev VS, Bannikova AA. Genetic diversity and structure of the hedgehogs *Erinaceus europaeus* and *Erinaceus roumanicus*: evidence for ongoing hybridization in eastern Europe. *Biol. J. Linn. Soc.* 2020; 20: 1–22.