

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

MVDr. Jitka Prediger

**České Budějovice
2022**

Autoreferát disertační práce

Doktorand: MVDr. Jitka Prediger
Studijní program: Zootechnika
Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat
Název práce: Kryptosporidie a kryptosporidióza stromových a zemních veverek
Školitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
Oponenti: doc. Ing. Petr Sláma, Ph.D.
RNDr. Klára Petrželková, Ph.D.
prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.

Obhajoba disertační práce se koná dne 22. 9. 2022 v 11.00 v pavilonu M v místnosti vědecké rady ZF JU.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

SEZNAM IMPAKTOVANÝCH PUBLIKACÍ

Disertační práce vychází z těchto publikací:

- **Prediger J.**, Ježková J., Holubová N., Sak B., Konečný R., Rost M., McEvoy J., Rajský D., Kváč M. 2021: *Cryptosporidium sciurinum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Microorganisms* 9(10): 2050.
- **Prediger J.**, Horčíčková M., Hofmannová L., Sak B., Ferrari N., Mazzamuto M.V., Romeo C., Wauters L.A., McEvoy J., Kváč M. 2017: Native and introduced squirrels in Italy host different *Cryptosporidium* spp. *European Journal of Protistology* 61(Pt A): 64–75.
- Stenger B.L.S., Clark M.E., Kváč M., Khan E., Giddings C.W., **Prediger J.**, McEvoy J.M. 2015: North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes. *Infection, Genetics and Evolution* 36: 287–293.

PRÁCE VZNIKLA ZA PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH GRANTŮ

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

ANOTACE

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

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

ANNOTATION

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

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

SOUHRN

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

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

Cryptosporidium sp. ferret genotyp byl s ohledem na jeho časté rozšíření v populaci původních veverek obecných podrobněji studován. Molekulární multilokusová genotypizace prokázala, že *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp se geneticky liší od ostatních druhů rodu *Cryptosporidium*. Podrobné studium biologických charakteristik ukázalo, že oocysty *Cryptosporidium* sp. ferret genotypu nejsou infekční pro laboratorní myši (*Mus musculus*), pískomily mongolské (*Meriones unguiculatus*), mastomyši (*Mastomys coucha*),

kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*) nebo andulky vlnkované (*Melopsittacus undulatus*). Oocysty *Cryptosporidium* sp. ferret genotypu v průměru měří $5,54 \times 5,22 \mu\text{m}$, jsou bezbarvé, sférické. Standardní barvicí metody a specifické protilátky barví a značí oocysty *Cryptosporidium* sp. ferret genotypu jako ostatní druhy a genotypy kryptosporidií. Intenzita infekce u volně žijících veverek se liší podle věku, přičemž největší intenzita infekce byla zjištěna u juvenilních jedinců. Na základě našich výsledků byl *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp popsán jako nový samostatný druh *Cryptosporidium sciurinum*.

SUMMARY

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

The *Cryptosporidium* sp. ferret genotype was studied in more detail given its frequent distribution in the native squirrel population. Multilocus molecular genotyping revealed that the *Cryptosporidium* sp. ferret genotype is genetically distinct from other species of the genus *Cryptosporidium*. A detailed examination of the biological characteristics showed that oocysts of the *Cryptosporidium* sp. ferret genotype are not infectious to laboratory mice (*Mus*

musculus), Mongolian gerbils (*Meriones unquiculatus*), mastomys (*Mastomys coucha*), domestic chickens (*Gallus gallus* f. *domestica*), or budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Cryptosporidium* sp. ferret genotype oocysts measure $5.54 \times 5.22 \mu\text{m}$ in diameter, are colourless, and spherical. Standard staining methods and specific antibodies staining label oocysts of the *Cryptosporidium* sp. ferret genotype like other species and genotypes of the genus *Cryptosporidium*. The intensity of infection in wild squirrels varies with age, with the greatest intensity of infection found in young animals. Based on our results, the *Cryptosporidium* sp. ferret genotype was described as a new separate species, *Cryptosporidium sciurinum*.

ÚVOD

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

Oocysty kryptosporidií jsou velice odolné, v příznivých podmínkách (chladné a vlhké prostředí) zůstávají infekční velmi dlouhou dobu a na své hostitele jsou přenášeny fekálně–orální cestou. Nejčastější způsob infekce je přenos kontaminovanou vodou a potravinami (Smith et al. 1998, Fayer et al. 2000). Oocysty kryptosporidií jsou odolné vůči dezinfekčním prostředkům, které jsou běžně užívané při hygienickém ošetření pitné vody, v důsledku toho se staly velkým problémem v oblasti veřejného zdraví (Xiao et al. 2000, Hassan et al. 2021). K nejrozsáhlejší epidemii došlo v roce 1993 v Milwaukee v USA, kde bylo vodou kontaminovanou *C. hominis* infikováno více než 400 tisíc lidí (Mackenzie et al. 1994), nicméně případy zoonotických infekcí a přenosy infekce z člověka na člověka nejsou výjimečné. Přestože primárním zdrojem oocyst pro člověka zůstávají mláďata domácích přežvýkavců a lidí, jako hostitelé zoonotických kryptosporidií byla popsána řada domestikovaných i volně žijících živočichů včetně hlodavců (O'donoghue 1995, Xiao et Feng 2008, Caccio et Putignani 2014, Luka et al. 2022)

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

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

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

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

CÍLE PRÁCE

Tato práce zahrnuje poznatky o prevalenci, diverzitě a biologii kryptosporidií u hlodavců podčeledi Sciurinae.

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

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

HYPOTÉZY

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

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

KOMENTÁŘ K VÝSLEDKŮM

Všechny dosažené výsledky (obrázky, grafy, tabulky), použitý materiál, metody a použitou literaturu lze najít v disertační práci.

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

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

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

ND - nevyšetřeno

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

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

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

U sysla páskovaného, psouna prériového a sysla zlatavého jsme zjistili 70 %, 35 % a 100 % prevalenci kryptosporidií, což je výrazně vyšší promořenost jak ve srovnání se stromovými veverkami žijícími ve stejné oblasti (Stenger et al. 2015b), tak i s výsledky Atwill et al. (2004), kteří popsali 12% prevalenci u sysla veveřího v Kalifornii, USA. Obdobně nízké prevalence zjistili i Pereira et al. (2010), kteří detekovali oocysty kryptosporidií u 20 % syslů veveřích, 22 % syslů zlatavých a 14 % syslů Beldingových.

Zajímavé je srovnání našich výsledků (Příloha 1) s výsledky Pereira et al. (2010). V naší práci byl podíl *C. rubeyi* na všech kryptosporidiových infekcích 18 %, což odpovídá 14–22 % prevalenci *C. rubeyi* u zemních veverek ve výše zmíněné studii. Celkem 82 % námi

genotypovaných vzorků připadlo na další druhy a genotypy kryptosporidií, přičemž dominantními byly *Cryptosporidium* sp. ground squirrel genotyp I a III (Tabulka 2).

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

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

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

V rámci naší studie (Příloha 1) nebyla řada vzorků pozitivních molekulárně na přítomnost specifických genů kryptosporidií úspěšně sekvenována. Toto lze vysvětlit přítomností dvou a více různých druhů/genotypů kryptosporidií v jednom vzorku (smíšená infekce). Při přímém sekvenování PCR produktů obsahujícím více než jednu unikátní sekvenci dochází k překryvu bází a výsledná data ze sekvenátoru tak mohou být nečitelná. K tomuto dochází zejména, pokud se sekvence různých druhů od sebe značně liší nebo je u jedné ze sekvencí delece nebo inzert části sekvence (Tanriverdi et al. 2003, Tanriverdi et al. 2007).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

V rámci studie jsme získali dostatek oocyst *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp z veverky obecné ze záchranné stanice v Třeboni, ale z logistických důvodů nebylo možné zjistit infekční dávku veverek za experimentálních podmínek. Proto byla určena intenzita infekce u jedinců různého věku v záchranných stanicích. Devět z jedenácti juvenilních jedinců vylučovalo mikroskopicky detekovatelné oocysty (18 000–74 000 OPG). Naproti tomu

veverky starší 10 týdnů vylučovaly oocysty pod mikroskopicky detekovatelným limitem (2 000 OPG; Příloha 3). Nejvyšší intenzitu infekce (49 666 OPG) vykazovala skupina zvířat starých 6–7 týdnů. Skupina ve věku 4–5 týdnů a 8–9 týdnů vylučovala oocysty v množství okolo 20 000 OPG. To je shodné s předešlými studiemi, kdy dospělí jedinci vykazovali slabou pozitivitu zachytitelnou pouze PCR vyšetřením, kdežto mláďata vylučovala mikroskopicky detekovatelné množství oocyst (Kváč et al. 2008, Prediger et al. 2017). Tato věková specifita kryptosporidií byla dříve popsána v řadě studií (Sreter et al. 1995, Rhee et al. 1999, Pavlásek 2001, Kváč et al. 2009, Holubová et al. 2018, Horčíčková et al. 2019). Juvenilní jedinci jsou pravděpodobně náchylnější k infekci kvůli naivnímu a nevyzrálému imunitnímu systému, což má za následek horší průběh infekce projevující se vyšším množstvím vylučovaných oocyst.

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

Výsledky experimentálních infekcí ukázaly, že oocysty *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp nejsou infekční pro laboratorní myši (BALB/c a SCID), pískomily mongolské, mastomyši, kuřata nebo andulky vlnkované. Jediná popsána infekce andulky vlnkované mohla být zapříčiněna kontaminací a pasáží oocyst nebo DNA zaživacím traktem nespecifického hostitele, jak bylo popsáno v mnoha předchozích studiích (Crawshaw et Mehren 1987, Graczyk et Cranfield 1998, Graczyk et al. 1998, Kváč et al. 2012). Velikost oocyst *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp, které jsme měřili po purifikaci v roztoku, měly velikost $5,54 \times 5,22 \mu\text{m}$, s poměrem délky k šířce 1,07. Jsou větší než *C. parvum* ($5,2 \times 4,9 \mu\text{m}$) nebo *C. rattii* ($4,9 \times 4,6 \mu\text{m}$) a menší než *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I ($5,8 \times 5,4 \mu\text{m}$) (Kváč et al. 2008, Ježková et al. 2021b). Mikroskopické rozdíly však bohužel nejsou použitelné pro rutinní diagnostiku. Oocysty jsou bezbarvé, sférické a tlustostěnné. Vykazují stejné barvicí charakteristiky jako ostatní druhy a genotypy kryptosporidií, ať už se jedná o barvení dle Ziehl-Neelsena nebo Miláčka-Vítovce, a zkříženě reagují s imunofluorescenčními reagensy vyvinutými pro *C. parvum*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ZÁVĚRY

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