JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Kryptosporidie a kryptosporidióza synantropně žijících hlodavců

RNDr. Jana Ježková

České Budějovice
2023

Autoreferát disertační práce

Doktorand:	**RNDr. Jana Ježková**
Studijní program:	Zootechnika
Studijní obor:	Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat
Název práce:	Kryptosporidie a kryptosporidióza synantropně žijících hlodavců
Školitel:	prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
Oponenti:	doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc. doc. Ing. Petr Sláma, Ph.D. Ing. Tomáš Zelený, PhD.

Obhajoba disertační práce se koná dne 15.12.2023 od 13.00 hodin v pavilonu ZR, 1. patro, zasedací místnost KGZB.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Fakulty zemědělské a techologické JU v Českých Budějovicích.

SEZNAM IMPAKTOVANÝCH PUBLIKACÍ

Disertační práce vychází z těchto publikací:

- Kváč M., Vlnatá G., **Ježková J.**, Horčičková M., Konečný R., Hlásková L., McEvoy J., Sak B. 2018: *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. European Journal of Protistology 63: 96–104.

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

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

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

- Tůmová L., **Ježková J.**, Prediger J., Holubová N., Sak B., Konečný R., Květoňová D., Hlásková L., Rost M., McEvoy J., Xiao L., Santín M., Kváč M. 2023: *Cryptosporidium mortiferum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae), the species causing lethal cryptosporidiosis in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*). Parasites & Vectors 16: 235.

- **Ježková J.**, Holubová N., Kvičerová J., Matějů J., Sak B., Kváč M. 2023: European ground squirrels *Spermophilus citellus* (Linnaeus) do not share identical *Cryptosporidium* spp. with North American ground squirrels. Folia Parasitologica 70: 016.

PRÁCE VZNIKLA ZA PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH GRANTŮ

GAJU 016/2020/Z - Synantropní hlodavci: Hostitelé zoonotických a hostitelsky specifických kryptosporidií (2020; řešitelka, 191 000 Kč).

GAJU 006/2021/Z - Tajemství excystace žaludečních a střevních parazitů rodu *Cryptosporidium* (kmen Apicomplexa) (2021; řešitelka, 191 000 Kč).

GAJU 015/2022/Z - Diverzita kryptosporidií hlodavců v Asii: na stopě hostitele *Cryptosporidium viatorum* (2022; řešitelka, 179 000 Kč).

GAJU 002/2016/Z - Genetics, animal health and product quality as a basis for competitiveness (2016–2018; členka řešitelského týmu, 3 204 000 Kč).

GAJU 005/2022/Z - One Health: genetic, environmental and technological factors affecting animal production, food quality and safety, and animal and human health (2022–2024; členka řešitelského týmu, 4 290 000 Kč).

GAJU 028/2019/Z - Genetics, animal health and biologically and sensory active substances as a prerequisite for quality food and agricultural raw materials (2022–2024; členka řešitelského týmu, 4 931 000 Kč).

GACR 18-12364S - Bird derived *Cryptosporidium*: Filling knowledge gaps within unjustifiably marginalized group of hosts (2022–2024; členka řešitelského týmu, 5 319 000 Kč).

ANOTACE

Zástupci rodu *Cryptosporidium* (Apicomplexa) parazitují v tělech poikilotermních i homoiotermních obratlovců včetně člověka. Jedná se o jednohostitelské, jednobuněčné a epicelulární parazity. Zatímco kryptosporidiím lidí a hospodářských zvířat byla věnována celá řada studií, výzkum na dalších obratlovcích včetně synantropních hlodavců zaostává. Znalosti o biologických vlastnostech jednotlivých druhů a genotypů jsou ve většině případech nedostatečné nebo zcela chybějící. Do současné doby bylo popsáno 51 platných druhů kryptosporidií a byly detekovány nižší stovky genotypů, o kterých neexistuje dostatečné množství údajů, aby bylo možné je považovat za platné druhy. Tato disertační práce výrazně rozšiřuje znalosti o kryptosporidiích specifických pro synantropní hlodavce, zaměřuje se na jejich výskyt a diverzitu v rámci tří čeledí a 12 rodů, hostitelskou a orgánovou specifitu, morfologii vývojových stádií, patogenitu a jejich přenos. Mimo jiné, výsledky získané v této práci přispěli k popisu pěti druhů a 14 genotypů specifických pro synantropní hlodavce.

ANNOTATION

Representatives of the genus *Cryptosporidium* (Apicomplexa) parasitize the bodies of poikilothermic and homoiothermic vertebrates, including humans. They are single-host, unicellular and epicellular parasites. While a number of studies have been devoted to cryptosporidia of humans and livestock, research on other vertebrates, including synanthropic rodents, has lagged behind. Knowledge of the biological characteristics of individual species and genotypes is in most cases inadequate or completely lacking. To date, 51 valid species of cryptosporidia have been described and lower hundreds of genotypes have been detected for which there is insufficient data to consider them as valid species. This dissertation significantly advances the knowledge of cryptosporidia specific to synanthropic rodents, focusing on their occurrence and diversity within three families and 12 genera, host and organ specificity, developmental stage morphology, pathogenicity and transmission. Among others, the results obtained in this work contributed to the description of five species and 14 genotypes specific to synanthropic rodents.

SOUHRN

Předmětem předložené disertační práce je studium výskytu a diverzity kryptosporidií synantropních hlodavců. V průběhu studia bylo vyšetřeno pomocí mikroskopických a molekulárních metod 1256 vzorků trusu synantropních hlodavců ze 3 čeledí a 12 rodů z pěti zemí. Z toho 743 vzorků z České republiky, 136 ze Slovenska, 63 z Filipín, 47 z Kambodži a 267 z Thajska. Pouze 13 vzorků bylo mikroskopicky pozitivních na přítomnost oocyst kryptosporidií. Specifická DNA kryptosporidií byla detekována ve 176 případech. Fylogenetickými analýzami částečných sekvencí genů kódujících malou podjednotku rRNA (SSU), heat shock protein (HSP70), aktin, *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP), thrombospondin-related adhesive protein (TRAP-C1) a 60 kDa glykoprotein (gp60) byla prokázána přítomnost 29 různých kryptosporidií. Bylo detekováno pět již dříve popsaných druhů (*C. andersoni*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. ubiquitum* a *C. ryanae*) a 29 genotypů. Z nichž 13 bylo detekováno vůbec poprvé, konkrétně 9 genotypů z hlodavců z Thajska (*Cryptosporidium* sp. THA1–9) a 4 genotypy ze syslů z České republiky (*Cryptosporidium* sp. Sc01–04). Současně byl detekován dosud nepopsaný druh specifický pro nutrie – *C. myocastoris*. Na základě biologických a molekulárních odlišností byly z dříve známé genotypy ustanoveny jako samostatné druhy: *C. occultus* (dříve známo jako *Cryptosporidium suis*-like, *Cryptosporidium* sp. RTA368, *Cryptosporidium* sp. W20486, *Cryptosporidium* sp. P156, *Cryptosporidium* sp. K4515, *Cryptosporidium* sp. AQ7 a *Cryptosporidium parvum* VF383), *C. ratti* (dříve známo jako *Cryptosporidium* sp. rat genotyp I), *C. sciurinum* (dříve známo jako C*ryptosporidium* sp. ferret genotyp) a *C. mortiferum*. (dříve známo jako *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotype I). Velikost oocyst nově popsaných druhů kryptosporidií se od sebe do jisté míry lišila. Oocysty *C. occultus* měřily 5,20 × 4,94 µm, *C. ratti* 4,90 × 4,60 µm, *C. myocastoris* 5,02 × 4,85 µm, *C. sciurinum* 5,54 × 5,22 µm a *C. mortiferum*

5,64 × 5,37 μm. Studium tkáňové specifity prokázalo vývoj *C. occultus* v tlustém střevě potkanů. Predilekčním místem *C. ratti* stejně jako *C. myocastoris* bylo jejunum a ileum potkanů, respektive nutrií. Lokalizace infekce *C. sciurinun* nebyla v naší studii prokázána a *C. mortiferum*, parazitující u veverek, bylo detekováno ve slepém a tlustém střevě. Druh *C. occultus* byl infekční pro potkany, myši a pískomily. Druhy *C. ratti* a *C. myocastoris* se zdají být úzce hostitelsky specifické a byly infekční pouze pro potkany, respektive pro nutrie. Obdobně druh *C. sciurinum* specifický pro veverky obecné nebyl infekční pro žádného jiného modelového hostitele. U druhu *C. mortiferum* byla prokázána nejširší hostitelská specifita, byl infekční pro myši, fretky, pískomily, veverky obecné a veverky popelavé. V rámci této práce byla popsána patogenita u všech námi popsaných druhů. V případě druhů *C. occultus*, *C. ratti*, *C. myocastoris* a *C. sciurinum* nebyly pozorovány žádné klinické příznaky infekce u žádného z infikovaných hostitelů. Pouze u druhu *C. mortiferum* byla pozorována kryptosporidióza s vysokou virulencí pro veverky obecné.

Výsledky práce ukázaly, že kryptosporidie detekované u synantropních hlodavců nepředstavují významné riziko pro člověka a jím chovaná domácí a hospodářská zvířata.

SUMMARY

The subject of the present dissertation is the study of the occurrence and diversity of cryptosporidia of synanthropic rodents. In the course of the study, 1256 faecal samples of synanthropic rodents from 3 families and 12 genera from five countries were examined using microscopic and molecular methods. Of these, 743 samples were from the Czech Republic, 136 from Slovakia, 63 from the Philippines, 47 from Cambodia and 267 from Thailand. Only 13 samples were microscopically positive for the presence of

cryptosporidia oocysts. *Cryptosporidium*-specific DNA was detected in 176 cases. Phylogenetic analyses of partial sequences of the genes encoding small subunit rRNA (SSU), heat shock protein (HSP70), actin, *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP), thrombospondin-related adhesive protein (TRAP-C1) and 60 kDa glycoprotein (gp60) revealed the presence of 29 different cryptosporidia. Five previously described species (*C. andersoni*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. ubiquitum* and *C. ryanae*) and 29 genotypes were detected. Of these, 13 were detected for the first time, namely 9 genotypes from rodents from Thailand (*Cryptosporidium* sp. THA1-9) and 4 genotypes from gophers from the Czech Republic (*Cryptosporidium* sp. Sc01-04). At the same time, a previously undescribed species specific to nutria, *C. myocastoris*, was detected. On the basis of biological and molecular differences, the previously known genotypes were established as separate species: *C. occultus* (formerly known as *Cryptosporidium suis*-like, *Cryptosporidium* sp. RTA368, *Cryptosporidium* sp. W20486, *Cryptosporidium* sp. P156, *Cryptosporidium* sp. K4515, *Cryptosporidium* sp. AQ7 and *Cryptosporidium parvum* VF383), *C. ratti* (formerly known as *Cryptosporidium* sp. rat genotype I), *C. sciurinum* (formerly known as *Cryptosporidium* sp. ferret genotype) and *C. mortiferum* (formerly known as *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotype I). The oocyst size of the newly described *Cryptosporidium* species differed to some extent from each other. Oocysts of *C. occultus* measured 5.20 × 4.94 μm, *C. ratti* 4.90 × 4.60 μm, *C. myocastoris* 5.02 × 4.85 μm, *C. sciurinum* 5.54 × 5.22 μm, and *C. mortiferum* 5.64 × 5.37 μm. Tissue specificity studies demonstrated the development of *C. occultus* in the colon of rats. The predilection sites of *C. ratti* as well as *C. myocastoris* were the jejunum and ileum of rats and nutria, respectively. The localization of *C. sciurinun* infection was not demonstrated in our study, and *C. mortiferum*, parasitizing squirrels, was detected in the caecum and colon. The species *C. occultus* was

infectious to rats, mice and gerbils. The species *C. ratti* and *C. myocastoris* appeared to be narrowly host specific and were infective only for rats and nutria, respectively. Similarly, the species *C. sciurinum* specific to red squirrels was not infectious to any other model host. *C. mortiferum* species showed the broadest host specificity and was infectious to mice, ferrets, gerbils, red squirrels and eastern gray squirrels. Pathogenicity has been described for all species described in this work. In the case of the species *C. occultus*, *C. ratti*, *C. myocastoris* and *C. sciurinum*, no clinical signs of infection were observed in any of the infected hosts. Only *C. mortiferum* was observed to have cryptosporidiosis with high virulence for red squirrels.

The results of the work showed that cryptosporidia detected in synanthropic rodents do not pose a significant risk to humans and their domestic and livestock animals.

CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo studovat prevalenci, diverzitu a biologii kryptosporidií u synantropně žijících hlodavců.

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

- Vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidiových infekcí u synantropně žijících hlodavců.

- Prokázat hostitelskou specifitu a infektivitu získaných izolátů kryptosporidií pomocí experimentálních infekcí.

- Popsat biologii získaných druhů a genotypů kryptosporidií, zejména průběh infekce, patogenitu a lokalizaci vývojového cyklu včetně popisu vývojových stádií.

- Popsat diverzitu kryptosporidií synantropně žijících hlodavců pomocí multilokusové genotypizace a fylogenetických analýz.

SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

Všechny dosažené výsledky (obrázky, tabulky), použitý materiál a metody je možno nalézt v disertační práci a publikacích v ní přiložených.

Kryptosporidiím hlodavců obecně byly dosud věnovány stovky studií (PubMed, www.ncbi.nlm.nih.gov). Zatímco některé rody/čeledě hlodavců jsou studovány častěji, například myši, krysy, potkani, myšice, hraboši a křečci (Rašková et al. 2013, Hancke et Suarez 2022), u jiných jsou k dispozici jen ojedinělá sdělení nebo neexistují žádné dostupné informace (Pacini et al. 2023). Příkladem poslední skupiny mohou být hlodavci obývající africký kontinent. Bohužel neexistuje dostatek informací o globálním výskytu kryptosporidií právě u synantropních hlodavců. Jaká je tedy skutečná prevalence a diverzita kryptosporidií u synantropních hlodavců z celosvětového hlediska je stále otevřenou otázkou. Výsledky metaanalytické studie Taghipour et al. (2020) ukázaly, že v Americe hlodavci hrají významnou roli rezervoárů kryptosporidií s možností infekce člověka. V současné době bylo celosvětově u hlodavců detekováno 17 druhů a 57 genotypů kryptosporidií. Z této podmnožiny zástupců rodu *Cryptosporidium* byl u osmi prokázán přenos na člověka.

Prevalence kryptosporidií synantropních hlodavců

V rámci doktorského studia bylo získáno a vyšetřeno 1256 vzorků synantropních hlodavců z 5 zemí (Česká republika, Slovensko, Filipíny, Kambodža a Thajsko). Všichni vyšetření hlodavci patří do řádu Rodentia a dále jsou diverzifikováni do tří čeledí a 12 rodů. Z toho 743 vzorků pocházelo z České republiky, 136 ze Slovenska, 63 z Filipín, 47 z Kambodži a 267 z Thajska. Počet pozitivních vzorků na kryptosporidie byl u potkanů a

krys 131 (18,2 %), u veverek 26 (10 %), u syslů osmi (6,3 %) a u nutrií 11 (7,3 %), Tyto výsledky odpovídají průměrné promořenosti volně žijících hlodavců pro daný rod (Deng et al. 2020, Ni et al. 2021, Garcia-Livia et al. 2022).

Procento infikovaných synantropních hlodavců se napříč různými studiemi do značné míry liší a to od nuly až po 63 % pozitivních jedinců (Kellnerová et al. 2017, Deng et al. 2020, Garcia-Livia et al. 2020, Spencer et Irwin 2020, Garcia-Livia et al. 2022, Hancke et Suarez 2022). Značné rozdíly v prevalenci, ve srovnání našich a publikovaných dat, mohou být ovlivněny řadou faktorů. Nejčastější příčinou je stanovení prevalence z různě velkých skupin vyšetřovaných jedinců. Velké rozdíly jsou způsobeny studiemi, které jsou založené na vyšetření pouze malého množství jedinců, což celkovou prevalenci do jisté míry může značně zkreslit, obzvlášť pokud se jedná skupiny zvířat žijících v zajetí nebo z omezeného množství lokalit. Naše i předešlé studie ukázaly, že lokalita má vliv na celkové promoření populace hostitelů (Kellnerová et al. 2017, Deng et al. 2020). Jako příklad lze uvést distribuci kryptosporidií u syslů obecných v České republice. Kryptosporidie byly detekovány pouze na pěti z 39 vyšetřovaných lokalit.

Dalšími významnými faktory, které ovlivňují prevalenci, jsou metody detekce (mikroskopická vs. molekulární detekce) a výběr studované populace. Řada prací je zaměřena pouze na zvířata s klinickými příznaky (Xiao et Feng 2008, Paparini et al. 2012, Wang et al. 2022b). Zvířata, která jsou v klinické fázi infekce, vylučují dostatečné množství oocyst, které je možné detekovat pomocí mikroskopických metod, jejichž spodní hranice senzitivity se pohybuje okolo 2000–5000 oocyst na 1 gram trusu (Hijjawi et al. 2023). Naše výsledky ukázaly, že průběh kryptosporidiové infekce u studovaných synantropních hlodavců byl chronický s velmi nízkou intenzitou infekce. Ze 176 molekulárně pozitivních zvířat vylučovalo oocysty pouze 13. Tyto výsledky zcela korespondují s dříve publikovanými

nálezy u jiných skupin hlodavců, ale i dalších volně žijících obratlovců (Ježková et al. 2016, Čondlová et al. 2018, Horčičková et al. 2019, Kváč et al. 2021, Mensah et al. 2023).

Diverzita kryptosporidií synantropních hlodavců

V průběhu našich studií bylo detekováno u potkanů, krys, myší, veverek, nutrií a syslů devět druhů a 19 genotypů kryptosporidií. Výsledky našich prací potvrzují teorii o obrovské druhové rozmanitosti rodu *Cryptosporidium.* Bylo detekováno 13 nových genotypů kryptosporidií. Většina nalezených druhů a genotypů kryptosporidií byla popsána u dosud málo nebo vůbec studovaných skupin hostitelů. Devět nových genotypů (TH1–9) bylo nalezeno u hlodavců rodu *Rattus, Mus* a *Bandicota* v Thajsku a čtyři (Sc01–04) byly popsány ze syslů obecných v České republice. Výsledky našich prací ukazují, že jak nově detekované, tak dříve publikované druhy a genotypy kryptosporidií parazitující u hlodavců se vyznačují úzkou hostitelskou specifitou. Výjimku tvoří druhy a genotypy, které jsou hostitelsky specifické pro jiné obratlovce, jejichž přítomnost ve vyšetřovaných vzorcích lze vysvětlit kontaminací potravy a vody nebo predací přirozených hostitelů. Příkladem může být přítomnost specifické DNA *C. ryanae* a *C. andersoni* u potkanů odchycených na farmách skotu, který je přirozeným hostitelem těchto druhů kryptosporidií nebo *Cryptosporidium* sp. 1665 jehož přirozeným hostitelem jsou gekončíci, kteří se běžně vyskytují v místech odchytu studovaných hlodavců a mohli se stát kořistí asijské krysy domácí, ve které byla tato kryptosporidie detekována. Obdobné nálezy nejsou v literatuře ojedinělé. Společným znakem těchto záchytů bývá častá absence oocyst ve vyšetřovaném vzorku a nízká prevalence (Al-Abedi et al. , Yimming et al. 2016, Myšková et al. 2019, Kváč et al. 2021, Guy et al. 2022).

V souladu s předešlými studiemi provedenými na savcích a ptácích jsme prokázali vysokou diverzitu kryptosporidií u synantropních hlodavců a geografickou distribuci některých druhů/genotypů kryptosporidií (Kimura et al. 2007, Lv et al. 2009, Feng et al. 2011, Stenger et al. 2017, Horčičková et al. 2019, Wei et al. 2019, Li et Atwill 2021, Liao et al. 2021). Studie zaměřené na hlodavce z čeledi myšovití a rodu *Spermophilus* ukázaly, že tito hlodavci jsou hostitelé nejméně 17 druhově-specifických kryptosporidií, z nichž některé se vyskytovaly napříč studovanými lokalitami, zatímco jiné byly detekovány pouze u hostitelů v rámci jedné geografické lokality. Nově popsané genotypy *Cryptosporidium* sp. THA1–THA9 byly popsány výhradně u hlodavců v Thajsku. *Cryptosporidium* sp. genotyp rat II a III byly dosud popsány u potkanů a krys v Asii, severní Austrálii, na Korsice a Kanárských ostrovech. V našem případě byl *Cryptosporidium* sp. genotyp rat III nalezen u bandikoty indické (Thajsko). V ostatních částech světa, kde byly obdobné studie prováděny, včetně naší práce, nebyly tyto genotypy detekovány (Paparini et al. 2012, Garcia-Livia et al. 2022). Obdobně bylo zjištěno, že syslové rodu *Spermophilus* v České republice jsou parazitováni odlišnými genotypy kryptosporidií než jejich příbuzní obývající Severní Ameriku. Takováto geografická diverzita v rámci rodu *Cryptosporidium* není neobvyklá a byla již u volně žijících hostitelů v minulosti popsána (Kváč et al. 2013b, Stenger et al. 2015b, Stenger et al. 2017).

Biologická charakterizace kryptosporidií synantropních hlodavců

Morfologie a morfometrie oocyst kryptosporidií synantropních hlodavců

Morfologie a morfometrie je jednou ze základních podmínek popisu nového druhu. Nicméně vzhledem k malé variabilitě nelze tuto biologickou charakteristiku považovat za spolehlivý diagnostický znak pro identifikaci druhu či genotypu kryptosporidií. Za spolehlivé druhové určení je tedy považována molekulární charakterizace vybraných genů.

V souladu s předešlými studiemi jsme prokázali, že velikost a tvar oocyst jednotlivých druhů kryptosporidií je vlastností druhu bez vlivu hostitele (Ryan et al. 2003, Ryan et al. 2004, Holubová et al. 2016).

Cryptosporidium occultus

Oocysty *C. occultus* pocházející z přirozeně infikovaných potkanů (*Rattus norvegicus*) byly morfometricky shodné s oocystami, které byly získány z experimentálně infikovaných potkanů a které měřily 4,66–5,33 μm (průměr = 5,20 μm) × 4,47–5,44 μm (průměr = 4,94 μm) a indexu tvaru 1,05 (1,00–1,17). Oocysty *C. occultus* nelze morfometricky odlišit od oocyst dalších hlodavčích druhů a genotypů kryptosporidií jako například *C. alticolis* a *C. ditrichi* (Čondlová et al. 2018, Horčičková et al. 2019).

Cryptosporidium ratti

Oocysty *C. ratti* z přirozeně infikovaných potkanů (*Rattus norvegicus*) měřily 4,4–5,4 μm (průměr ± SD = 4,9 ± 0,2 μm) × 4,3–5,1 μm (průměr ± SD = 4,6 ± 0,2 μm) s poměrem délky k šířce 1,0–1,1 (průměr ± SD = 1,1 ± 0,1) a shodovaly se velikostí s oocystami získanými z experimentálně

infikovaných potkanů. Oocysty *C. ratti* jsou menší než oocysty *C. parvum* nebo *C. occultus* (Ježková et al. 2021b).

Cryptosporidium myocastoris

Oocysty *C. myocastoris* pocházející z přirozeně infikovaných nutrií (*Myocastor coypus*) byly morfometricky shodné s oocystami, které byly získány z experimentálně infikovaných nutrií a které měřily 4,8–5,2 µm (průměr = 5,02 µm) × 4,7–5,0 µm (průměr = 4,85 µm) a indexu tvaru 1,04 (1,00–1,08). Oocysty *C. myocastoris* jsou menší než oocysty *C. parvum* a *C. ratti*, nicméně tyto rozdíly nemají praktický význam pro identifikaci (Ježková et al. 2021a).

Cryptosporidium sciurinum

Ooocysty *C. sciurinum* získány z přirozeně infikované veverky (*Sciurus vulgaris*) (izolát 45901) měřily 5,12–6,00 µm (průměr ± SD = 5,54 ± 0,20 µm) × 4,77–5,66 µm (průměr ± SD = 5,22 ± 0,18 µm) s poměrem délky k šířce 1,00–1,26 (průměr ± SD = 1,07 ± 0,05).

Cryptosporidium mortiferum

Oocysty *C. mortiferum* byly získány z přirozeně infikovaného člověka (*Homo sapiens*) a měřily 5,50–5,89 µm (průměr ± SD = 5,64 ± 0,19 µm) × 4,86–5,60 µm (průměr ± SD = 5,37 ± 0,17 µm) s poměrem délky k šířce 1,01–1,14 (průměr ± SD = 1,05 ± 0,05). Velikost oocyst *C. mortiferum* se nelišila od oocyst vylučovaných experimentálně infikovanými hostiteli (*Sciurus vulgaris*, *Sciurus carolinensis*, *Mus musculus* a *Mustela putorius furo*).

Hostitelská specifita kryptosporidií synantropních hlodavců

Na základě provedených experimentálních infekcí, byla prokazována hostitelská a tkáňová specifita. Jedná se o důležité biologické vlastnosti jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií. Experimentální infekce byly provedeny pro pět nově popsaných druhů kryptosporidií. Jednotlivé druhy byly testovány vždy na původním hostiteli vyjma druhu *C. sciurinum* u kterého nebylo z logistických důvodů možné provést experimenty s tímto izolátem na veverkách obecných. Dále byla hostitelská specifita testována na modelových laboratorních, hospodářských a volně žijících zvířatech (myši, potkani, pískomilové, morčata, fretky, veverky, telata, selata, kuřata, andulky). Druh *C. occultus* byl infekční pro potkany, myši a pískomily. Druhy *C. ratti* a *C. myocastoris* se zdají být úzce hostitelsky specifické a byly infekční pouze pro potkany, respektive pro nutrie. Obdobně druh *C. sciurinum* specifický pro veverky obecné nebyl infekční pro žádného jiného modelového hostitele. U druhu *C. mortiferum* byla prokázána nejširší hostitelská specifita, byl infekční pro myši, fretky, pískomily, veverky obecné a veverky popelavé.

Tkáňová specifita kryptosporidií synantropních hlodavců

Detekce predilekčního místa infekce v gastrointestinálním traktu hostitelů, může napomoci při odlišení jednotlivých druhů kryptosporidií (Holubová et al. 2020, Ježková et al. 2021a). Nicméně je tento přístup značně náročný, zahrnuje podrobné zkoumání každého hostitele z hlediska infekce jednotlivých tkání. Z tohoto důvodu se jedná o časově i finančně náročnou studii zahrnující různé typy barvení, histologické zpracování jednotlivých tkání a případně i elektronovou mikroskopii. Při běžné diagnostice tyto

metody nenachází uplatnění, nicméně pro popis nových druhů je tento postup žádoucí (Kváč et al. 2014a, Ježková et al. 2021b).

Řadou studií bylo prokázáno, že jednotlivé druhy, případně genotypy kryptosporidií jsou obvykle charakterizovány úzkou tkáňovou specifitou. Příslušný druh kryptosporidií se poutá k jednomu danému predilekčnímu místu infekce (Lindsay et al. 2000, Ryan et al. 2008, Kváč et al. 2018, Holubová et al. 2020). Lokalizace infekce společně s morfologickou charakterizací oocyst může napomoci při determinaci druhu či genotypu. Nicméně bylo již prokázáno několik případů, kdy se lokalizace a morfologie oocyst odlišných druhů může překrývat. Takovým příkladem mohou být druhy *C. alticolis* a *C. ditrichi* vyskytující se u myšic v jejunu a ileu (Čondlová et al. 2018, Horčičková et al. 2019). Obdobně se v tenkém střevě prasat vyskytují druhy *C. parvum* a *C. scrofarum* (Kváč et al. 2013a, Li et al. 2013). V tlustém střevě potkanů lze nalézt *C. occultus*, ale příležitostně může být osídleno i druhem *C. meleagridis* (Kimura et al. 2007, Kváč et al. 2018).

Na základě provedených experimentů byla prokázána tkáňová specifita u námi popsaných druhů. *C. oocultus*, jak již bylo zmíněno, se vyskytuje v tlustém střevě potkanů. *C. ratti* bylo detekováno u potkanů v jejunu a ileu. Predilekčním místem *C. myocastoris* parazitujícím u nutrií je posteriorní část jejuna a ileum. Lokalizace infekce *C. sciurinun* nebyla v naší studii prokázána a *C. mortiferum*, parazitující u veverek, bylo detekováno ve slepém a tlustém střevě.

Pro průkaz hostitelské a tkáňové specifity je nezbytná infekční dávka životaschopnými oocystami. Při nesplnění této podmínky může být celý experiment negativně ovlivněn. Dále je třeba sledovat imunitní stav a věk hostitele, které v experimentech mohou sehrát významnou roli (Fayer et al. 2007, Kváč et al. 2013a, Holubová et al. 2016). Vhodné pro experimentální infekce je používat čerstvé, maximálně dva měsíce staré oocysty, které byly

skladovány při chladničkové teplotě 4–8 °C (Kváč et al. 2018, Horčičková et al. 2019, Ježková et al. 2021a). U imunosuprimovaných a imunodeficitních jedinců, kteří jsou více vnímaví k infekci kryptosporidiemi, může být výrazně prodloužena prepatentní perioda (Kváč et al. 2011). Je nezbytné vzít tento fakt v potaz, aby nebyly experimenty předčasně ukončeny (Kváč et al. 2008). Experimentální zvířata, která se již v minulosti setkala s kryptosporidiemi mohou být k opakované infekci méně vnímaví, případně zcela rezistentní (Jalovecká et al. 2010). Tuto problematiku je třeba vzít v potaz při využití volně žijících, případně konvenčně chovaných zvířat pro experimentální infekce.

Patogenita kryptosporidií synantropních hlodavců

Kryptosporidiové infekce jsou obecně spojovány se závažným klinickým onemocněním, kryptosporidiózou, s typickými průjmovými epizodami, které mohou mít fatální konec (Matsuura et al. 2017, Bartley et al. 2023, Ootawa et al. 2023). Nicméně ne všechny druhy kryptosporidií vyvolávají klinické onemocnění. Lze dokonce říci, že infekce způsobené většinou druhů a genotypů kryptosporidií probíhají asymptomaticky (Ježková et al. 2016, Holubová et al. 2019, Horčičková et al. 2019, Holubová et al. 2020).

V rámci této práce byla popsána patogenita u všech námi studovaný/popsaných druhů. V případě druhů *C. occultus*, *C. ratti*, *C. myocastoris* a *C. sciurinum* nebyly pozorovány žádné klinické příznaky infekce u žádného z infikovaných hostitelů. Histologické analýzy a vyšetření pomocí skenovací elektronové mikroskopie neprokázalo výrazné patologické změny u žádného ze studovaných hostitelů. Jediným společným prvkem všech infekcí bylo prodlužování klků mikrovilární vrstvy infikovaných epiteliálních buněk. Pouze u druhu *C. mortiferum* byla pozorována kryptosporidióza s vysokou (fatální) virulencí pro veverky obecné. Zatímco

u veverek popelavých, které jsou přirozenými hostiteli *C. mortiferum*, byla pozorována v průběhu infekce jen mírná apatie, projevující se sníženým zájmem o okolí a potravu a se změnou konzistence trusu z pevné na pastovitou, infekce stejným druhem kryptosporidie způsobila u veverek obecných ztrátu kondice, zájem o potravu a nástupem průjmového onemocnění s fatálními následky. Veverky trávily většinu dne v úkrytu, byly letargické a nereagovaly na vnější stimuly jako potravu, vodu, manipulaci a čištění klece. Při výskytu závažných klinických příznaků byly humánně usmrceny. Výsledky této práce ukazují, že stejný izolát kryptosporidie může mít různou patogenitu a virulenci pro různé druhy hostitelů.

Molekulární detekce a diferenciace kryptosporidií

Vzhledem k tomu, že dle morfologie oocyst nelze přesně určit o jaký druh kryptosporidií se jedná, k rozlišení jednotlivých druhů se obvykle využívá molekulárních metod. Citlivost těchto metod se pohybuje mezi 1 až 10 oocystami ve vyšetřovaném vzorku (Smith et al. 2006, Thompson et Ash 2016). Pro genotypizaci jsou používány rodově specifické primery amplifikující různé geny, nejčastěji gen kódující malou podjednotku rRNA (Sulaiman et al. 1999). Nicméně vyhodnocování evolučních vztahů pouze na základě rRNA může vést k chybným závěrům (Li et al. 2014b, Stenger et al. 2015a, Ježková et al. 2021a). Z tohoto důvodu bývají využívány i další lokusy jako gen kódující heat shock protein 70 (HSP70), aktin, *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP), 60 kDa glykoprotein (gp60) a thrombospondin-related adhesive protein (TRAP–C1) (Morgan-Ryan et al. 2001, Tang et al. 2016). Při studiu vnitrodruhové variability, nebo v případě smíšených infekcí, je nezbyné opakované sekvenování PCR produktů, dále klonování PCR produktů s následným sekvenováním, případně sekvenování nové generace (Grinberg et al. 2013, Paparini et al. 2015, Stenger et al. 2015a).

V současné době masivně používané Sangerovo sekvenování přináší zásadní nevýhodu, kterou je nízná prvaděpodobnost detekce smíšených infekcí. Z principu metody vyplývá, že ve vzorku je přednostně amplifikován druh, který je v hostiteli dominantně zastoupen (Grinberg et al. 2013). Výsledky našich i předchozích studií jednoznačně potvrzují, že většina obratlovců, synantropní hlodavce nevyjímaje, je parazitována celou řadou druhů a genotypů kryptosporidií (Wang et al. 2021, Hancke et Suarez 2022, Lu et al. 2022, Feng et al. 2023, Chen et al. 2023a). Jen u syslů sledovaných v rámci této práce byly detekovány čtyři nové genotypy kryptosporidií.

Při zpracovní práce jsme si byli vědomi limitů používaných molekulárních metod a proto u všech vyšetřovaných vzorků byla provedena genotypize rDNA lokusu v kombinaci s dalšími výše uvedenými geny. Pro popis nového druhu byly sekvenovány nejméně tři různé geny. Konkrétní popis jednotlivých metodik je podrobně popsán v přiložených publikacích.

Synantropní hlodavci jako potenciální zdroj zoonotických kryptosporidií a zdroj infekce pro hospodářská zvířata

Přestože jsou synantropní hlodavci parazitováni převážně hostitelsky specifickými genotypy, mohou být hostiteli celé řady dalších, často zoonotických druhů kryptosporidií (Kimura et al. 2007, Bahrami et al. 2012, Ng-Hublin et al. 2013a). Vzhledem k tomu, že oocysty kryptosporidií si i po průchodu zažívacím traktem nevnímavého hostitele mohou zachovávat svou infektivitu (Graczyk et al. 1996), mohou představovat synantropní hlodavci s ohledem na jejich celosvětové rozšíření a způsob života ideální pasivní přenašeče pro šíření kryptosporidií (Zhao et al. 2018).

Z našich a dříve publikovaných dat lze vyvodit závěr, že přestože synantropní hlodavci sdílí prostředí s lidmi a jimi chovanými zvířaty,

nedochází k zásadnímu přenosu kryptosporidií ve směru hlodavec→hospodářské zvíře, hospodářské zvíře→hlodavec, člověk→hlodavec (Kilonzo et al. 2013, Li et al. 2020a).

Z pohledu zoonotického přenosu kryptosporidií představují synantropní hlodavci relativně malé riziko a záleží vždy na konkrétním druhu a genotypu kryptosporidie. Z kryptosporidií specifických pro hlodavce přestavují potenciální zoonotické riziko druhy *C. occultus*, *C. muris*, *C. ditrichi*, *C. tyzzeri*, *C. viatorum* a *C. mortiferum*. Nicméně s ohledem na dosud zjištěný zanedbatelný podíl lidských infekcí způsobený druhy *C. occultus*, *C. muris*, *C. ditrichi*, *C. tyzzeri* je riziko přenosu zanedbatelné. U druhů *C. parvum* a *C. ubiquitum*, které jsou v rámci lidské populace zodpovědné za vysoké procento nákaz, jsou u synantropních hlodavců detekovány ojediněle a lze předpokládat, že studovaní synantropní hlodavci hrají minoritní roli v přenosu těchto druhů kryptosporidií. Poslední a současně rizikovou skupinu pro člověka tvoří druhy *C. viatorum* a *C. mortiferum*. Podíl lidských infekcí způsobených těmito dvěma druhy postupně vzrůstá. Zejména v případě druhu *C. mortiferum* dochází rychlému nárůstu počtu lidských infekcí. Příčinu lze hledat právě v kontaktu člověka s volně žijícími druhy adaptujícími se na synantropní způsob života (Guo et al. 2015, Wu et al. 2020, Xu et al. 2020, Bujila et al. 2021, Sardar et al. 2021, Alderisio et al. 2023).

ZÁVĚRY

- Byla prokázána obrovská druhová rozmanitost kryptosporidií infikujících studované synantropní hlodavce. Na základě multilokusové genotypizace bylo detekováno 9 druhů a 19 genotypů *Cryptosporidium* spp.
- Bylo popsáno pět nových genotypů rodu *Cryptosporidium*.

- Na základě studia genetických a biologických odlišností bylo ustanoveno pět nových druhů rodu *Cryptosporidium*, jmenovitě *C. occultus, C. ratti*, *C. myocastoris, C. sciurinum* a *C. mortiferum*.
- Rozšířili jsme znalosti o tkáňové specifitě kryptosporidií.
- Infekce způsobené většinou detekovaných druhů a genotypů kryptosporidií synantropních hlodavců nejsou provázeny klinickými příznaky.
- Velikost oocysty nelze použít jako diferenciální znak.
- Intenzita kryptosporidiových infekcí je u synantropních hlodavců většinou nízká, pod limitem mikroskopických metod.
- Experimentálně byla prokázána 100% letalita *C. mortiferum* pro veverky obecné, zatímco u veverek šedých byly pozorovány jen mírné klinické příznaky onemocnění.
- Syslové obecní (ČR) nesdílejí identické *Cryptosporidium* spp. se sysly obývajícími území Severní Ameriky.
- Kryptosporidie detekované u synantropních hlodavců nepředstavují významné riziko pro člověka a jím chovaná domácí a hospodářská zvířata.