

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

---

**AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Ing. Bc. Veronika Prantlová**

**České Budějovice**

**2021**

## **AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Doktorand:** Ing. Bc. Veronika Prantlová  
**Studijní program:** Zootechnika  
**Studijní obor:** Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat  
**Název práce:** Diverzita a biologie kryptosporidií infikujících myši domácí  
(*Mus musculus*)  
**Školitel:** prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.  
**Oponenti:** doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.  
Ing. Tomáš Zelený, Ph.D.  
doc Ing. Petr Sláma, Ph.D.

Obhajoba disertační práce se koná dne 3. 2. 2022 v 13.30 v budově M v místnosti vědecké rady ZF JU

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

## IMPAKTOVANÉ PUBLIKACE, Z NICHŽ VYCHÁZÍ TATO PRÁCE

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.

## STUDIE 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.)

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.).

## 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 nevítaným 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 odchyty 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 kryptosporidie. Dále byla zdokumentována případová studie lidské kryptosporidie, způsobené smíšenou infekcí *C. parvum* a obou subtypů *C. tyzzeri*, a to včetně podrobného popisu průběhu latentní 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.

# ÚVOD

Kryptosporidie jsou jednobuněčná parazitická protista, jež infikují celou řadu obratlovců včetně člověka. 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). U řady druhů a genotypů kryptosporidií je také intenzita vylučování infekčních stádií poměrně nízká (Kváč *et al.* 2013a). Z těchto důvodů 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 se liší mimo jiné dle věku, kondice, imunitní zralosti organismu hostitele (Cacciò *et al.* Putignani 2014; Desai *et al.* 2012). Průběh onemocnění, zvaného kryptosporidíóza, závisí 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 al.* Litvinsky 2000).

Za posledních třicet let intenzivního studia kryptosporidií byla podrobně prozkoumána jejich diverzita i biologie u řady různých zvířecích hostitelů, například u hospodářských zvířat (Kváč *et al.* 2008a; Laatamna *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; Papparini *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). Takto získané výsledky mohou být ale vzhledem k nízké senzitivitě mikroskopického vyšetření podhodnocené a neodráží skutečný stav kryptosporidií ve studovaném vzorku hostitelů. 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).

Mezi nejvýznamnější zástupce podčeledi pravých myší (Murinae) patří myš domácí (*Mus musculus*), která se také ze všech evropských hlodavců nejčastěji vyskytuje v bezprostřední blízkosti člověka (Berry 1981). Předek myši domácí pochází ze střední Asie, odkud před asi 0,5 miliónem let začaly jednotlivé poddruhy myší divergovat a migrovat do různých částí světa (Auffray *et Britton-Davidian* 2012; Bonhomme *et Searle* 2012). Jeden z těchto poddruhů, myš domácí východoevropská (*M. m. musculus*, dále v textu MMM), se následně rozšířil na rozsáhlé území Eurasie, sahající od střední a východní Evropy až na Dálný Východ. Myš domácí západoevropská (*M. m. domesticus*, dále v textu MMD) migrovala přes Malou Asii a severní Afriku do západní Evropy a později byla zavlečena 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 myši domácí (HMHZ), která prochází Evropou severojižním směrem a protíná také západní cíp České republiky. 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). Cílem této práce bylo, mimo jiné, prostudovat kryptosporidiové infekce u dvou poddruhů myši domácí v těchto unikátních podmínkách.



## **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.

Dílními 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.

## SHRnutí VÝSLEDKŮ A DISKUZE

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

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* mouse genotyp II). U jiných hlodavců, kde parazitují převážně 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 byly nalezeny i 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.

## PREVALENCE A DIVERZITA KRYPTOSPORIDIÍ U MYŠI DOMÁCÍ

Celkem bylo odchyceno 578 myší na 125 lokalitách, 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. Mikroskopické vyšetření odhalilo 71 pozitivních vzorků (prevalence 12,2 %), pomocí PCR bylo detekováno celkem 133 pozitivních myší. Prevalence byla 23,0 %, tedy oproti mikroskopické detekci 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 kryptosporidiózy ani před usmrcením, ani při pitvě. Intenzita infekce byla u námi studovaných myší nízká, podobně jako to popisují ve svých pracích na hlodavcích autoři 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 specifitou, 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 z důvodu nízké intenzity vylučovaných oocyst k podhodnocení reálné prevalence kryptosporidiové infekce v populaci. Námi molekulárně detekovaná prevalence kryptosporidií byla 12,2 % u MMM a 30,9 % u MMD, celková prevalence byla 23,0 %. Ta přibližně odpovídá prevalenci, popsané u hrabošovitých v České republice (22,6 %) Horčíčkovou *et al.* (2019).

Další obdobné studie na drobných hlodavcích v Evropě uvádějí prevalenci od 13,7 % (Čondlová *et al.* 2019; García-Livia *et al.* 2020), až po 68,3 % (Perec-Matysiak *et al.* 2015). Promořenost kryptosporidii se tedy může výrazně lišit i v rámci jednotlivých druhů 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 na výskyt kryptosporidií v populaci vliv. Vyšší promořenost MMD uvádí také Goüy de Bellocq *et al.* (2018), která studovala u myši v HMHZ výskyt *Pneumocystis murina*. Věková specifita nebyla v naší studii 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).

Pro genotypizaci detekovaných kryptosporidií jsme používali analýzu genů SSU, GP60 a u *C. muris* i mikrosatelitních lokusů MS1, MS2, MS3 a MS16. Ze všech myši 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 MS3 a MS16 se amplifikovaly pouze vzorky z MMD. 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.

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 (Xiao 2010), typ a způsob použití metod molekulární diagnostiky může zásadně ovlivnit výsledek detekované diverzity druhů/genotypů kryptosporidií v populaci.

Nalezli jsme celkem pět druhů kryptosporidií, *C. muris* (10,4 %), *C. tyzzeri* (10,7 %), *C. parvum* (3,3 %), *C. hominis* (0,5 %) a *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II (0,3 %). Nejčastěji se vyskytovaly *C. muris* a *C. tyzzeri* které jsou považovány za myším specifické (Ren *et al.* 2013; Tyzzer *et al.* 1912). Díky zvolené posloupnosti detekce různých genů jsme u 13 vzorků detekovali smíšené infekce dvou různých druhů kryptosporidií.

Druh *C. muris* byl nalezen u 60 myši (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). U 11 vzorků (1,9 %) ze 7 různých lokalit byla nalezena smíšená infekce *C. muris* a *C. tyzzeri*.

Prevalence *C. tyzzeri* byla 10,7 % (62 myši), z nich bylo 12 ve smíšené infekci s dalším druhem kryptosporidie, 11 s *C. muris* a 1 s *C. parvum*. Všechny získané sekvence genu SSU byly 100% identické s referenčními sekvencemi č. AF112571 a AF108863, nalezenými u myši domácích (Morgan *et al.* 1999b; Xiao *et al.* 1999a). Na genu pro GP60 bylo získáno 55 sekvencí, které vytvořily monofyletickou skupinu, jež se dále rozčlenila na dvě větve, náležející k subtypům IXa a IXb. 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. Všechny sekvence, náležející k subtypu IXa byly získány z MMM, všechny sekvence subtypu IXb náležely k MMD. Tato problematika je více rozvedena v následující kapitole.

Druh *C. parvum* byl nalezen u 19 myši (3,3 %), z nichž u 2 (0,3 %) byla smíšená infekce s druhem *C. tyzzeri* respektive *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II. Všechny sekvence *C. parvum* byly na genu SSU shodné 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, který byl již nalezen u skotu, zejména pak telat, a také 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 č. AY262031 (Obr. 5A), získanou z vody jezera Millwaukee (Zhou *et al.* 2003). Vzorky náležely k subtypu IIAA10G2, 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 domácích.

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. 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. ubiquitum*, *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 ke *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II, nedávno popsánému u myšic, pro něž se zdá být specifický (Čondlová *et al.* 2019). Díky sdílení habitatu myší a myšic, kdy se myšice před zimou stahují z volné přírody do 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 specifické pro myši domácí (Ren *et al.* 2012). Zatím není prostudováno, zda může *Cryptosporidium* sp. apodemus genotyp II způsobovat u myší 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 pštrosů (Holubová *et al.* 2020).

Na základě metody MLST bylo u druhu *C. muris* dosud popsáno 13 subtypů na lokusu MS1 a 6 subtypů na lokusech MS2, MS3 i MS16 (Feng *et al.* 2011a; Wagnerová *et al.* 2015; Wang *et al.* 2012, 2021). Rozdíly na těchto lokusech spočívají pouze v kopiích mikrosatelitních a minisatelitních opakování (Feng *et al.* 2011a). V naší studii jsme u *C. muris* popsali na lokusu MS1 4 nové subtypy a na lokusech MS3 a MS16 dva nové subtypy. Ze tří dosud popsáných žaludečních druhů kryptosporidií se *C. muris* jeví jako nejpolymorfnější druh. U *C. andersoni* bylo 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, že pochází jen z několika míst v Evropě a na Blízkém Východě (Feng *et al.* 2011a). Naproti tomu hlodavci jsou hojně rozšíření a žijí 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).

## **KOEVOLUCE *C. TYZZERI* A MYŠI DOMÁCÍ**

### **Fylogenetická analýza vzorků z hybridní zóny**

Celkem 32 vzorků z HMHZ, které byly pozitivní na přítomnost *C. tyzzeri*, bylo podrobeno 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 poslední 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 MMD 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 studii (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 studii 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.

### **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). Oocysty *C. tyzzeri*-MMD byly statisticky 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.

## 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, popsáný v této práci (**publikace 2**), 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**).

### 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 dvojic srovnatelně blízce příbuzných druhů *C. parvum* – *C. erinacei*, *C. hominis* – *C. cuniculus*, nebo *C. bovis* – *C. xiaoi* (Kváč *et al.* 2014; Robinson *et al.* 2010; **publikace 1**).

Na lokusu HSP70 je *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* (**publikace 2**). 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.

### **Biologické vlastnosti *C. proliferans***

Výsledky této práce a studie Srétera *et al.* (2000) ukázaly, že oocysty *C. 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, Satoh *et al.* 2003) a *C. muris* CB03 (7 DPI; nepublikováno) u SCID myši. V práci, studující infekci *C. muris* RN66 u bezsrstých myši, které specificky postrádají T-buněčnou imunitu, byla po dávce 1 milión oocyst (což je dávka použitá i v této studii), zaznamenána prepatentní perioda 10 DPI (Taylor *et al.* 1999). Delší 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 ukazují, 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 al.* 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

mastomyší 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 myši (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).

## PŘÍPADOVÁ STUDIE LIDSKÉ KRYPTOSPORIDIÓZY

Pětadvacetiletá 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 (**publikace 3**). V nátěrech stolice byly identifikovány oocysty kryptosporidií s typickými barvicími charakteristikami. Žena byla dvakrát vyšetřena na přítomnost exogenních stadií prvoků, vajíček helmintů, shigely, salmonely, kampakobakterií, *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* (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* IIaA6) 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 nálezu 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 jednou z nejčastějších příčin lidské kryptosporidiózy. 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 stejně jako u 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 myši 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.

## ZÁVĚRY

Pomocí multilokusových analýz bylo prokázáno, že myši domácí mohou být parazitovány nejméně sedmi různými druhy kryptosporidií. Kromě již popsaných 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 mohou 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 v důsledku přednostní PCR amplifikace převládajícího druhu/genotypu podhodnoceny. 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 bylo prokázáno, že myším-specifický druh *C. tyzzeri* pravděpodobně koevoluoval 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*, patřící mezi žaludeční druhy kryptosporidií a dříve zařazovaný 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 myší domácích na zdravého člověka a naznačuje, že *C. tyzzeri*, které bylo považováno za druh s úzkou hostitelskou specifitou, může být zoonotické.