

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 - Zemědělství

Studijní obor: Agroekologie

Katedra: Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Vedoucí katedry: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
Kryptosporidiové infekce drůbeže

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Autor: Vladimír Kural

České Budějovice, duben 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Datum

Vladimír Kural

Poděkování:

Děkuji, doc. Ing. Martinovi Kváčovi, Ph.D., vedoucímu bakalářské práce, za odborné vedení, nepostradatelné rady, ochotu a především trpělivost. Dále bych rád poděkoval RNDr. Bohumilovi Sakovi, Ph.D. a RNDr. Daně Květoňové za odbornou pomoc při práci v laboratoři. A nakonec bych rád poděkoval celé mé rodině a přátelům za jejich podporu a rady.

Tato studie byla finančně podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LH11061) a grantovou agenturou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (022/2010/Z).

Abstrakt

V letech 2011 a 2012 byl sledován výskyt *Cryptosporidium* spp. ve 20 chovech kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*). Z celkového počtu 270 vzorků byla pomocí specifického barvení oocyst kryptosporidií anilin-carbol-methyl violetí zjištěna přítomnost oocyst u 5 vzorků pocházejících z jednoho chovu. Celková DNA byla izolována z pozitivních i negativních vzorků. Pomocí nested PCR amplifikující gen kódující malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) byla detekována přítomnost specifické DNA kryptosporidií v 8 vzorcích. Sekvenční PCR analýza prokázala ve všech 8 případech přítomnost zatím nepopsaného genotypu, pracovně nazvaného *Cryptosporidium* hen genotyp, který je na základě fylogenetických analýz nejbližší příbuzný druhu *C. bovis* původně popsáného ze skotu.

Klíčová slova:

Cryptosporidium; prevalence; infekce; slepice

Abstract

A total of 270 samples of domestic hen (*Gallus gallus* f. *domestica*) from 20 farms were collected during two consecutive years (from 2011 to 2012). Microscopical examination of aniline-carbol-methyl violet stained fecal smears revealed 5 positive samples originating from one farm. DNA was extracted from *Cryptosporidium* positive samples and all microscopically negative samples. Nested PCR was performed to amplify the partial SSU rRNA gene of *Cryptosporidium*. The sequence analyses of PCR-positive specimens identified 8 samples as a novel genotype, working titled *Cryptosporidium* hen genotype. The sequences identified as hen genotype matched most closely with *Cryptosporidium bovis* which was originally reported from cattle in the most cases.

Key words:

Cryptosporidium; prevalence; infection; hen

Obsah	
1. CÍLE PRÁCE	1
2. ÚVOD	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	4
3.1 Rod <i>Cryptosporidium</i>	4
3.1.1 Taxonomie	5
3.1.2 Vývojový cyklus	6
3.1.3 Zdroj infekce	7
4. DRUHY A GENOTYPY KRYPTOSPORIDIÍ INFIKUJÍCÍ DRŮBEŽ	7
4.1 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	8
4.1.1 Biologie	8
4.1.2 Vývojový cyklus	9
4.1.3 Hostitelé	10
4.1.4 Patogenita	10
4.2 <i>Cryptosporidium baileyi</i>	11
4.2.1 Biologie	11
4.2.2 Vývojový cyklus	12
4.2.3 Patogenita	14
4.2.4 Hostitelé	15
4.3 <i>Cryptosporidium galli</i>	16
4.3.1 Biologie	16
4.2.2 Vývojový cyklus	17
4.2.3 Patogenita	18
4.2.4 Hostitelé	18
4.4 Ostatní druhy a genotypy kryptosporidií infikující ptáky	19
4.4.1 <i>Cryptosporidium</i> avian genotypes I-IV	19
4.4.2 <i>Cryptosporidium</i> Wood-cock genotype	20

4.4.3 <i>Cryptosporidium</i> Duck genotype	20
4.4.4 <i>Cryptosporidium</i> Goose genotype I-IV	20
4.4.5 Infekce <i>C. parvum</i> u ptáků	20
5. MATERIÁL A METODIKA	21
5.1 Charakteristika chovů.....	21
5.2 Odběr vzorků na rozbor	21
5.3 Barvení oocyst kryptosporidií anil-carbol-methylvioletí dle Miláčka a Vítovce (1985).....	22
5.4 Odhad intenzity infekce	23
5.5 Izolace DNA.....	23
5.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	24
5.7 Gelová elektroforéza	25
5.8 Extrakce z gelu	26
5.9 Sekvenace.....	27
5.10 Fylogenetická analýza.....	27
6. VÝSLEDKY	29
6.1 Výsledky a prevalence	29
6.2 Molekulární charakteristika	31
7. DISKUZE.....	33
8. ZÁVĚRY	34
9. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	35

1. CÍLE PRÁCE

- Kriticky zpracovat literární rešerši k tématu.
- Vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidiových infekcí ve vybraných chovech drůbeže.
- Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp.
- Pokusit se získat izoláty různých kryptosporidií pro následné experimentální infekce.

2. ÚVOD

Drůbež je chována více než 4000 let pro užitek, jež přináší. V České republice má chov drůbeže dlouholetou tradici. V současné době můžeme rozlišit více než 150 plemen drůbeže v rozmanitých barevných rázech a formách. Proto můžeme často pozorovat, že chovatelé nechovají drůbež jen pro užitek (maso a vejce), ale také pro radost jako svůj koníček.

Domácí slepice jsou všelijaká plemena nebo bezplemenní kříženci kura bankivského (*Gallus Gallus bankiva*), který žije v Asii a byl tam zdomestikován. Dnes je v důsledku genových analýz a zpětného křížení s divokými bankivkami téměř jisté, že jiný původ nepřichází v úvahu.

Poptávka po kuřecím mase rapidně roste, průměrná spotřeba kuřecího masa na osobu za rok byla v roce 1975 23 kg, v roce 1995 to bylo 28 kg, v roce 2000 dosáhla 31 kg a v některých zemích stále narůstá. Zvýšená produkce brojlerových kuřat a slepic na vejce rapidně zvýšila požadavky na krmení. V dnešní době se klade velký důraz na prosperitu chovu a proto jsou krmné dávky přesně spočítány a unifikovány. Každé navýšení krmné dávky se pro podnik stává nerentabilní. Proto se začal klást větší důraz na parazity, kteří jsou mimo jiné častým původcem průjmových onemocnění, což má za následek úbytek hmotnosti a vyšší požadavek na krmnou dávku.

Zdravotní problematika drůbeže je dosti rozsáhlá. Mezi nejrozšířenější ektoparazity v našich chovech drůbeže patří: čmelík kuří (*Dermanyssus gallinae*). Jsou to roztoči žlutavé barvy, o velikost do 0,5 mm, živící se krví hostitele. Knemidokoptóza způsobená roztočem (*Cnemidocoptes mutans*), který napadá kůži a povrchové šupiny běháků, roztoči peří jako jsou všenky (*Mallophaga*) a blechy (*Siphonaptera*). Mezi bakteriální nemoc patří hemofilová rýma, jejíž projevy můžeme pozorovat u slepic, jako těžké pískavé dýchání, kýchání, nateklá víčka a vlhké nosní dírky. Mezi endoparazity patří škrkavky (*Ascaridia galli*), kokcidie (*Eimeria* spp.) a kryptosporidie. Posledně jmenovaní, jsou jednobuněční endoparaziti. Napadají nejčastěji trávicí a dýchací soustavu slepic. Kryptosporidióza může mít mnoho příznaků, které se mohou projevit najednou nebo vůbec, vyskytnout se však mohou pouze některé z nich. K hlavním příznakům patří hubnutí, snížení snášky, řídké výkaly, zvýšený příjem potravy a apatické chování. V minulosti

chovatelé nepřikládali endoparazitům drůbeže zvlášť velký význam. Chov drůbeže se během historie dosti změnil, dnes jsou slepice chovány po tisících v nevědomosti o denní době. Ve snaze získat maximální produkci vajec a masa jsou mnohdy slepice dosti oslabené. O to snazší je pro parazita napadnout daného jedince pomnožit se v něm a jeho prostřednictvím se v hejnu dále šířit. V malém prostoru, kde se na sebe tiskne mnoho jedinců, to není opravdu složité. Čím mladší jedinec je, tím je vyšší pravděpodobnost nákazy.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rod *Cryptosporidium*

Je celosvětově rozšířená skupina parazitických prvoků, infikujících nejčastěji mikroklky epitelálních buněk gastrointestinálního traktu téměř 30 druhů ptáků, 150 druhů savců včetně lidí, dále plazů, obojživelníků a ryb (Fayer et Xiao, 2007; Ryan, 2010).

Některé druhy rodu *Cryptosporidium* jsou schopné infikovat mnoho druhů, avšak jiné se jeví specializované pouze na určité skupiny živočichů, jako jsou hlodavci či přežvýkavci a nakonec jsou ty, které dokáží infikovat pouze jednoho hostitele (Fayer et Xiao, 2007). Podle lokalizace oocyst v trávicím traktu hostitele rozlišujeme dvě morfologicky rozdílné skupiny kryptosporidií: žaludeční kryptosporidie s afinitou k žaludečním žlázám a střevní kryptosporidie s afinitou k enterocytům střeva (Xiao et al., 2004). Obecně, střevní kryptosporidie způsobují průjmové onemocnění mající za následek dehydrataci a úbytek hmotnosti. V rámci rodu *Cryptosporidium* jsou druhy, které jsou výrazně patogenní a druhy, jejichž infekce probíhá více méně inaparentně. Některé infekce mohou být akutní a spontánně mizející, zatímco jiné jsou chronické (Fayer et Xiao, 2007). Patogenita a doba trvání infekce je závislá na stavu imunitního systému hostitele a druhu kryptosporidie. U imunokompetentních jedinců můžeme pozorovat mírné, střední nebo těžké příznaky akutní nemoci, zatímco u imunokompromitovaných jedinců můžeme pozorovat chronické příznaky nemoci, které mohou mít za následek i smrt hostitele (Fayer et Xiao, 2007).

Kryptosporidie se přenášejí pomocí oocyst, které jsou velmi odolné, přežívají nepříznivé podmínky vnějšího prostředí. Přenos oocyst je nejčastěji fekálně-orální cestou.

Ernest Edward Tyzzer byl první, kdo pozoroval kryptosporidie. V roce 1907 našel v žaludku laboratorní myši (*Mus musculus*) tyto prvoky a pojmenoval je *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1907). V roce 1912 popsal další nový druh *Cryptosporidium parvum* v tenkém střevě laboratorní myši (Tyzzer, 1912).

3.1.1 Taxonomie

Kryptosporidie patří do kmene Apicomplexa. Původně byly řazeny do třídy Coccidea, na základě podobnosti vývojového cyklu některých zástupců kokcií (Fayer et al., 1997) (Tabulka 1.).

Všichni zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou vnitrobuněční paraziti. Jsou to jaderní jednobuněční prvoci, což znamená, že většina jejich DNA je obsažena uvnitř jádra, které je obklopeno dvojitou membránou (Fayer et Xiao, 2007).

Pro identifikaci kryptosporidií se nejčastěji využívá morfologie oocyst, molekulární metody, lokalizace vývojového cyklu a reakce imunitního systému hostitele.

Tabulka 1. Taxonomická klasifikace rodu *Cryptosporidium* (Fayer et al., 1997; upraveno)

Klasifikace	Jméno	Charakteristika
Říše	Prvoci	Převážně jednobuněční; většina má hřebenovité mitochondrie, Goldiho aparát a peroxizomy
Kmen	Výtrusovci	Apikální komplex s polárním prstencem, rhoferiemi, mikronemi, konoidem a subpelikulární mikrotubuly
Třída	Sporozoa	Pohyb dospělého jedince pomocí vlnění těla
Podtřída	Gregarina	Životní cyklus gametogeneze, sporogeneze a neúplný vývoj části vajíčka
Řád	Eucoccidiorida	Životní cyklus s neúplným vývoje části vajíčka: u obratlovců
Podřád	Aimerie	Samčí a samičí pohlavní buňky se vyvíjejí nezávisle
Rod	Kryptosporidie	Paraziti, kteří potřebují k uzavření svého životního cyklu pouze jednoho hostitele se vyvíjejí pod povrchem membrán hostitelských buněk; oocysty bez sporocyst a se čtyřmi sporozity; mikrogamety jsou bezbičíkaté

V současné době je rozpoznáno a uznáno 28 druhů kryptosporidií a téměř trojnásobek genotypů (Fayer et Xiao, 2007; Šlapeta, 2012) (Tabulka 2.).

Tabulka 2. Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium* (Šlapeta, 2012; upraveno)

Druh	Autor	Hostitel	Lokalizace
<i>C. andersoni</i>	Lindsay et al., 2000	skot	žláznatý žaludek
<i>C. baileyi</i>	Current et al., 1986	slepice	Fabriciova burza
<i>C. bovis</i>	Fayer et al., 2005	skot	tenké střevo
<i>C. canis</i>	Fayer et al., 2001	pes	tenké střevo
<i>C. felis</i>	Iseki, 1979	kočka	tenké střevo
<i>C. galli</i>	Pavlásek, 1999	slepice	žláznatý žaludek
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan et al., 2002	člověk	tenké střevo
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955	krocan	tenké střevo
<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero et Sitja-Bobadilla, 2002	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. muris</i>	Tyzzler, 1910	myši	žaludek
<i>C. parvum</i>	Tyzzler, 1912	myši	tenké střevo
<i>C. scophthalmi</i>	Alvarez-Pellitero et al., 2004	platýs	střevo
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1980	hadi	žaludek
<i>C. suis</i>	Ryan et al., 2004	prase	tlusté střevo
<i>C. varanii</i>	Pavalásek et al., 1995	plazi	žaludek, tenké střevo
<i>C. wrairi</i>	Vetterling et al., 1971	morče	tenké střevo
<i>C. fayeri</i>	Ryan et al., 2008	klokan	neznámá
<i>C. fragile</i>	Jirků et al., 2008	obojživelníci	žaludek
<i>C. macropodum</i>	Power et Ryan, 2008	klokan	neznámá
<i>C. ryanae</i>	Fayer et al., 2008	skot	neznámá
<i>C. cuniculus</i>	Robinson et al., 2001	králíci	tenké střevo
<i>C. ubiquitum</i>	Fayer et al., 2010	savci	střevo
<i>C. tyzzeri</i>	Ren et al., 2011	hlodavci	tenké střevo
<i>C. ducismarci</i>	Traversa, 2010	plazi	nepublikováno
<i>C. xiaoi</i>	Fayer et Santín, 2009	ovce	střevo
<i>C. tyzzeri</i>	Ren et al., 2012	hlodavci	tenké střevo
<i>C. nasoris</i>	Hoover et al., 1981	ryby	nepublikováno
<i>C. cichlidis</i>	Paperna et Vilenkin, 1996	ryby	nepublikováno

3.1.2 Vývojový cyklus

Předpokládá se, že vývojový cyklus všech zástupců rodu *Cryptosporidium* probíhá stejně, nebo může probíhat s menšími odlišnostmi (Current et al., 1986). Životní cyklus většiny kryptosporidií probíhá v jednom hostiteli a je rozdělen do čtyř fází:

- 1) excystace (uvolnění sporozitů z oocysty),

2) merogonie (vegetativní forma sloužící k pomnožení parazita a šíření infekce (jedná se o nepohlavní rozmnožování)),

3) gametogonie (pohlavní rozmnožování, pohlavní buňky splývají v tzv. zygotu, která se posléze mění na oocystu),

4) sporogonie (způsob nepohlavního rozmnožování organismů, při němž se mateřská buňka rozpadá na množství nepohlavních spor, tj. buněk, které se tvarem i funkcí liší od buňky mateřské).

3.1.3 Zdroj infekce

Přenos z hostitele na hostitele je zajištěn fekálně-orální cestou. Formou přenosu může být přímý kontakt s infikovanou osobou nebo zvířetem.

Obecně, kontaminovaná voda a potrava znečištěná stolicí nebo trusem infikovaných jedinců představují nejčastější zdroj infekce v podobě vysoce odolných a životaschopných oocys (Caccio, 2005; Gatei et al., 2003).

4. DRUHY A GENOTYPY KRYPTOSPORIDIÍ INFIKUJÍCÍ DRŮBEŽ

Cryptosporidium spp. u ptáků bylo poprvé detekováno v roce 1929 Tyzzerem ve slepém střevě u kuřat, přičemž tento parazit nebyl pojmenován jako samostatný druh, protože připomínal již dříve popsany druh *C. muris* u myší (Tyzzer, 1907, 1910, 1929). V roce 1955, popsal Slavin strukturálně podobného parazita u krocanů a pojmenoval ho *Cryptosporidium meleagridis*. V roce 1986, Current et al. izolovali a popsali nový druh kryptosporidií ze slepic a pojmenovali ho *Cryptosporidium baileyi*. Zatím posledním popsáným druhem infikujícím drůbež a ptáky obecně je *Cryptosporidium galli* (Pavlásek, 1999). Infekce ptačími kryptosporidii byla popsána u více než 30 druhů ptáků, patřících do několika řádů - vrubozobí, dlouhokřídlí, měkkozobí, hrabaví, pěvci, papoušci a pštrosi (O'Donoghue et al., 1987; Goodwin, 1989; Lindsay et Blagburn, 1990; Current, 1988; Lindsay et al., 1991; Tsai et al., 1992; Latimer et al., 1993; Pavlásek, 1993; Smith et al., 1993; Gajadhar, 1994; Richter et al., 1994; Fujino, 1996). Zatím pouze tři ptačí *Cryptosporidium* spp. byly uznány jako samostatný druh - *C. meleagridis*, *C. baileyi*

a *C. galli*. Každý z těchto tří druhů infikuje odlišné spektrum hostitelů a liší se v lokalizaci infekce a velikosti oocyst (Tabulka 3.). Kryptosporidíóza u ptáků se může projevit ve třech formách: dýchací nemoc, střevní katar a onemocnění ledvin (Fayer et Xiao 2007). Obvykle jen jedna forma převládá (Lindsay et Blagburn, 1990).

Tabulka 3. Místo infekce ptačích druhů *Cryptosporidium* (Fayer et al., 1997; Lindsay and Blagburn, 1990; O'Donoghue, 1995; Sreter et Varga, 2000; Pavlásek, 1999; Ryan et al., 2003b; Fayer et Xiao, 2007)

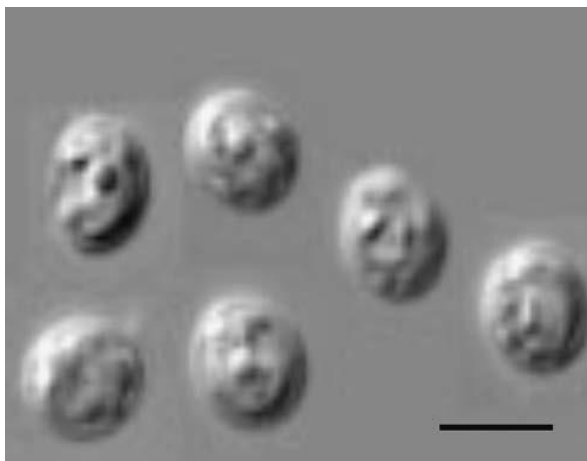
Druh	Místo infekce	Průměrná velikost oocyst v (μm)
<i>C. meleagridis</i>	Fabriciova burza, tenké a tlusté střevo	5,2 × 4,6/4,5–6,0 × 4,2–5,3
<i>C. baileyi</i>	Fabriciova burza, tenké a tlusté střevo, dýchací a zraková soustava	6,2 × 4,6/5,6–6,3 × 4,5–4,8
<i>C. galli</i>	žláznatý žaludek	8,3 × 6,3/8,0–8,5 × 6,2–6,4

4.1 *Cryptosporidium meleagridis*

4.1.1 Biologie

Tyzzer poprvé popsal ptačí *Cryptosporidium* v roce 1929, tehdy prohlásil, že tento druh je strukturálně podobný *C. muris* detekovanému u myši (Tyzzzer, 1929). Nepojmenoval tento organismus ani nepopsal jeho oocysty a nebylo tomu tak po 35 let. Na základě cytologického zkoumání a popsání oocyst byl parazit Slavinem v roce 1955 pojmenován jako *Cryptosporidium meleagridis* (Obrázek 1.) (Slavin, 1955). Tento druh má oválné oocysty měřící 5,2 × 4,6 μm, jež jsou velice podobné, až skoro nerozeznatelné od oocyst druhu *C. parvum* (Slavin, 1955).

Obrázek 1. Oocysty *Cryptosporidium meleagridis*, měřítko 5 μm (Fayer et Xiao, 2007; upraveno).



4.1.2 Vývojový cyklus

O vývojovém cyklu *C. meleagridis* je v současné době známo velmi málo. Slavin v roce 1955 popsal pouze jednu generaci merontů a merozoitů a všechny vývojová stádia gametogenie (Tabulka 4.). Doplnění vývojového cyklu tak, jak ho v současné době známe, pochází z popisu přirozené infekce 30 dní starého krocana. Histologické vyšetření tkání na přítomnost parazita prokázalo nejvyšší prevalenci u epitelálních buněk střeva a Fabriciovy burzy (Tacconi et al., 2001).

Tabulka 4. Vývojový cyklus *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin, 1955; upraveno)

Vývojová stádia	<i>C.meleagridis</i> (μm)
První generace merontů	5,0 \times 4,0
První generace merozoitů	5,0 \times 1,1
Počet merozoitů	8
Druhá generace merontů	Nebylo viděno
Druhá generace merozoitů	Nebylo viděno
Počet merozoitů	Nebylo viděno
Třetí generace merontů	Nebylo viděno
Třetí generace merozoitů	Nebylo viděno
Počet merozoitů	Nebylo viděno
Mikrogamont	4,0 \times 4,0
Mikrogamety	1,0 \times 0,3
Počet mikrogamet	16
Makrogamont	5,0 \times 4,0
Nevysporulované oocysty	4,5 \times 4,0
Vysporulované oocysty	Nebylo viděno

4.1.3 Hostitelé

Přirozená infekce *C. meleagridis* byla zaznamenána u širokého spektra ptačích druhů zahrnujícího krocany, papoušky a slepice (O'Donoghue, 1995; Morgan et al., 2000b; Sreter et Varga, 2000; Darabus et Olariu, 2003; Abe et Iseki, 2004).

Experimentální studie ukázaly, že *C. meleagridis* může infikovat brojlerová kuřata, kachny, krůty, telata, prasata, králíky, krysy a myši (O'Donoghue, 1995; Akiyoshi et al., 2003; Darabus et Olariu, 2003; Huang et al., 2003). Šíření infekce *C. meleagridis* u kuřat byla různorodá, ale nejčastěji je infekce lokalizována v kyčelníku a ve slepém střevě.

Cryptosporidium meleagridis se vyskytuje i u lidí, je to třetí nejběžnější kryptosporidie u lidí (McLauchlin et al., 2000; Morgan et al., 2000a; Guyot et al., 2001; Pedraza-Diaz et al., 2001; Xiao et al., 2001; Yagita et al., 2001; Enemark et al., 2002; Gatei et al., 2002; Tiangtip et Jongwutiwes, 2002; Cama et al., 2003; Gatei et al., 2003; Leoni et al., 2003; Matos et al., 2004; Xiao et al., 2004; Coupe et al., 2005; Gatei et al., 2006a; Gatei et al., 2006b; Leoni et al., 2006a; Muthusamy et al., 2006). *Cryptosporidium meleagridis* napadá u lidí převážně trávicí soustavu. V nedávné studii zahrnující molekulární charakteristiku bylo provedeno testování u více než 2000 lidí a u 22 (~1%) byla prokázána infekce *C. meleagridis* (Pedraza-Diaz et al., 2001; Leoni et al., 2006a). V Peru na základě studie byl prokázán mnohem vyšší výskyt *C. meleagridis* u lidí než *C. parvum* (Cama et al., 2003).

4.1.4 Patogenita

Kuřata orálně infikovaná *C. meleagridis* vykazovala největší produkci oocyst v kyčelníku, slepém střevě, tračníku a Fabriciově burze (Bermudez et al., 1988).

Změny na sliznici u kuřat infikovaných *C. meleagridis* se projevovaly nepatrným zkrácením střevních klků a nepravidelným povrchem výstelkové vrstvy (Akiyoshi et al., 2003). Infekce *C. meleagridis* je spojena s průjmovým onemocněním a s hubnutím (Slavin, 1955; Gharagozlu et al., 2006). Brojlerová kuřata infikovaná oocystami *C. meleagridis* v dávce 5×10^5 ve věku 7, 14 a 21 dní vykazovala zjevné příznaky infekce, avšak nebyla u nich zaznamenána žádná vyšší úmrtnost nebo úbytek na váze (Tumova et al., 2002). Zpomalení růstu bylo pozorováno 2 týdny po

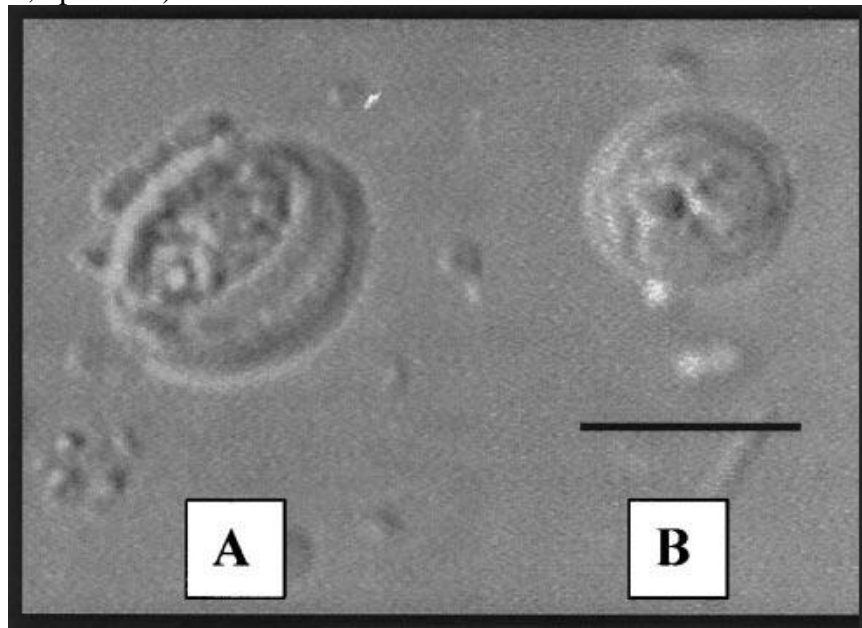
infekci. Nicméně kompenzační růst začal v momentě, kdy se začaly uvolňovat oocysty. Počet oocyst ve vzorcích trusu nakažených *C. meleagridis* byl dvakrát až třikrát nižší než ve vzorcích trusu kuřat nakažených *C. baileyi* (Fayer et Xiao, 2007). Kuřata nakažená současně *C. baileyi* a *C. meleagridis* (každá dávkou 5×10^5) měla znatelně nižší finální živou hmotnost a sníženou schopnost efektivně přijímat potravu, než kuřata nakažená samotnou *C. baileyi*. Souběžná infekce *C. baileyi* nebo *C. meleagridis* nemá vliv na uvolňování oocyst (Tumova et al., 2002).

4.2 *Cryptosporidium baileyi*

4.2.1 Biologie

Druhý ptačí druh *Cryptosporidium* byl vyizolován z brojlerových kuřat. Na základě prostudování životního cyklu a morfologie byl tento druh pojmenován *C. baileyi* (Current et al., 1986). Druh byl takto pojmenován na počest pana W. S. Bailey, prezidenta Auburnské univerzity za průkopnickou práci na biologii *Spirocerca lupi*. Prepatentní perioda byla 3 dny, patentní perioda od 20 do 10 dnů u ptáků infikovaných ve věku 2 dnů. U tohoto druhu bylo zaznamenáno jen málo tenkostěnných oocyst, nejvíce jich bylo tlustostěnných. Životaschopné oocysty jsou větší než oocysty druhu *C. meleagridis* a měří $6,3 \times 5,2 \mu\text{m}$ (Fayer et Xiao, 2007) (Obrázek 2.).

Obrázek 2. Oocysty *C. baileyi* (A) a *C. meleagridis* (B) (měřítko 5 μm) (Sreter et Varga, 2000; upraveno)



4.2.2 Vývojový cyklus

Vývojový cyklus *C. baileyi* byl podrobně popsán v publikaci Current et al. (1986) (Tabulka 5.). Přirozená infekce *C. baileyi* byla zaznamenána na mnoha místech těla ptačích hostitelů včetně spojivek, nosohltanu, průdušnice, vzdušných vaků, tenkého, slepého a tlustého střeva, kloak, Fabriciovy burzy, ledvin a močových cest (Lindsay et Blagburn, 1990). Během prvních 3 dnů infekce byla většina vývojových stádií *C. baileyi* pozorována v kyčelníku a tlustém střevě. Po 4 dnech infekce se většina parazitů projevila na enterocytech kloaky a Fabriciově burze (Obrázek 3.). Dospělí meronti prvního typu s 8 merozoity se poprvé objevili 12 hodin po orálním podání infekce a měřili $5,0 \times 4,9 \mu\text{m}$. Dospělí meronti druhého typu se 4 merozoity a velké granulózní zbytky se poprvé objevili 48 hodin po orálním podání infekce a měřili $5,1 \times 5,1 \mu\text{m}$.

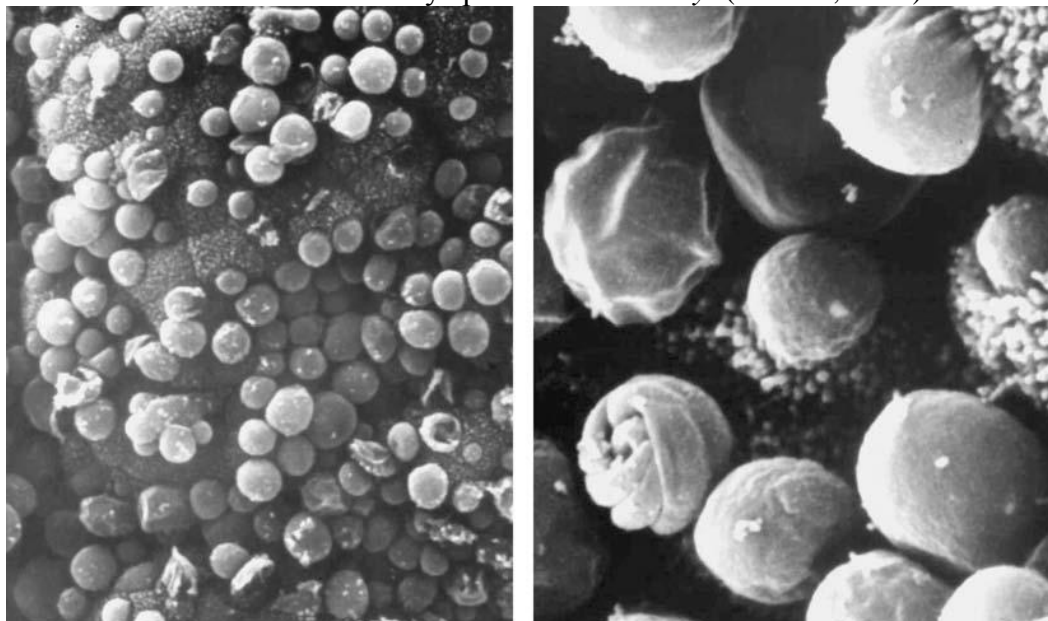
Meronti třetího typu s 8 krátkými merozoity a velké homogení zbytky se objevili poprvé 72 hodin po podání infekce orální cestou a měřili $5,2 \times 5,1 \mu\text{m}$. Mikrogamonti o rozměrech $4,0 \times 4,0 \mu\text{m}$ vyprodukují přibližně 16 mikrogamet, se kterých se vyvinou mikrogamety o rozměrech $4,7 \times 4,7 \mu\text{m}$. Fertilní makrogamety dají vzniknout dvěma typům oocyst, které sporulují v těle hostitele. Většina z nich je silnostěných o rozměrech $6,3 \times 5,2 \mu\text{m}$. Tyto oocysty jsou odolné a jsou z hostitele

vylučovány s trusem. Tenkostěnné oocysty praskají v těle hostitele a sporozoiti z tenkostěnných oocyst napadají další enterocyty. Přítomnost tenkostěnných, autoinfektivních oocyst a merontů prvního typu může vysvětlovat proč se u kuřat může vyvinout těžká střevní infekce trvající 21 dnů. Vybraná vývojová stádia jsou zaznamenána na obrázku 4. (Fayer et Xiao, 2007).

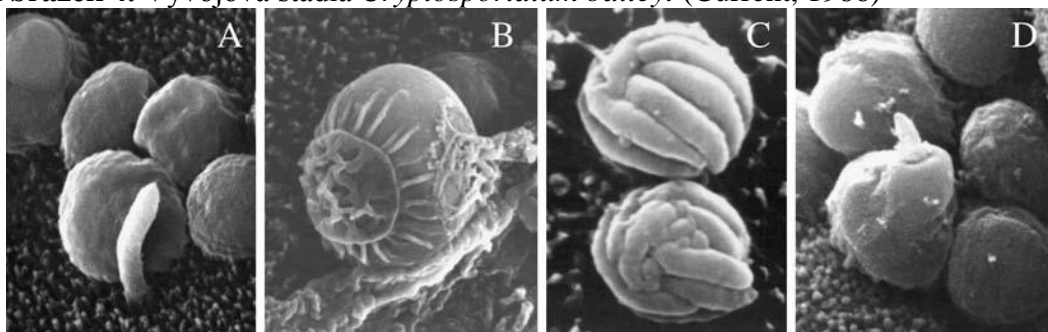
Tabulka 5. Vývojový cyklus *Cryptosporidium baileyi* (Current, 1986; upraveno)

Vývojová stádia	<i>C. baileyi</i> (μm)
První generace merontů	5,0 × 4,9
První generace merozoitů	6,9 × 1,1
Počet merozoitů	8
Druhá generace merontů	5,1 × 5,1
Druhá generace merozoitů	5,0 × 1,3
Počet merozoitů	4
Třetí generace merontů	5,2 × 5,1
Třetí generace merozoitů	3,6 × 1,1
Počet merozoitů	8
Mikrogamont	4,0 × 4,0
Mikrogamety	1,7 × 0,5
Počet mikrogamet	16
Makrogamont	5,8 × 5,8
Nevysporulované oocysty	6,3 × 5,2
Vysporulované oocysty	6,2 × 4,6

Obrázek 3. Infekce sliznice kloaky způsobená *C. baileyi* (Current, 1986)



Obrázek 4. Vývojová stádia *Cryptosporidium baileyi* (Current, 1986)



(A) Jeden merozoit proniká do hostitelské buňky. (B) Pohled na bazální konec feeder organely po odloučení parazita od hostitelské buňky. (C) Dva meronti prvního typu. (D) Mikrogameta postupující makrogametu.

4.2.3 Patogenita

V malé míře byla pozorována vývojová stádia u některých mladých krocanů a závažnější infekce se projeví pouze ve Fabriciově burze u 1 a 2 denních hus (Current et al., 1986). U experimentálně infikovaných jedinců (inhalací (IT)) byla pozorována rozsáhlá infekce dýchacího ústrojí a s tím spojená vysoká úmrtnost (Lindsay et al., 1986; Blagburn et al., 1987; Lindsay et al., 1987a; Lindsay et Blagburn, 1990). U několika ptáků se projevila infekce na spojivkách, konkrétně ve spojivkovém vaku (Lindsay et al., 1987a). Odolnost proti infekci *C. baileyi* v

závislosti na věku byla pozorována i kuřat infikovaných v 1. a 9. týdnu stáří (Sreter et al., 1995, 2000) (Tabulka 6.). Prepatentní perioda byla výrazně kratší u starších jedinců a patentní perioda byla výrazně delší u mladších jedinců. Kuřata infikovaná v jednom týdnu věku vylučovala trojnásobný počet oocyst než ta co byla infikována ve věku 9 týdnů (Sreter et al., 1995).

Tabulka 6. Délka prepatentní, patentní periody a celkový počet vyloučených oocyst u slepic infikovaných oocystami *Cryptosporidium baileyi* v množství 6×10^5 ve stáří 1 týden (Skupina 1) a ve stáří 9 týdnů (Skupina 2) (Sreter et al., 1995; upraveno).

Skupina 1			Skupina 2		
Prepatentní perioda (dny)	Patentní perioda (dny)	Celkový počet vyloučených oocyst ($\times 10^6$)	Prepatentní perioda (dny)	Patentní perioda (dny)	Celkový počet vyloučených oocyst ($\times 10^6$)
6	10	53.6	8	4	0.7
5	11	50.2	6	8	26.2
5	12	32.6	6	9	19.0
5	12	38.3	5	9	22.9
6	15	112.6	6	9	38.1
6	20	42.2	6	10	23.3
5	20	327.4	6	11	52.1
5	26	168.4	6	12	54.0
5	27	426.3	6	12	94.3
6	35	51.4	8	13	249.2
5	46	405.9	7	14	194.3
5	151	841.9	5	15	93.7

4.2.4 Hostitelé

Cryptosporidium baileyi je pravděpodobně nejběžnější ptačí druh rodu *Cryptosporidium*. Přírozená infekce byla zaznamenána u mnoha ptačích hostitelů jako jsou: racek chechtavý (*Larus ridibundus*), slepice (*Gallus gallus* f. *domestica*), kormoráni (*Phalacrocorax* spp.), jeřáb popelavý (*Grus grus*), tukan bělolící (*Ramphastos vitellinus*), snovač jacksonův (*Ploceus jacksoni*), krocán domácí (*Meleagris gallopavo* f. *domestica*), kachna divoká (*Anas platyrhynchos*), husa domácí (*Anser anser domesticus*), korela chocholátá (*Nymphicus hollandicus*), křepelka japonská (*Coturnix japonica*), bulbul šedobřichý (*Pycnonotus cyaniventris*), pštros dvouprstý (*Struthio camelus*), vlhovec červenohřbetý (*Cacicus haemorrhous*),

vlhovec chocholatý (*Psarocolius decumanus*), amazoňan zelenolící (*Amazona viridigenalis*), alexandr malý (*Psittacula krameri*) a koroptev polní (*Perdix perdix*) (Lindsay et Blagburn, 1990; Pavlásek, 1993; Ryan et al., 2003a; Abe et Iseki, 2004; Jellison et al., 2004; Kimura et al., 2004; Chvala et al., 2006).

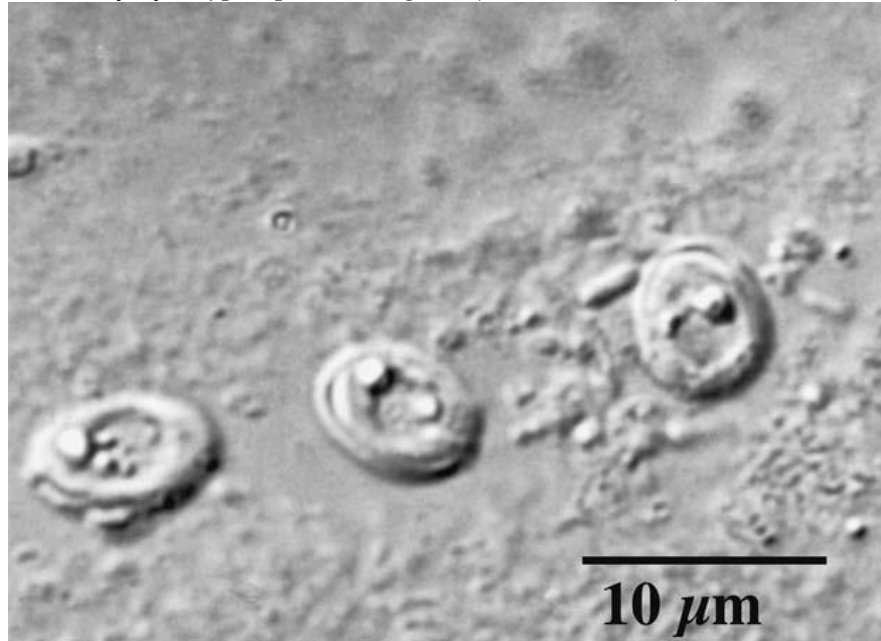
Experimentální studie ukázaly, že *C. baileyi* může infikovat křepelku japonskou (*Coturnix japonica*), kachnu domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*), bažanta obecného (*Phasianus colchicus*), orebice čukar (*Alectoris chukar*) (Current et al., 1986; Lindsay et al., 1987a; Lindsay et al., 1989b; Lindsay et Blagburn, 1990; Gomez-Couso et al., 2005).

4.3 *Cryptosporidium galli*

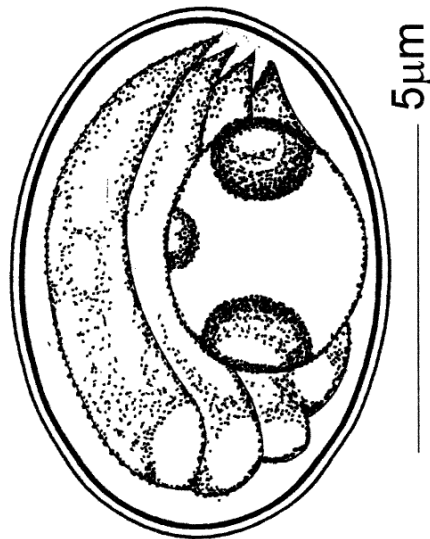
4.3.1 Biologie

Třetí ptačí druh rodu *Cryptosporidium* byl popsán u kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) Pavláskem v roce 1991 a pojmenován *C. galli* (Pavlásek, 1991). Nedávno byl tento parazit podrobněji prozkoumán na základě molekulárních a biologických rozdílů oproti jiným ptačím kryptosporidiím (Ryan et al., 2003). Oocysty *C. galli* izolované z exkrementů nebo z obsahu žláznatého žaludku slepice mají široce vejčitý až oválný tvar a jsou větší než ostatních ptačí kryptosporidie (Obrázek 5.), měří $8,25 \times 6,3$ ($8,0-8,5 \times 6,2-6,4$) μm , s indexem tvaru oocysty 1,3 (Pavlásek, 2001). Zbytkové kulovité tělísko oocysty o velikosti $3,6-4,0$ μm nejčastěji obsahuje 3 granula. Dvě z těchto granul jsou obvykle větší (o velikosti přibližně $1,6$ μm) a jsou uloženy v pozici naproti sobě. Zbývající granulum je menší (o velikosti přibližně $0,5-0,8$ μm). Zbytkové tělísko je obklopeno sporozity ve tvaru banánu (o velikosti přibližně $12,8-14,4 \times 0,8-1,0$ μm) (Obrázek 6.). Experimentální studie ukázaly, že oocysty *C. galli* jsou infekční pro 9 dní staré jedince avšak ne pro jedince staré 40 dní (Pavlásek, 2001).

Obrázek 5. Oocysty *Cryptosporidium galli* (Pavlásek, 2001)



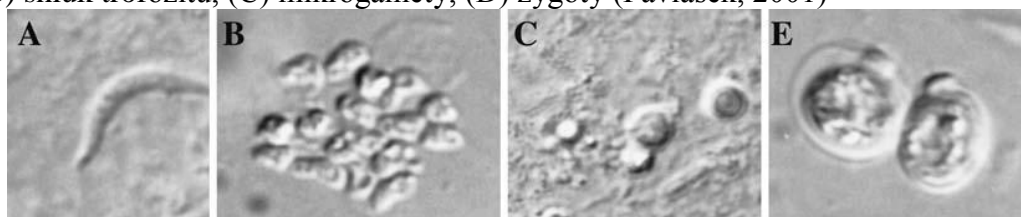
Obrázek 6. Perokresba *Cryptosporidium galli* (Pavlásek, 2001)



4.2.2 Vývojový cyklus

Zatím o tomto druhu kryptosporídie není příliš mnoho známo, avšak víme, že na rozdíl od jiných ptačích druhů *Cryptosporidium* vývojový cyklus *C. galli* probíhá ve žláznatém žaludku a ne v dýchacím ústrojí nebo tlustém a tenkém střevě (Pavlásek, 1999, 2001). Jednotlivá stádia vývojového cyklu jsou zachycena na obrázku 7 (Pavlásek, 2001).

Obrázek 7. Některá stádia z vývojového cyklu *Cryptosporidium galli*. (A) sporozoit, (B) shluk trofozitů, (C) mikrogamety, (D) zygoty (Pavlásek, 2001)



4.2.3 Patogenita

Výzkum potvrdil, že kryptosporidióza způsobená *C. galli* je spojená s vysokou morbiditou a mortalitou (Blagburn et al., 1990; Morgan et al., 2001; Pavlásek, 1999, 2001). Patologické změny nakažených pěnkav jsou charakterizované nekrózou a hyperplazií proventikulárních epitelových buněk. Velký počet oocyst je navázán na povrchu buněk žláznatého žaludku (Morgan et al., 2001).

4.2.4 Hostitelé

Ukázalo se, že *C. galli* může infikovat široké spektrum různých druhů ptáků. Přirozená infekce byla zaznamenána u těchto druhů: pěnkava (*Fringilla*), kuře (*Gallus gallus domesticus*), tetřev hlušec (*Tetrao urogallus*), híl křivčí (*Pinicola enucleator*), neoféma tyrkysová (*Neophema pulchella*), plameňák růžový (*Phoenicopterus ruber*), kardinál dominikánský (*Paroaria dominicana*) a dvojzoborožec velký (*Buceros rhinoceros*) (Pavlásek, 1999, 2001; Ryan et al., 2003a; Ng et al., 2006). Navíc morfoloicky podobné oocysty byly pozorovány u mnoha divokých exotických ptáků zahrnující bažantovité (Phasianidae), pěvce (*Passeriformes*) a vlhovcovité (*Icteridae*) (Ryan et al., 2003b). Byla provedena experimentální infekce izolátem oocyst ze slepic na kuřata. Prepatentní perioda byla 25 dnů a patentní období trvalo 6 dnů (Pavlásek, 2001). *Cryptosporidium galli* není infekční pro člověka. Budoucí studie budou vyžadovat určit přesný okruh hostitelů pro *C. galli*.

4.4 Ostatní druhy a genotypy kryptosporidií infikující ptáky

Mimo výše popsané druhy bylo detekováno a identifikováno dalších 10 nových ptačích genotypů. Dále byl u ptáků popsán výskyt *Cryptosporidium hominis* a *Cryptosporidium parvum*, který se běžně u ptačích hostitelů nevyskytuje.

4.4.1 *Cryptosporidium* avian genotypy I–IV

Cryptosporidium avian genotypy I–IV byly identifikovány u různých ptačích hostitelů (Meireles et al., 2006; Ng et al., 2006).

Na základě analýzy části genu pro malou ribozomální podjednotku SSU rRNA byla zjištěna podobnost avian genotypů I a II s *C. baileyi*. Byla provedena experimentální infekce oocystami avian genotyp II dvou skupin 2 denních kuřat, která trvala 4 týdny. Histologické a fekální vyšetření nepotvrdila pozitivní infekci (Meireles et al., 2006). Slabá infekce avian genotype II byla prokázána v kloace a Fabriciově burze u pštrosů (Santos et al., 2005). V dřívějším výzkumu byla zaznamenána infekce *Cryptosporidium* sp. ve výkalech pštrosů dovezených do Kanady (Gajadhar, 1994). Bylo zde vyšetřeno 165 vzorků, z toho 14 pozitivních (8,5%). Bylo vyzolováno 40 oocyst, které byly změřeny a jejich velikost se pohybovala v rozmezí $3,9\text{--}6,1 \times 3,3\text{--}5,0 \mu\text{m}$. Tento izolát byl použit na experimentální infekce myší, kuřat, krocanů a křepelek, avšak bez úspěchu. Molekulární data a izoláty této infekce nejsou dostupné, proto není možné odhadnout, zda se jedná o stejnou infekci avian genotype II, která je popsána v publikaci Santos et al. (2005).

Bylo zjištěno, že Avian genotyp III se podobá nejvíce genotypu detekovanému u sluky lesní. Oocysty avian genotyp III měří $7,5 \times 6,0 \mu\text{m}$, což je větší než oocysty *Cryptosporidium serpentis* měřící $5,94 \times 5,11 \mu\text{m}$, avšak menší než genotyp sluky lesní, jehož oocysty měří $8,5 \times 6,4 \mu\text{m}$.

Avian genotyp IV byl identifikován u kruhoočka japonského (*Zosterops japonicus*) a molekulárně se nejvíce podobá *C. galli*. Oocysty jsou stejně velké jako oocysty *C. galli*, tedy $8,25 \times 6,3 \mu\text{m}$. U všech těchto ptačích genotypů *Cryptosporidium* nebyly zaznamenány žádné klinické příznaky jako průjem, dušení a kýčání.

4.4.2 *Cryptosporidium* Wood–cock genotyp

Wood-cock genotyp se řadí do skupiny žaludečních kryptosporidií, jako jsou *C. serpentis*, *C. muris*, *C. andersoni* (Ryan et al., 2003a; Ng et al., 2006). Veškerá endogenní vývojová stádia byla zaznamenána jen ve žláznatém žaludku.

4.4.3 *Cryptosporidium* Duck genotyp

Nový genotyp byl identifikován v kachně černé (Morgan et al., 2001) a je nejvíce podobný Goose genotypům I a II. Mikroskopická analýza pomocí hematoxylinu a eozinu z trusu kachny černé indikovala silnou střevní infekci. Goose genotyp byl identifikován u husy kanadské (*Branta canadensis*) (Jellison et al., 2004; Zhou et al., 2004).

4.4.4 *Cryptosporidium* Goose genotyp I–IV

Nedávná studie, která byla provedena na 13 místech v Ohiu a Illinois, prokázala přítomnost Goose genotypu I a II, a Duck genotypu. Tyto tři genotypy byly detekovány u husy kanadské. Sekvence a fylogenetická analýza prokázala velkou podobnost Goose genotypu I–II s Duck genotypem (Zhou et al., 2004). V další studii v USA byly detekovány Goose genotyp III–IV u husy kanadské (Jellison et al., 2004).

4.4.5 Infekce *C. parvum* u ptáků

Nedávno byla potvrzena střevní kryptosporidíóza způsobená *C. parvum* u dytíka úhorního (*Burhinus oedicnemus*) v Dubai, což potvrzuje schopnost *C. parvum* infikovat ptačí hostitele (Zylan et al., 2008).

5. MATERIÁL A METODIKA

5.1 Charakteristika chovů

Při odběrech vzorků bylo navštíveno 20 malochovů v mnoha částech celé České republiky. Všechny chovy zahrnovaly maximálně 20 slepic nosného a kombinovaného typu. Slepice byly ustájeny v kurnících, které splňovaly veškeré předpoklady pro chov tj. světlé, slunné, vzdušné, avšak bez průvanu, pokud možno bez námrazy, bezpečné před dravou zvěří, na spodní straně dobře izolované proti vztlínající vlhkosti. Charakteristika všech chovů je uvedena v tabulce 7.

Tabulka 7. Charakteristika vyšetřovaných chovů

Lokalita	Plemeno (hybrid)	Typ Plemene	Stáří zvířat (v týdnech)	Počet zvířat	Počet vzorků
Čelkovice	Tetra	Nosný	40-100	10	9
Domažlice	Moravie	Nosný	30-120	13	12
Frýdek-Místek	ISA Brown	Nosný	20-50	15	15
Hlinice	Česká zlatá kropenka	Nosný	40-120	11	12
Holubov	ISA Brown	Nosný	20-50	12	12
Chýnov	Hempšírka	Kombinovaný	15-50	15	15
Milevsko	Vlaška	Nosný	20-50	16	15
Obrataň	Česká zlatá kropenka	Nosný	30-110	13	12
Oltyně	Hisex	Nosný	15-40	15	15
Radenín	Leghornka	Nosný	40-80	16	15
Sezimovo Ústí 2	Česká zlatá kropenka	Nosný	30-70	18	15
Soběslav	Vlaška	Nosný	40-80	15	15
Srubec u Českých Budějovic	ISA Brown	Nosný	30-60	15	15
Tučapy	Bílá rodajlendka	Kombinovaný	20-50	12	12
Větrovy	Vlaška	Nosný	40-90	14	15
Voltýřov	Leghornka	Nosný	30-60	16	15
Všechov	Hisex	Nosný	30-60	13	12
Záříbničná lhota	Hempšírka	Kombinovaný	40-80	14	12
Zbelítov	Česká zlatá kropenka	Nosný	30-90	17	15
Zňátky	Rodajlendka	Kombinovaný	40-120	11	12

5.2 Odběr vzorků na rozbor

Odběry vzorků byly provedeny v roce 2011 a 2012. Vzorky trusu byly uchovávány maximálně při teplotě 6 °C v igelitových sáčkích popsaných pořadovým číslem a následně nejpozději do 72 hodin vyšetřeny. Celkem bylo odebráno 270 vzorků u slepic ve věku 15–120 týdnů.

5.3 Barvení oocyst kryptosporidií anil-carbol-methylvioletí dle Miláčka a Vítovce (1985)

Použité roztoky:

Roztok methylvioleti:

Methylviolet'	0,6 g
Anilin	1 ml
Fenol	1 g
Alkohol 96%	30 ml
Deionizovaná voda	70 ml

Roztok tartrazinu:

1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

Kyselina sírová:

2% kyselina sírová

Pracovní postup:

1. Nanést a rozetřít vzorky na podložní sklíčko.
2. Fixovat methanolem v plameni.
3. Barvit roztokem methylvioleti 30 minut.
4. Opláchnout vodou.
5. Diferencovat 2% kyselinou sírovou 2 minuty.
6. Opláchnout vodou.
7. Dobarvit tartrazinem 2 minuty.
8. Opláchnout vodou.
9. Sušit.

Výsledek: zbarvení oocyst modrofialové na žlutém pozadí.

Preparáty byly prohlíženy světelným mikroskopem (Nikon Alphaphot-2 YS2) za použití imerzního oleje při zvětšení 1000×. Vždy byl prohlédnut celý preparát.

5.4 Odhad intenzity infekce

Pracovní postup:

1. Zvážit podložní skla před natřením trusu s přesností na 0,001 g.
2. Natřít vzorky trusu.
3. Zvážit hmotnosti natřených vzorků.
4. Barvit metodou dle Miláčka a Vítovce.
5. Prohlédnout celý preparát a spočítat oocysty v nátěru.

Na základě hmotnosti vzorku a počtu oocyst odhadnout intenzitu infekce a počet oocyst v gramu trusu (OPG).

5.5 Izolace DNA

Celková DNA byla extrahována přímo z trusu pomocí komerčního kitu Invitek (PSP® Spin stool DNA kit).

Materiál: 200 mg čerstvého nebo zmraženého trusu

Proteinase K lyofylizát: rozpustit přidáním 1,5 ml neionizované PCR vody. Po rozpuštění skladovat při -20 °C.

Elution Buffer D: odpipetovat do mikrozkušavky (200 µl/1 vzorek) a inkubovat předem při 70 °C.

Pracovní postup:

1. Dát materiál do Safe-Lock-Tube, přidat skleněné kuličky a 1 ml Lysis Buffer P a rozbít 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s užitím Bead-beateru (Fast-Prep 24 Instrument).
2. Inkubovat 10 minut/95 °C v termobloku.
3. Centrifugovat 1 minutu/16 000 g.
4. Přenést veškerý supernatant do InviAdsorb-Tube, 15 s vortex, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat 3 minuty/16 000 g.
5. Supernatant přepipetovat do čistých 1,5 ml mikrozkušavek, centrifugovat 3 minuty/16 000 g.

6. Do čistých 1,5 ml mikrozkušavek napipetovat 25 μ l Proteinase K a přidat 400 μ l supernatantu, zvortexovat.
7. Inkubovat 10 minut/70 °C v termobloku.
8. Připipetovat 400 μ l Binding Buffer P, zvortexovat.
9. Přepipetovat veškerý objem do Spin Filter + Tube, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu/16 000 g.
10. Vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, na kolonu napipetovat 500 μ l Wash Buffer I, centrifugovat 1 minutu/16 000 g.
11. Vylít odpad ze sběrných mikrozkušavek, na kolonu napipetovat 800 μ l Wash Buffer II, centrifugovat 1 minutu/16.000 g.
12. Vylít odpad ze sběrných zkumavek a opět centrifugovat 3 minuty/16 000 g.
13. Kolonu přenést na čistou 1,5 ml mikrozkušavku, napipetovat 200 μ l Elution Buffer D (předehřátého) na kolonu, inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu/5 900 g.
14. Vyizolovanou DNA skladovat při teplotě -20 °C

5.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Použité chemikálie:

1. H₂O
2. MgCl₂ (25 mM)
3. BSA (Bovinní sérový albumin; 10mg/ml)
4. dNTP's (Deoxyribonukleosid trifosfáty; 1,25 mM)
5. Forward primer
6. Reverse primer
7. Taq Polymeráza (1U/ μ l)
8. 10 \times buffer (kombinace solí; 15 mM)
9. DNA

Byl použit nested PCR protokol pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA; Jiang et al., 2005) (Tabulka 9 a 10.). Celkový objem reakční směsi pro jednotlivé polymerázové reakce byl 20 μ l pro primární reakci a 20 μ l pro sekundární reakci (Tabulka 11.).

Tabulka 9. Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu SSU rRNA

Složky primární reakce	koncentrace	objem (μl)	Složky sekundární reakce	koncentrace	objem (μl)
H ₂ O	-----	11,30	H ₂ O	-----	12,10
MgCl ₂	25mM	1,20	MgCl ₂	25mM	1,20
10× buffer	-----	2,00	10× buffer	-----	2,00
dNTP	1,0 mM	0,40	dNTP	1,0 mM	0,40
Primer Forward	10 μM	0,40	Primer Forward	10 μM	0,40
Primer Reverse	10 μM	0,40	Primer Reverse	10 μM	0,40
BSA	10 mg/ml	0,80	-----	-----	-----
Taq	1U/1 μl	0,50	Taq	1U/1 μl	0,50
DNA	-----	3,00	DNA	-----	3,00
celkem		20,00	Celkem		20,00

Tabulka 10. Sekvence primerů pro amplifikaci část genu pro SSU rRNA

Primární	Forward	5'-TCTAGAGCTAATACATGCG-3'
	Reverse	5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'
Sekundární	Forward	5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'
	Reverse	5'-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3'

Tabulka 11. Amplifikační program pro termocycler

Procedura	Teplota	Doba trvání
Počáteční denaturace	94 °C	3 min.
Denaturace	94 °C	45 s
Nasedání primerů	55 °C	45 s
Dosyntetizování nového řetězce	72 °C	1 min.
Finální extenze	72 °C	7 min.

} 35×

5.7 Gelová elektroforéza

Gelovou elektroforézou byla ověřena velikost PCR fragmentů. Výsledný PCR produkt byl detekován na 1% agarózovém gelu s přidáním ethidium-bromidu a vizualizován za pomoci UV záření o vlnové délce 312 nm.

Použité chemikálie:

1. 50× TAE pufr (242 g tris báze; 57,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA pH=8; doplnit do 1000 ml dH₂O)

2. 1× TAE pufr (naředěním zásobního roztoku 50×)
3. agaróza
4. ethidium-bromid (koncentrace 10 mg/ml)
5. 100 bp ladder (Fermentas)

Pracovní postup:

1. Smíchat 0,4 g agarózy s 40 ml 1×TAE pufrem.
2. Nechat rozpustit v mikrovlnné troubě. Následně zchladit pod proudem tekoucí vody na teplotu přibližně 50 °C.
3. Přidat 3 µl ethidium-bromidu (flourescenční barvivo, které se velmi intenzivně a specificky váže mezi báze DNA).
4. Gel nalít do připravené formy, následně vložit hřeben a nechat ztuhnout.
5. Po ztuhnutí gelu přenést do elektroforetické vany naplněné 1×TAE.
6. Do první jamky nanést 5 µl ladderu a do dalších vždy po 20 µl sekundárního PCR produktu.
7. Napětí elektroforézy nastavit v rozmezí 70 – 90 V a spustit na dobu potřebnou pro separaci DNA fragmentů (cca. 50 minut).
8. Pro zobrazení DNA fragmentů byl použit UV transiluminátor (vlnová délka 312 nm).

5.8 Extrakce DNA z gelu

Na extrakci DNA z gelu byl použit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Pracovní postu:

1. Vyříznout fragment DNA z gelu čistým skalpelem a dát ho do připravené 1,5 ml mikrozkuhavky.
2. Do 1,5 ml mikrozkuhavky s fragmentem gelu připipetovat 400 µl QG pufru.
3. Inkubovat 10 minut při 50 °C v termobloku, kontrolovat rozpouštění a míchat každé 2–3 minuty během rozpouštění.
4. Po rozpouštění musí být v 1,5 ml mikrozkuhavce žlutý roztok (nikoli oranžový nebo fialový).

5. Přepipetovat veškerý objem na kolonu a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g (kolona pojme 800 µl, vzorky s větším objemem nanášet postupně a postupně centrifugovat).
6. Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět ji použít s kolonou.
7. Na kolonu připipetovat 500 µl QG pufru a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
8. Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět ji použít s kolonou.
9. Kolonu promýt připipetováním 750 µl PE pufru, inkubovat 2–5 minut při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
10. Vylít odpad ze sběrné zkumavky, opět ji použít s kolonou a centrifugovat znovu 1 minutu při 16 000 g.
11. Kolonu vložit do nové 1,5 ml mikrozkušavky a provést eluci napipetováním 30–50 µl EB pufru nebo PCR vody přímo na střed kolony. Inkubovat 1 minutu a poté centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
12. Získaná DNA byla vysušena evaporizátorem (Speed Vac) a skladována při 4 °C

5.9 Sekvence

Sekundární produkty z PCR byly sekvenovány za použití sekundárních primerů. K přípravě vzorků k sekvenaci byl použit ABI BigDye® Terminator v 3. 1. Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

Sekvenační reakce byla zakázkově provedena Laboratoří genomiky Biologického centra Akademie věd České republiky. Sekvence byly upraveny pomocí programu ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank pomocí programu ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>).

5.10 Fylogenetická analýza

Evoluční odlišnosti jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií byly vypočteny Neighbor-Joining metodou (Saitou et Nei, 1987) založenou na 2-parametrickém distančním modelu dle Kimury (Kimura, 1980). Bootstrapový konsenzus výsledného

stromu byl získán na základě 1000 opakování. Pro konstrukci stromů byl použit program TREECON verze 1.3b.

6. VÝSLEDKY

6.1 Výsledky a prevalence

V průběhu sledování bylo vyšetřeno 270 vzorků trusu z 20 chovů. Téměř všechny chovy byly zaměřeny na produkci vajec nebo kombinovanou užitkovost.

Z celkového počtu 270 vzorků bylo 8 pozitivních (3 %). Kryptosporidiová infekce byla nalezena pouze v 1 chovu z 20 a to ve Frýdku-Místku (Tabulka 12.). V tomto chovu bylo odebráno 15 vzorků od hybridního plemene ISA Brown ve stáří 20–50 týdnů. V porovnání s jinými chovy, kde byly slepice ve věku 40–120 týdnů, zde byly slepice velice mladé. Všechny vzorky byly vyšetřeny jak mikroskopicky tak molekulárními metodami. Z 15 vzorků odebraných v tomto chovu bylo 8 pozitivních (53 %) z celkového počtu hybridů ISA Brown odebraných a vyšetřených ve všech chovech byla prevalence 19,04%. V rámci všech chovů byla prevalence 5%. U slepic v chovu Frýdek-Místek byl pozorován průjem a u dvou jedinců menší apatičnost. Jednalo se o mladší jedince ve stáří přibližně 25 týdnů. U těchto 8 pozitivních vzorků byl proveden odhad intenzity infekce, která dosahovala až 230 000 oocyst na gram trusu (OPG) (Tabulka 13.). Velikost oocyst detekovaného genotypu byla $4,4 \times 4,1 \mu\text{m}$ (Obrázek 8.).

Tabulka 12. Prevalence v jednotlivých chovech

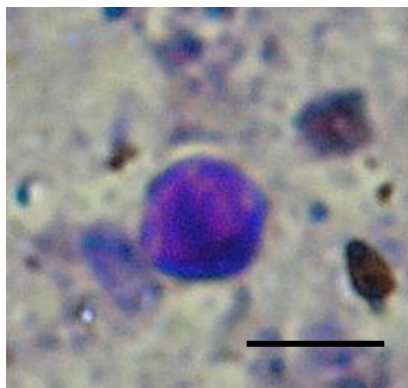
Lokalita	Prevalence (%)
Čelkovice	0
Domažlice	0
Frýdek-Místek	53
Hlinice	0
Holubov	0
Chýnov	0
Milevsko	0
Obrataň	0
Oltyně	0
Radenín	0
Sezimovo Ústí 2	0
Soběslav	0
Srubec u Českých Budějovic	0
Tučapy	0
Větrovy	0
Voltýřov	0
Všechov	0
Záříbničná lhota	0
Zbelítov	0
Zňátky	0

Tabulka 13. Odhad intenzity infekce u pozitivních vzorků

Vzorek	Mikroskopicky	PCR	OPG
1	+	+	190000
2	+	+	170000
3	+	+	230000
4	+	+	140000
5	+	+	140000
6	-	+	nedetekováno*
7	-	+	nedetekováno*
8	-	+	nedetekováno*

*Počet oocyst na gram trusu byl $<10^3$

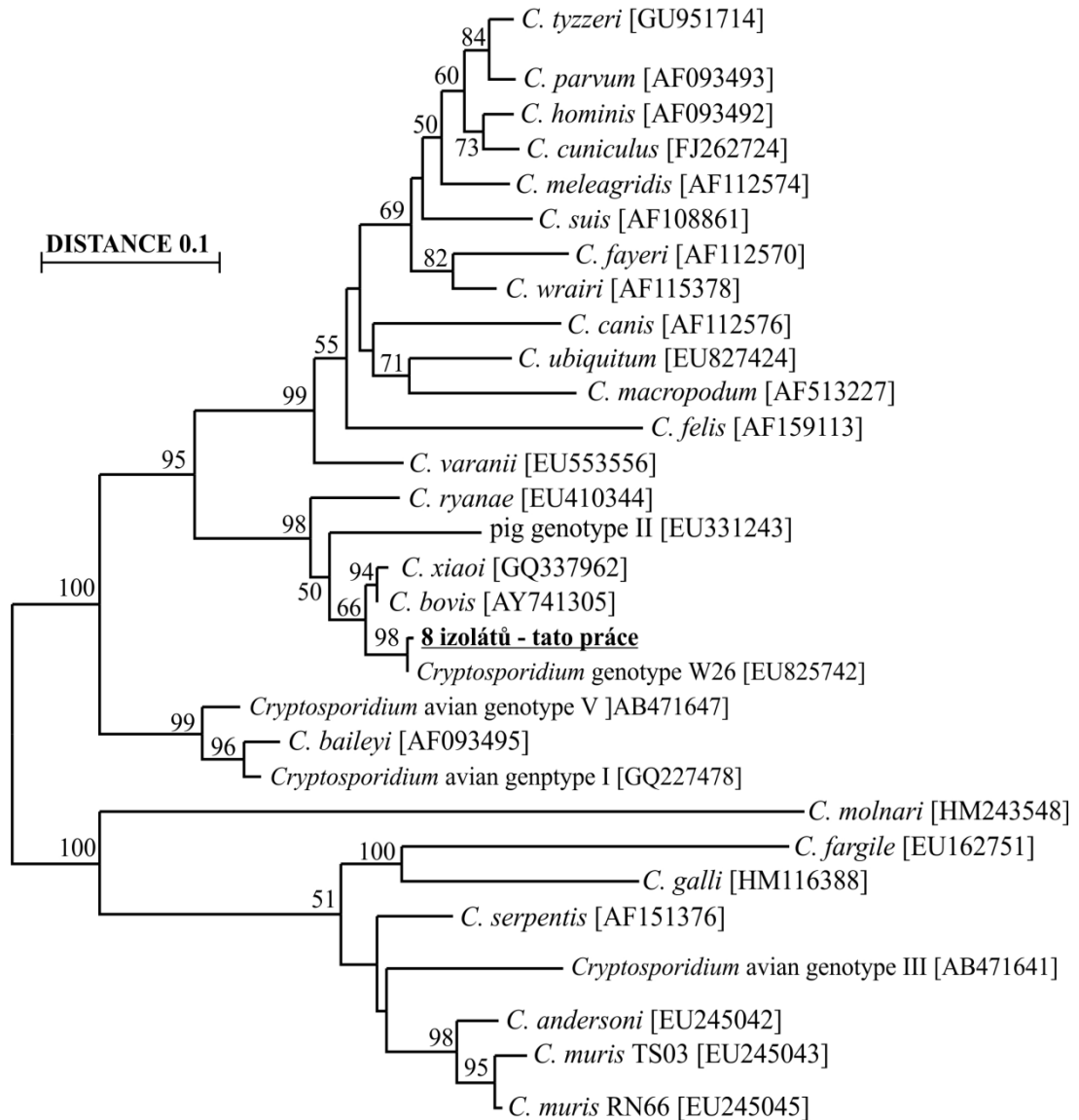
Obrázek 8. Snímek oocysty z mého izolátu při 1000× zvětšení, měřítko 5 μm



6.2 Molekulární charakteristika

U všech pozitivních vzorků byl identifikován zatím nepopsaný genotyp *Cryptosporidium*. Fylogenetická analýza ukázala blízkou příbuznost tohoto genotypu ke střevním kryptosporidiím běžně se vyskytujícím u domácích přežvýkavců (*C. bovis* a *C. xiaoi*). Nejblíže příbuznou kryptosporidií je *Cryptosporidium* W26 genotyp (*C. bovis*-like) (EU852742) původně popsáný jako enviromentální vzorek, u něhož není znám hostitel (Obrázek 9.).

Obrázek 9. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií detekovaných v této studii (potrženo) s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU) vytvořený metodou neighbor-joining v programu Treecon; 1000× bootstrap; znázorněny hodnoty podpory větví více než 50 %.



7. DISKUZE

Prevalence *Cryptosporidium* spp. u ptáků divokých nebo držených v zajetí se pohybuje v různých zemích v rozmezí od 1,4 % do 7,2 % (Ng et al., 2006; Ziegler et al., 2007; Gul et Cicek, 2009; Majewska et al., 2009; Nakamura et al., 2009). V mnoha zemích byly provedeny výzkumy na přítomnost *Cryptosporidium* u brojlerových kuřat, nejvyšší prevalence byla u druhu *C. baileyi*, dále *C. meleagridis* a nejmenší prevalence byla u *C. galli* (Slavin, 1955; Current et al., 1986; Morgan et al., 2001; Ryan et al., 2003; Jellison et al., 2004; Zhou et al., 2004; Amer et al., 2010).

V USA byla zjištěna prevalence 23,7 % (118/498) u brojlerových kuřat chovaných ve volném výběhu a 29,4 % (35/119) u brojlerových kuřat v klecích (Gorham et al., 1987; Ley et al., 1988; Snyder et al., 1988; Goodwin et al., 1996). Studie ve Skotsku a v Řecku prokázaly kryptosporidiovou infekci brojlerových kuřat v 18,7 % (26/139) a 24,3 % (17/70) (Randall, 1982; Papadopoulou et al., 1988). V Africe byla zjištěna 24% prevalence (54/225), v Maroku a Tunisu 4,5 % (9/200) (Kichou et al., 1996; Soltane et al., 2007). V Japonsku bylo 33,3 % kuřat pozitivních na kryptosporidie (4/12) a v Íránu 23,8 % (57/152) (Itakura et al., 1984; Shemshadi et al., 2011). V mé práci byla zjištěna prevalence 2,96 % (270/8) z 20 malochovů slepic především na produkci vajec, nebo kombinovanou produkci. Domnívám se, že takto o dost nižší prevalence je způsobena věkovým rozdílem. Touto tematikou se zabývali ve své práci Sreter a kolektiv (1995). Jejich výzkum jasně prokázal, že jedinci staří 1 týden vylučovali třikrát více oocyst *Cryptosporidium* než jedinci starší 9 týdnů a patentní perioda u mladších jedinců byla téměř dvakrát delší (Sreter et al., 1995). Mou domněnku potvrzuje výzkum z USA provedený na nosnicích, kde byla prevalence 5,9 % (1/17) (Itakura et al., 1984; Ley et al., 1988). V nejvíce vypovídající studii (Wang et al., 2010) byla zjištěna prevalence 10,6 % u nosnic. Prevalence *Cryptosporidium* spp. u různých věkových kategorií nosnic dosáhla maximálně 24,6 %, a to u jedinců starých 31–60 dní. Většina mnou vyšetřených vzorků (70 %) bylo odebráno v zimě, včetně pozitivního chovu. Nízká prevalence zjištěná v této studii může tudíž souviset s vlivem ročního období. Ukázalo, že mnohem vyšší prevalence je v jarním období a během léta a podzimu klesá. V zimě byly zaznamenány vůbec nejnižší prevalence a to 2 % (Wang et al., 2010).

V této práci nebyl detekován žádný z dosud známých ptačích druhů nebo genotypů kryptosporidií. Detekoval jsem zcela nový *Cryptosporidium* hen genotyp nejvíce podobný *Cryptosporidium bovis* resp. tzv. bovis-like genotypům. Mezi ty patří *Cryptosporidium* genotype W26 izolovaný z vody Great Seneca Creek v USA (EU852742) (Yang et al., 2008), *C. bovis*-like izolovaný u ovcí v USA (EF362478) (Santín et al., 2007), *C. bovis*-like izolovaný u ovcí ve Španělsku (EF514234), *C. bovis*-like izolovaný u ovcí ve Španělsku (DQ991389) (Navarro-I-Martinez et al., 2007) a *C. bovis*-like izolovaný u yaka v Číně (DQ871346) (Feng et al., 2007). Izoláty získané v této studii jsou fylogeneticky nejpříbuznější izolátu W26, od kterého se liší pouze ve třech nukleotidových bazích. Genotyp W26 byl popsán jako enviromentální vzorek u něhož není znám žádný hostitel. Lze se domnívat, že stejně jako v případě *C. canis* nebo *C. bovis* (u obou druhů byly popsány odchylky v sekvenci SSU rRNA u různých subtypů spadajících do stejného druhu), se i v případě W26 a mnou izolovaného genotypu jedná na stejný „druh“ kryptosporidie a že ptáci jsou přirozenými hostiteli. Nicméně je třeba tuto domněnku potvrdit řadou dalších experimentů.

8. ZÁVĚRY

Na základě výsledků byla zjištěna celková prevalence 3 %. Kryptosporidiové infekce byly detekovány pouze v jednom chovu. Byl detekován zcela nový genotyp *Cryptosporidium* hen genotype. Tento genotyp je fylogeneticky příbuzný dříve popsanému *Cryptosporidium* W26 – tzv. environmentálnímu bovis-like izolátu; u něho není znám přirozený hostitel. V budoucí práci je třeba se zaměřit na pozitivní chov, získat dostatečné množství infekceschopných oocyst daného izolátu, experimentálně prokázat vnímavost drůbeže k detekovanému genotypu, ověřit infektivitu pro další ptáky a laboratorní savce, detekovat vývojová stádia v zaživacím traktu infikovaných jedinců a v neposlední řadě provést podrobnější genotypizaci získaných izolátů.

9. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Abe, N. and Iseki, M. 2004.** Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitol. Res.* 92, 523–526.
- Akiyoshi, D. E., Dilo, J., Pearson, C., Chapman, S., Tumwine, J. and Tzipori, S. 2003.** Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passed through different host species. *Infect. Immun.* 71, 1828–1832.
- Alvarez-Pellitero, P., Quiroga, M. I., Sitja-Bobadilla, A., Redondo, M. J., Palenzuela, O., Padros, F., Vazquez, S. and Nieto, J. M. 2004.** *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. Aqua. Org.* 62, 133–145.
- Alvarez-Pellitero, P. and Sitja-Bobadilla, A. 2002.** *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Inter. J. Parasitol.* 32, 1007–1021.
- Amer, S., Wang, C. and He, H. 2010.** First detection of *Cryptosporidium baileyi* in Ruddy Shelduck (*Tadorna ferruginea*) in China. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 935–938.
- Bermudez, A. J., Ley, D. H., Levy, M. G., Ficken, M. D., Guy, J. S. and Gerig, T. M. 1988.** Intestinal and bursal Cryptosporidiosis in turkeys following inoculation with *Cryptosporidium* sp. isolated from commercial poults. *Avian Dis.* 32, 445–450.
- Blagburn, B. L., Lindsay, D. S., Giambrone, J. J., Sundermann, C. A. and Hoerr, F. J. 1987.** Experimental cryptosporidiosis in broiler-chickens. *Poult. Sci.* 66, 442–449.
- Blagburn, B. L., Lindsay, D.S., Hoerr, F. J., Atlas, A. L. and Toiviokinnucan, M. 1990.** *Cryptosporidium* sp infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganoplura bella* Passeriformes, Estrildidae). *Avian Dis.* 34, 1027–1030.
- Cama, V. A., Bern, C., Sulaiman, I. M., Gilman, R. H., Ticona, E., Vivar, A., Kawai, V., Vargas, D., Zhou, L. and Xiao, L. H. 2003.** *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50, 531–533.

- Chvala, S., Fragner, K., Hackl, R., Hess, M. and Weissenbock, H. 2006.** *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser f. domestica*) detected by in situ hybridization. *J. Comp. Pathol.* 134, 211–218.
- Coupe, S., Sarfati, C., Hamane, S. and Derouin, F. 2005.** Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1017–1023.
- Current, W. L., Upton, S. J. and Haynes, T. B. 1986.** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool.* 33, 289–296.
- Current, W. L. and Snyder, D. B. 1988.** Development of and serologic evaluation of acquired immunity to *Cryptosporidium baileyi* by broiler chickens. *Poult. Sci.* 67, 720–729.
- Darabus, G. and Olariu, R. 2003.** The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Pol. J. Vet. Sci.* 6, 225–228.
- Enemark, H. L., Ahrens, P., Juel, C. D., Petersen, E., Petersen, R.F., Andersen, J.S., Lind, P. and Thamsborg, S. M. 2002.** Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. *Parasitology* 125, 331–341.
- Fayer, R., Santín, M. and Macarasin, D. 2010.** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals nad humans. *Vet. Parasitol.* 172, 23–32.
- Fayer, R., Santín, M. and Trout J. M. 2008.** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156, 191–198.
- Fayer, R., Satín, M., Trout, J. M., Xiao, L., Morgan, U. M., Lal, A. A. and Dubey, J. P. 2001.** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87, 1415–1422.
- Fayer, R., Santín, M. and Xiao, L. 2005.** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91, 624–629.
- Fayer, R., Speer, C. and Dubey, J. 1997.** The general biology of *Cryptosporidium* in *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, Fayer, R., Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp., 1-41.

- Fayer, R., Trout, J. M., Xiao, L., Morgan, U., Lal, A. A. and Dubey, J. P. 2001.** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87, 1415–1422.
- Fayer, R. 2007.** General biology. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R., Xiao L. (Eds.). Publishing CRC Press, pp., 1–35.
- Fayer, R., Santín M. 2009.** *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 164, 192–200.
- Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V. and Xiao, L. 2007.** Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Parasitol.* 44, 1–9.
- Fujino, T. 1996.** Infectivity of *Cryptosporidium* sp. isolated from chickens in Japan to turkeys, bobwhite quails, bobwhite quails and several kind of experimental animals (Japan). *Jap. J. Parasitol.* 45, 295–298.
- Gajadhar, A. A. 1994.** Host specificity studies and oocyst description of a *Cryptosporidium* sp isolated from ostriches. *Parasitol. Res.* 80, 316–319.
- Gatei, W., Suputtamongkol, Y., Waywa, D., Ashford, R. W., Bailey, J. W., Greensill, J., Beeching, N. J. and Hart, C. A. 2002.** Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96, 797–802.
- Gatei, W., Greensill, J., Ashford, R. W., Cuevas, L. E., Parry, C. M., Cunliffe, N. A., Beeching, N. J. and Hart, C. A. 2003.** Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1458–1462.
- Gatei, W., Das, P., Dutta, P., Sen, A., Cama, V., Lal, A. A. and Xiao, L. 2006a.** Multilocus sequence typik and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infect. Genet. Evol.* 7, 197–205.
- Gatei, W., Wamae, C. N., Mbae, C., Waruru, A., Mulinge, E., Waithera, T., Gatika, S. M., Kamwati, S. K., Revathi, G. and Hart, C. A. 2006b.** Cryptosporidiosis: Prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 78–82.
- Gharagozlou, M. J., Dezfoulian, O., Rahbari, S., Bokaie, S., Jahanzad, I. and Razavi, A. N. 2006.** Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 53, 282–285.

- Gomez-Couso, H., Freire-Santos, F., Hernandez-Cordova, G. A., and Ares-Mazas, M. E. 2005.** A histological study of the transit of *Cryptosporidium parvum* oocysts through clams (*Tapes decussatus*). *Int. J. Food Microbiol.* 102, 57–62.
- Goodwin, M. A., Brown, J., Resurreccion, R. S. and Smith, J. A. 1996.** Respiratory coccidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) among Northern Georgia broilers in one company. *Avian Dis.* 40, 572–575.
- Goodwin, M. A. and Krabill, V. A. 1989.** Diarrhea associated with small intestinal cryptosporidiosis in a budgerigar and in a cockatiel. *Avian Dis.* 33, 829–833.
- Gorham, S. L., Mallinson, E. T., Synder, D. B. and Odor, E. M. 1987.** Cryptosporidia in the bursa of Fabricius a correlation with mortality rates in broiler chickens. *Avian Pathol.* 16, 205–211.
- Gul, A. and Cicek, M. 2009.** Investigation of the prevalence of gastrointestinal parasites in aviary birds in homes in the Van province. *Tur. Par. Der.* 33, 215–217.
- Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelievre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., Cailliez, J. C., Camus, D. and Dei-Cas, E. 2001.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humus in France. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3472–3480.
- Hoover, D. M., Hoerr, F. J., Carlton, W. W., Hinsman, E. J. and Ferguson, H. W. 1981.** Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus* Block and Schneider. *J. Fish Dis.* 4, 425–428.
- Huang, K., Akiyoshi, D. E., Feng, X. C. and Tzipori, S. 2003.** Development of patent infection in immunosuppressed C57BL/6 mice with a single *Cryptosporidium meleagridis* oocyst. *J. Parasitol.* 89, 620–622.
- Iseki, M. 1979.** *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn. J. Parasitol.* 35, 285–307.
- Itakura, C., Goryo, M., and Umemura, T. 1984.** Cryptosporidial infection in chickens. *Avian Pathol.* 13, 487–499.
- Jellison, K. L., Distel, D. L., Hemond, H. F. and Schauer, D. B. 2004.** Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): Evidence for five novel genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 452–458.

- Jiang J., Alderisio K. A., Singh A., Xiao L. 2005.** Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1135-1141.
- Jirků, M., Valigurová, A., Koudela, B., Krížek, J., Modrý, D., Šlapeta, J. 2008.** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol. (Praha)* 55, 81–94.
- Kichou, F., Saghir, F. and El Hamidi, M. 1996.** Infection naturelle a *Cryptosporidium* sp. chez le poulet de chair au Maroc. *Avian Pathol.* 25, 103–111.
- Kimura, A., Suzuki, Y. and Matsui, T. 2004.** Identification of the *Cryptosporidium* isolate from chickens in Japan by sequence analyses. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 879–881.
- Kimura, M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Latimer, K. S., Steffens, W. L., Rakich, P.M., Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Kircher, I.M. and Lukert, P.D., 1993.** Cryptosporidiosis in four cockatoos with psittacine beak and feather disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200, 707–710.
- Leoni, F., Gallimore, C. I., Green, J. and McLauchlin, J. 2003.** Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals by using a heteroduplex mobility assay and nucleic acid sequencing based on a small double-stranded RNA element. *J. Clin. Microbiol.* 41, 981–992.
- Leoni, F., Amar, C., Nichols, G., Pedraza-Diaz, S. and McLauchlin, J. 2006.** Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.* 55, 703–707.
- Ley, D. H., Levy, M. G., Hunter, L., Corbett, W. and Barnes, H. J. 1988.** Cryptosporidia positive rates of avian necropsy accessions determined by examination of auramine o-stained fecal smears. *Avian Dis.* 32, 108–113.
- Levine, N. D. 1980.** Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66, 830–834.
- Lindsay, D. S., Blagburn, B. L., Sundermann, C. A., Hoerr, F. J. and Ernest, J. A. 1986.** Experimental *Cryptosporidium* infections in chickens: Oocyst structure and tissue specificity. *Am. J. Vet. Res.* 47, 876–879.

- Lindsay, D. S., Blagburn, B. L., Hoerr, F. J. and Giambone, J. J. 1987.** Experimental *Cryptosporidium baileyi* infections in chickens and turkeys produced by ocular inoculation of oocysts. *Avian Dis.* 31, 355–357.
- Lindsay, D. S., Blagburn, B. L., Sundermann, C. A. and Hoerr, F. J. 1989.** Experimental infections in domestic ducks with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. *Avian Dis.* 33, 69–73.
- Lindsay, D. S. and Blagburn, B. L., 1990.** Cryptosporidiosis in Birds In: Cryptosporidiosis in Man and Animals, Dubey, J. P., Speer, C. A. and Fayer, R., (Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL, p., 133–148.
- Lindsay, D. S., Upton, S. J., Owens, D. S., Morgan, U. M., Mead, J. R. and Blagburn, B. L., 2000.** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 91–95.
- Lindsay, D. S., Blagburn, B. L., Hoerr, F. J. and Smith, P. C. 1991.** Cryptosporidiosis in zoo and pet birds. *J. Protozool.* 38, 180–181.
- Navarro-I-Martinez, L., J. da Silva, A., J. Bornay-Llinares, F., S. Moura, L., del Aguila, C., Oleaga, A. and J. Pieniazek, N. 2007.** Detection and Molecular Characterization of *Cryptosporidium bovis*-like Isolate from a Newborn Lamb in Spain. *J. Parasitol.* 93, 1536–1538.
- Matos, O., Alves, M., Xiao, L. H., Cama, V. and Antunes, F. 2004.** *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2256–2257.
- Majewska, A. C., Graczyk, T. K., Słodkiewicz-Kowalska, A., Tamang, L., Jedrzejewski, S., Zduniak, P., Solarczyk, P., Nowosad, A. and Nowosad, P. 2009.** The role of freeranging, captive, and domestic birds of Western Poland in environmental contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. *Parasitol. Res.* 104, 1093–1099.
- McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Diaz, S. and Nichols, G. L. 2000.** Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3984–3990.
- Meireles, M. V., Soares, R. M., dos Santos, M. M. A. B. and Gennari, S. M. 2006.** Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). *J. Parasitol.* 92, 623–626.

- Miláček, P. and Vítovec, J. 1985.** Differential staining of Cryptosporidia by aniline-carbolmethyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32, 50.
- Morgan, U., Weber, R., Xiao, L. H., Sulaiman, I., Thompson, R. C. A., Ndiritu, W., Lal, A., Moore, A. and Deplazes, P. 2000.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus–infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1180–1183.
- Morgan, U. M., Xiao, L., Limor, J., Gelis, S., Raidal, S. R., Fayer, R., Lal, A., Elliot, A. and Thompson, R. C. A. 2000.** *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). *Aust. Vet. J.* 78, 182–183.
- Morgan, U. M., Monis, P. T., Xiao, L. H., Limor, J., Sulaiman, I., Raidal, S., O’Donoghue, P., Gasser, R., Murray, A., Fayer, R., Blagburn, B. L., Lal, A. A. and Thompson, R. C. A. 2001.** Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.* 31, 289–296.
- Morgan-Ryan, U. M., Fall, A., Ward, L. A., Hijjiwai, N., Sulaima, I., Fayer, R., Thompson, R. C., Olson, M., Lal, A. and Xiao, L. 2002.** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 433–440.
- Muthusamy, D., Rao, S. S., Ramani, S., Monica, B., Banerjee, I., Abraham, O. C., Mathai, D. C., Primrose, B., Muliylil, J., Wanke, C. A., Ward, H. D. and Kang, G. 2006.** Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus infected individuals in South India. *J. Clin. Microbiol.* 44, 632–634.
- Nakamura, K. and Abe, F. 1988.** Respiratory (especially pulmonary) and urinary infections of *Cryptosporidium* in layer chickens. *Avian Pathol.* 17, 703–711.
- Nakamura, A. A., Simoes, D. C., Antunes, R. G., da Silva, D. C. and Meireles, M. V., 2009.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Vet. Parasitol.* 166, 47–51.
- Ng, J., Pavlásek, I. and Ryan, U. 2006.** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7548–7553.

- O'Donoghue, P. J., Tham, V. L., Desaram, W. G., Paull, K. L. and McDermott, S. 1987.** *Cryptosporidium* infections in birds and mammals and attempted cross-transmission studies. *Vet. Parasitol.* 26, 1–11.
- O'Donoghue, P. J. 1995.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25, 139–195.
- Paperna, I. and Vilenkin, M. 1996.** Cryptosporidiosis in the gourami *Trichogaster leeri*: description of a new species and a proposal for a new genus, *Piscicryptosporidium*, for species infecting fish. *Dis. Aquat. Org.* 27, 95–101.
- Papadopoulou, C., Xylouri, E. and Zisides, N. 1988.** Cryptosporidial infection in broiler chickens in Greece. *Avian Diseases* 32, 842–843.
- Pavlásek, I. 1993.** Black headed gull (*Larus ridibundus* L), a new host of *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae). *Vet. Med. (Praha)* 38, 629–638.
- Pavlásek, I. 1991.** Use of glycerine in oocyst detection of *Cryptosporidium parvum* and *C. baileyi* in the feces of mammals and birds. *Vet. Med. (Praha)* 36, 255–256.
- Pavlásek, I. 1999.** Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Rem. Klin. Mikrobiol.* 3, 290–301.
- Pavlásek, I. 2001.** Findings of Cryptosporidia in the stomach of chickens and of exotic and wild birds. *Veterinářství* 51, 103–108.
- Pavlásek, I., Lávička, M., Horák, P., Král, J. and Král, B. 1995:** *Cryptosporidium varanii* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague Zoo. *Gazella* 22, 99–100.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C. F. L., McLauchlin, J., Nichols, G. L., Cotton, K. M., Godwin, P., Iversen, A. M., Milne, L., Mulla, J. R., Nye, K., Panigrahl, H., Venn, S. R., Wiggins, R., Williams, M. and Young, E. R. 2001.** *Cryptosporidium meleagridis* from humans: Molecular analysis and description of affected patients. *J. Infect.* 42, 243–250.
- Power, M. and Ryan, U. 2008.** *Cryptosporidium macropodum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos *Macropus giganteus*. *J. Parasitol.* 94, 1114–1117.
- Randall, C. J. 1982.** Cryptosporidiosis of the bursa of Fabricius and trachea in broilers. *Avian Pathol.* 11, 95–102.

- Ren, X., Zhao, J., Zhang, L., Ning, C., Jian, F., Wang, R., Lv, C., Wang, Q., Arrowood, M. J. and Xiao, L., 2012.** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.* 130, 274–281.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S. J., Katzer F., Bartby P. M., Hunter P. R., Nath M., Innes E. A. and Chalmers R. M. 2001.** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* 40, 1539–1548.
- Richter, D., Wiegand-Tripp, G., Bruckhardt, E. and Kaleta, E. F. 1994.** Natural infections by *Cryptosporidium* sp. in farm-raised ducks and geese. *Avian Pathol.* 23, 277–286.
- Ryan, U., Xiao, L. H., Read, C., Zhou, L., Lal, A. A. and Pavlásek, I. 2003a.** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4302–4307.
- Ryan, U. M., Xiao, L., Read, C., Sulaiman, I. M., Monis, P., Lal, A. A., Fayer, R. and Pavlásek, I. 2003b.** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J. Parasitol.* 89, 809–813.
- Ryan, U. 2010.** *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Exp. Parasitol.* 124, 113–120.
- Ryan, U. M., Monis, P., Enemark, H. L., Sulaiman, I., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, R., Robertson, I., Zhou, L., Thompson R. C. A. and Xiao, L. 2004.** *Cryptosporidium suis* n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* 90, 769–773.
- Ryan, U. M., Power, M. and Xiao, L. 2008.** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 22–26.
- Santín, M., Trout, J. M. and Fayer, R. 2007.** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet. Parasitol.* 146, 17–24.
- Santos, M. M., Piero, J. R. and Meireles, M. V. 2005.** *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: Clinical, morphological and molecular studies. *Braz. J. Poult. Sci.* 7, 109.

- Saitou, N. and Nei, M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Slavin, D. 1955.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 65, 262–266.
- Smith, H. V., Brown, J., Coulson, J. C., Morris, G. P. and Girdwood, R. W. A. 1993.** Occurrence of oocysts of *Cryptosporidium* sp. in *Larus* sp. gulls. *Epidemiol. Infect.* 110, 135–143.
- Snyder, D. B., Current, W. L. and Russek-Cohen, E. 1988.** Serologic incidence of *Cryptosporidium* in Delmarva broiler flocks. *Poult. Sci.* 67, 730–735.
- Soltane, R., Guyot, K., Dei-Cas, E. and Ayadi, A. 2007.** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporiidae) in seven species of farm animals in Tunisia. *Parasite* 14, 335–338.
- Sreter, T., Kovacs, G., Da Silva, A. J., Pieniasek, N. J., Szell, Z., Dobos-Kovacs, M., Marialigeti, K. and Varga, I. 2000.** Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 735–738.
- Shemshadi, B., Bahadori, S. R. and Mozafari, A. 2011.** Study on cryptosporidiosis incidence in broilers in Garmsar region, Iran. *Comparative clinical pathology.* London : *Springer-Verlag.* 20, 143–149.
- Sreter, T. and Varga, I. 2000.** Cryptosporidiosis in birds-A review. *Vet. Parasitol.* 87, 261–279.
- Šlapeta, J. 2012.** The name *Cryptosporidium tyzzeri* Ren, Zhao, Zhang, Ning, Jian, Wang, Lv, Wang, Arrowood and Xiao, 2012 is permanently invalid. *Exp. Parasitol.* 130, 306–307.
- Tacconi, G., Pedini, V., Gargiulo, A. M., Coletti, M. and Piergili-Fioretta, D. 2001.** Retrospective ultramicroscopic investigation on naturally cryptosporidial infected commercial turkey poults. *Avian Dis.* 45, 688–695.
- Tiangtip, R. and Jongwutiwes, S. 2002.** Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIVinfected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health* 7, 357–364.
- Traversa, M. 2010.** Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Parasit. Vectors* 3, 21.

- Tsai, S. S., Hiarai, K. and Itakura, C. 1992.** Histopathological survey of protozoa, helminths and ascarids of imported and local psittacine and passerine birds in Japan. *Jap. J. Vet. Res.* 40, 161–174.
- Tumova, E., Skrivan, M., Marounek, M., Pavlásek, I. and Ledvinka, Z. 2002.** Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Avian Dis.* 46, 203–207.
- Tyzzler, E. E. 1907.** A sporozoa found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Doc. Exp. Biol. Med.* 5, 12–13.
- Tyzzler, E. E. 1910.** An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23, 487–509.
- Tyzzler, E. E. 1912.** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26, 394–412.
- Tyzzler, E. E. 1929.** Coccidiosis in gallinaceous birds. *Am. J. Hygiene* 10, 269.
- Varga, I., Sreter, T. and Bekesi, L. 1995.** Potentiation of ionophorous anticoccidials with Duokvin Battery trials against *Cryptosporidium baileyi* in chickens. *J. Parasitol.* 81, 777–780.
- Vetterling, J. M., H. R. Jervis, T. G. Merrill, and H. Sprinz. 1971.** *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *J. Protozool.* 18, 243–247.
- Wang, R., Jian, F., Sun, Y., Hu, Q., Zhu, J., Wang, F., Ning, C., Zhang, L. and Xiao, L. 2010.** Large-scale survey of *Cryptosporidium* spp. in chickens and Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) in Henan, China: prevalence and molecular characterization. *Avian Pathol.* 39, 447–451.
- Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R. H. and Lal, A. A. 2001.** Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.* 183, 492–497.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. and Upton, S. J. 2004.** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 72–97.
- Xiao, L., and Ryan, U. M. 2008.** Molecular epidemiology, p.. In R. Fayer and L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, 2nd ed. CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, FL., 387–410.

- Yagita, K., Izumiyama, S., Tachibana, H., Masuda, G., Iseki, M., Furuya, K., Kameoka, Y., Kuroki, T., Itagaki, T. and Endo, T. 2001.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol. Res.* 87, 950–955.
- Yang, W., Chen, P., N. Villegas, E., B. Landy, R., Kanetsky, C., Cama, V., Dearen, T., L. Schultz, C., G. Orndorff, K., J. Prelewicz, G., H. Brown, M., Roy Young, K. and Xiao, L. 2008.** *Cryptosporidium* Source Tracking in the Potomac River Watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6495–6504.
- Zhou, L., Kassa, H., Tischler, M. L. and Xiao, L. 2004.** Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4211–4215.
- Ziegler, P. E., Wade, S. E., Schaaf, S. L., Stern, D. A., Nadareski, C. A. and Mohammed, H. O. 2007.** Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Vet. Parasitol.* 147, 176–184.
- Zylan, K., Bailey, T., Smith, H. V., Silvanose, C., Kinne, J., Schuster, R. K. and Hyland, K., 2008.** An outbreak of cryptosporidiosis in a collection of Stone curlews (*Burhinus edicnemus*) in Dubai. *Avian Pathol.* 37, 521–526.