

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

2009



Magisterská práce

Mikrosporidiové infekce exotických ptáků

Vypracovala: Bc. Denisa Kašíčková

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Kašíčková, D., 2009: Mikrosporidiové infekce exotických ptáků. [Microsporidial infections of exotic birds. Mgr. Thesis, in Czech.]. - 47 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The prevalence of microsporidial infection among different species of exotic birds was screened using molecular methods. Moreover, the course of microsporidial spores excretion by naturally infected budgerigars was monitored during 30 days long period and subsequently, the site of the infection in tissues of these budgerigars was attempted to be located using histology, electron microscopy and molecular methods.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 5.1.2009

Denisa Kašíčková

.....

Obsah:

1. Úvod.....	1
1.1. Mikrosporidie.....	1
1.2. Mikrosporidie u ptáků.....	3
1.2.1. Hostitelské spektrum.....	3
1.2.2. Prevalence.....	4
1.2.3. Dynamika a lokalizace infekce.....	6
1.2.4. Genetická variabilita.....	7
2. Cíle práce.....	10
3. Materiál a metody.....	11
3.1. Materiál.....	11
3.2. Metody.....	16
3.2.1. Barvení spór pomocí Calcofluoru White M2R (Vávra and Chalupský 1982) ..	16
3.2.2. Extrakce DNA ze vzorků trusu.....	16
3.2.3. Výběr primerů pro PCR.....	16
3.2.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	18
3.2.5. Gelová elektroforéza.....	19
3.2.6. Příprava vzorků pro sekvenaci a sekvenace.....	19
3.2.7. Restriction fragment length polymorphism (RFLP).....	20
3.2.8. Sledování vylučování spór mikrosporidií.....	20
3.2.9. Extrakce DNA z tkání.....	21
3.2.10. Histologické zpracování.....	21
3.2.11. Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM).....	23
4. Výsledky.....	24
4.1. Optimalizace metody předběžným pokusem.....	24
4.2. Vyšetření exotických ptáků na výskyt mikrosporidií.....	24
4.2.1. Zachycené druhy mikrosporidií a jejich prevalence.....	24
4.2.2. Vyhodnocení sekvencí a genotypizace zachycených mikrosporidií.....	29
4.3. Sledování vylučování spór mikrosporidií.....	30
4.3.1. Dynamika vylučování spór mikrosporidií v trusu andulek vlnkovaných.....	30
4.3.3. Vyhodnocení sekvencí.....	30
4.3.2. PCR z tkání andulek vlnkovaných.....	31
4.3.4. Histologické zpracování a TEM.....	31
5. Diskuse.....	32
6. Závěry.....	39
7. Literatura.....	41

1. Úvod

1.1. Mikrosporidie

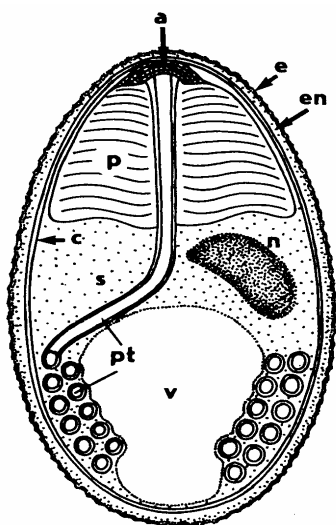
Mikrosporidie jsou eukaryotní obligátní vnitrobuněční paraziti vyskytující se nejčastěji u hmyzu a korýšů, ale lze je nalézt u všech živočišných kmenů. Dosud bylo popsáno přes 1200 druhů mikrosporidií v přibližně 150 rodech (Keeling and Fast 2002). Jsou příbuzné houbám (Fungi), což je všeobecně přijímáno na základě fylogenetických, cytologických a biochemických studií, avšak přesný charakter tohoto fylogenetického vztahu je stále nejasný (Peer et al. 2000, Keeling 2003, Thomarat et al. 2004, Fischer and Palmer 2005, Gill and Fast 2006). Nedávná analýza postavená na porovnávání struktury genomů mikrosporidií a různých linií hub odhalila konzervované lokusy mezi mikrosporidii a zygomycetami. To podporuje hypotézu, že mikrosporidie jsou právě houby, které se vyvinuly z předka zygomycet (Lee et al. 2008).

Stejně jako v minulosti, tak i v současné době mají mikrosporidie značný ekonomický dopad na tropické sladkovodní rybníkářství, komerční chov ryb, hedvábnictví i včelařství (Wittner 1999). Velký nárůst počtu mikrosporidiových infekcí u lidí byl zaznamenán v devadesátých letech minulého století ve spojení se šířením pandemie syndromu získané imunitní nedostatečnosti (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS). Od té doby bylo popsáno několik nových rodů a druhů mikrosporidií schopných infikovat člověka a mikrosporidie se staly medicínsky významnými parazity u imunosuprimovaných jedinců.

Adaptace mikrosporidií k parazitismu vyústily v množství redukcí, ať už na úrovni genomové, biochemické nebo buněčné. Mikrosporidie byly dříve označovány jako amitochondriální organismy, ale byl u nich nalezen gen pro HSP70 (heat shock protein), což naznačuje, že se mikrosporidie vyvinuly z předka majícího mitochondrie (Peyretailade et al. 1998). Navíc byly v *Trachipleistophora hominis* popsány oválné organely s dvojitou membránou o přibližné velikosti 50×90 nm, které jsou považovány za reliktní mitochondrie (Williams et al. 2002). Mitochondrie mikrosporidií jsou silně redukovány, chybí jim ATP syntéza a další typické funkce, a zřejmě obsahují pouze zlomek proteinů normativní mitochondrie (Waller et al. 2008). Mikrosporidiím chybějí hydrogenosomy, peroxisomy a klasický Golgiho aparát, zato však mají typické eukaryotní jádro, vnitrobuněčný membránový systém a cytoskelet. Mitoticky a meioticky se dělí pomocí mitotického vřeténka a neobsahují centrioly (Vávra and Larsson 1999).

Mikrosporidie mají extrémně malý genom, v rámci druhů se pohybuje od 2,3 Mbp do 19,5 Mbp, s krátkými spacery a omezeným výskytem repetitivních úseků DNA (Keeling and Fast 2002). Přestože mikrosporidie patří mezi eukaryota, mají ribozomy prokaryotního typu (70S), sestávající z velké podjednotky 23S a malé podjednotky 16S. Typicky eukaryotní 5,8S ribozomální RNA (rRNA) je spojená se zbytkem velké podjednotky rRNA, což bylo dosud pozorováno jen u mikrosporidií (Peer et al. 2000).

Infekčním stádiem mikrosporidií je spóra (obr. 1), která je značně rezistentní vůči vnějšímu prostředí. V rámci celého kmene se velikost spóry pohybuje v rozmezí 1 až 40 μm . Zralá spóra obsahuje vystřelovací aparát, který je pro mikrosporidie typický a skládá se z posteriorní vakuoly, výrazně pozměněného Golgiho aparátu zvaného polaroplast a pólové trubice, která je v anteriorní části spóry upevněná tzv. kotevním diskem. Pólová trubice je dlouhá, dutá a stočená do 4 až 30 závitů kolem sporoplazmy spóry v závislosti na druhu mikrosporidie (Vávra and Larsson 1999). Sporoplazma může mít v rámci rodu jedno jádro, nebo dvě přiléhající jádra nazývané se diplokaryon (Vávra 1976).



Obr. 1: Schéma spóry mikrosporidií rodu *Nosema* (podle Ergens and Lom 1970)

- a - kotevní disk
- c - cytoplazmatická membrána
- e - exospóra
- en - endospóra
- n - jádro
- p - polaroplast
- pt - pólová trubice
- s - sporoplazma
- v - posteriorní vakuola

Jestliže se spóra dostane do vhodného hostitele, injikuje sporoplazmu ze spóry do hostitelské buňky. V novém hostiteli sporoplazma dozrává v meronta, který se dále dělí na dceřinné meronty. Další fáze množení, sporogonie, zahrnuje dělení sporontů a jejich dceřinných buněk dokud nevytvoří konečný produkt: sporoblast. Sporoblast dozrává a mění se na spóru (Vávra and Larsson 1999).

Mezi mikrosporidie způsobující onemocnění člověka patří druhy z rodu *Brachiola*, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*

a *Vittaforma*. Nejčastěji diagnostikovaný druh je *Enterocytozoon bieneusi* následovaný *Encephalitozoon intestinalis*, *E. hellem* a *E. cuniculi*. Onemocnění se projevuje především u imunodeficientních pacientů, např. pacientů s AIDS, proto jsou také tyto mikrosporidie řazeny mezi oportunní parazity. U imunokompetentních osob probíhají infekce většinou inaparentně. Přestože u většiny zaznamenaných případů lidských mikrosporidióz je uváděn jako hlavní klinický příznak průjem, tedy střevní mikrosporidióza, spektrum onemocnění způsobené těmito organismy se rozrůstá a zahrnuje infekce skoro všech orgánových systémů. Může se vyskytnout keratokonjunktivitida, hepatitida, myositida, encefalitida, sinusitida, nefritida, pneumonie a diseminované infekce (Weiss 2003).

Díky rozvíjejícím se diagnostickým metodám byly mikrosporidiové infekce rozpoznány u širokého spektra lidské populace zahrnujícího pacienty s AIDS, pacienty po transplantaci orgánů, cestovatele, děti, nositele kontaktních čoček a starší lidi (Didier 2005).

1.2. Mikrosporidie u ptáků

1.2.1. Hostitelské spektrum

S přibývajícím znalostmi se ukazuje, že mikrosporidie jsou poměrně časté jak u ptáků volně žijících, tak i v zajetí chovaných a spektrum ptačích hostitelů se stále rozrůstá. U volně žijících ptáků byly doposud detekovány 4 druhy mikrosporidií. *Encephalitozoon hellem* byl nalezen u holubů domácích (*Columba livia*) (Haro et al. 2005, Bart et al. 2008), u kachen divokých (*Anas platyrhynchos*), labutí velkých (*Cygnus olor*), hus velkých (*Anser anser*), labutí červenokrkých (*Cygnus melanocoryphus*), vrány obecné (*Corvus corone*), holuba nikobarského (*Caloenas nicobarica*), labuť černé (*Cygnus atratus*), labuť koskoroby (*Coscoroba coscoroba*) a jeřába pavího (*Balearica pavonina*) (Slodkovicz-Kowalska et al. 2006), u papuchalků černobradých (*Fratercula corniculata*) (Tocidlowski et al. 1997) a u kalypty růžovohlavé (*Calypte anna*), kolibříka černobradého (*Archilochus alexandri*) a kolibříka kalifornského (*Selasphorus sasin*) (Snowden et al. 2001). *Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis* a *Enterocytozoon bieneusi* byl zaznamenán u holubů domácích (Haro et al. 2005, Haro et al. 2006, Lobo et al. 2006, Graczyk et al. 2007, Bart et al. 2008) a *E. intestinalis* navíc u husy domácí (*Anser anser f. domestica*) (Slodkovicz-Kowalska et al. 2006).

V podstatně širším hostitelském spektru byly mikrosporidie identifikovány u v zajetí chovaných ptáků. Převážnou většinu tvoří ptáci z řádu Psittaciformes. Nejčastěji

detekovanou mikrosporidií u exotických ptáků je druh *E. hellem*. Ten byl diagnostikován u andulek vlnkovaných (*Melopsittacus undulatus*) (Black et al. 1997, Slodkowicz-Kowalska et al. 2006), u dvou uhynulých papoušků různobarvých (*Eclectus roratus*) (Pulparampil et al. 1998), u loriho rudočelého (*Chalcopsitta scintillata*) (Suter et al. 1998), u klinicky zdravých agapornisů růžohrdlých (*Agapornis roseicollis*), agapornisů škraboškových (*A. personata*) a agapornisů Fischerových (*A. fischeri*) (Snowden et al. 2000, Barton et al. 2003), u 2 roky starého kakadu bílého (*Cacatua alba*) trpícího keratokonjunktivitidou (Phalen et al. 2006), u mladého pštrosa (*Struthio camelus*), což byl první případ infekce *E. hellem* u řádu, který nepatří mezi papoušky (Gray et al. 1998, Snowden and Logan 1999) a u mláďat amadiny Gouldové (*Erythrura gouldiae*) z řádu Passeriformes (Carlisle et al. 2002).

Mikrosporidie *E. cuniculi* byla u exotických ptáků detekována pouze v jediném případě. Jednalo se o ve venkovním prostředí odchycenou korelu chocholatou (*Nymphicus hollandicus*), která pravděpodobně ulétla svému chovateli (Kašíčková et al. 2007). Další ptačí hostitel, u kterého byl zaznamenán *E. cuniculi* je kur domácí (*Gallus gallus*). Infikovaná byla čtyřměsíční kuřata nosného plemene, domácí kohout a devět slepic (Reetz 1993). V rámci jiné studie bylo vyšetřováno 100 kuřecích embryí, přičemž 40 % z nich bylo pozitivních (Reetz 1999).

Enterocytozoon bieneusi byl doposud z exotických ptáků zaznamenán u papouška šedého (*Psittacus erithacus*), korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*), agapornise Fischerova (*A. fischeri*) a astrilda rákosního (*Neochmia ruficauda*) (Lobo et al. 2006). Dále byl ještě detekován u pět týdnů starých brojlerů (*Gallus gallus*) z drůbežích jatek (Reetz et al. 2002) a nedávno i u několika druhů sokolů ze soukromého chovu (Müller et al. 2008).

Přestože *E. intestinalis* byl zachycen u volně žijících ptáků (Haro et al. 2005, Slodkowicz-Kowalska et al. 2006, Bart et al. 2008), není znám žádný případ infekce u exotických či v zajetí chovaných ptáků.

1.2.2. Prevalence

Nejvíce dat o výskytu mikrosporidií bylo získáno z výsledků vyšetřování městských holubů domácích. První taková studie byla provedena ve Španělsku. Bylo analyzováno celkem 124 vzorků trusu, z nichž 36 (29 %) ukázalo barvicími metodami struktury podobné mikrosporidiím. Z 26 vzorků trusu pozitivních holubů (20,9 %) byla vyizolována DNA a amplifikována pomocí specifických primerů pro čtyři nejčastější lidské

mikrosporidie. Dvanáct holubů bylo pozitivních pouze na *E. bieneusi* (9,7 %), pět na *E. intestinalis* (4 %) a jeden na *E. hellem* (0,8 %). Smíšená infekce byla detekována u dalších osmi holubů: *E. bieneusi* a *E. hellem* byly identifikovány u 6 zvířat (4,8 %), *E. bieneusi* s *E. intestinalis* a *E. hellem* s *E. intestinalis* vždy v 1 případě (0,8 %). *Enterocytozoon bieneusi*, který je nejčastější lidskou mikrosporidií, byl také nejčastější u městských holubů (12 %) (Haro et al. 2005). V další studii provedené v Portugalsku bylo pomocí molekulárních metod testováno 44 holubů na *E. bieneusi*, z nichž 19 (43,2 %) bylo pozitivních (Lobo et al. 2006). V Holandsku bylo z celkového počtu 331 vzorků trusu holubů molekulárními metodami zachyceno 36 (11 %) pozitivních vzorků. *Enterocytozoon bieneusi* byl identifikován v 18 případech (5,4 %), *E. hellem* v 11 (3,3 %), *E. cuniculi* v 6 (1,8 %) a *E. intestinalis* v 1 případě (0,3 %) (Bart et al. 2008).

V Polsku bylo vyšetřeno 570 ptáků (ptáci volně žijící, chovaní v zajetí a hospodářsky chovaní) na přítomnost spór mikrosporidií. Celkem bylo 21 (3,7 %) ptáků pozitivních na mikrosporidie, v jednom případě (0,2 %) u husy domácí (*Anser anser f. domestica*) *E. intestinalis*, u zbývajících dvaceti ptáků - 5 kachen divokých (*Anas platyrhynchos*), 4 labutě velké (*Cygnus olor*), 3 husy velké (*Anser anser*), 2 labutě červenokrké (*Cygnus melanocoryphus*), po jednom zvířeti vrána obecná (*Corvus corone*), andulka vlnkovaná (*Melopsittacus undulatus*), holub nikobarský (*Caloenas nicobarica*), labuť černá (*Cygnus atratus*), labuť koskoroba (*Coscoroba coscoroba*) a jeřáb paví (*Balearica pavonina*) byl identifikován druh *E. hellem* (3,5 %). Nejčastěji byli infikováni vodní ptáci (8,6 %), což by mohlo podporovat hypotézu o možnosti přenosu spór mikrosporidií vodou (Slodkowiec-Kowalska et al. 2006).

V USA byly provedeny dvě studie zaměřené na prevalenci mikrosporidií u ptáků. V první byly spóry mikrosporidií zaznamenány mikroskopicky u 19 % (19 ze 100) vzorků trusu volně žijících, migrujících kolibříků druhu kalipta růžovohlavá (*Calypte anna*), kolibřík černobradý (*Archilochus alexandri*) a kolibřík kalifornský (*Selasphorus sasin*). Vzorky byly odebírány v záchraném a rehabilitačním zařízení pro kolibříky a přítomnost spór ve výkalech nově přivezených zvířat naznačuje, že infekce byla do zařízení zavlečena kolibříky z volné přírody (Snowden et al. 2001). Druh mikrosporidie zde byl molekulárně určen jako *E. hellem* na základě sekvence získané z jediného ptáka, stejně jako v druhém případě, kdy bylo mikroskopicky vyšetřeno celkem 198 klinicky zdravých papoušků z osmi hejn zahrnujících 113 jedinců *A. roseicollis*, 32 *A. personata* a 53 *A. fischeri*. Mikrosporidie byly identifikovány ve 25 % vzorků, z toho u 12 % ptáků bylo nalezeno velké množství spór. V každé hejnu byl nalezen nejméně jeden pozitivní jedinec. V rámci

druhů byl nejvíce promořený *A. personata* (41 %), méně *A. roseicollis* (29 %) a nejméně *A. fischeri* (6 %). Navíc 21 % ptáků pozitivních zároveň na cirkovirózu exotických ptáků (PBFDV; psittacine beak and feather disease virus) roznášelo spóry zhruba třikrát pravděpodobněji než ptáci PBFDV negativní (Barton et al. 2003).

V rámci studie provedené v Portugalsku byly pomocí molekulárních metod kromě holubů domácích testovány ještě různé druhy exotického ptactva z řádů Passeriformes a Psittaciformes. Z celkového počtu 39 vyšetřených vzorků bylo 5 pozitivních (12,8 %) na *E. bieneusi* (Lobo et al. 2006).

1.2.3. Dynamika a lokalizace infekce

Informace o dynamice a lokalizaci přirozených infekcí u ptáků jsou minimální. Jak naznačují výsledky mnoha studií, většina infekcí u ptáků je inaparentní (Barton et al. 2003, Haro et al. 2005, Saková et al. 2006, Slodkowitz-Kowalska et al. 2006) a k rozvoji klinických příznaků dochází až v případě oslabení imunity jedince (Black et al. 1997, Carlisle et al. 2002, Bart et al. 2008).

Infekce *E. bieneusi* byla zatím u ptáků ve tkáních detekována pouze jednou. Parazit byl imunohistochemicky prokázán v játrech, střevě a ledvinách všech 6 zkoumaných jedinců sokola (Bart et al. 2008). *Encephalitozoon cuniculi* byl imunohistochemickými metodami detekován v jícnu, střevě, játrech, ledvinách, srdci, mozku a fibrilách kosterního svalstva kura domácího (Reetz 1993, Reetz 1999). *Encephalitozoon hellem* je primárně nalézán v játrech, střevě a ledvinách, ale rovněž byl identifikován v oku, plicích nebo slezině (Poonacha et al. 1985, Black et al. 1997, Pulparampil et al. 1998, Snowden and Logan 1999, Snowden et al. 2001, Carlisle et al. 2002, Phalen et al. 2006).

O dynamice mikrosporidiové infekce u ptáků se mnoho neví. Podle Bart a kol. (2008) se prevalence mikrosporidií v trusu městských holubů významně liší mezi rozmnožovacím obdobím (18 %) a mimo něj (6 %). To naznačuje, že průběh mikrosporidiové infekce se mění v čase a spóry jsou vylučovány přerušovaně. Hypotézu o intermitentním vylučování spór také podporují mé výsledky (Kašičková 2007) a rovněž i příklad experimentální infekce králíků mikrosporidií *E. cuniculi*, kde bylo pozorováno pravidelné vylučování spór v moči mezi 38. a 63. dnem po infekci a později přerušované vylučování spór ve velmi nízké koncentraci (Cox et al. 1979). Obdobná je i situace u experimentálně infikovaných myší *E. intestinalis* (Achbarou et al. 1996) nebo u infekcí prasat *E. bieneusi* (Breitenmoser et al. 1999).

1.2.4. Genetická variabilita

V rámci genetické variability byla pozorována odlišná situace u různých druhů mikrosporidií. Informace o jednotlivých genotypech, jejich hostitelské specifitě a geografickém rozšíření pomáhají porozumět epidemiologické situaci.

Encephalitozoon hellem

Vnitrodruhová genotypová variabilita *E. hellem* byla zpočátku založena na sekvenci ITS rRNA genů rozdělující různé izoláty do 3 genotypů (Mathis et al. 1999), ale později byla také charakterizována ve dvou intergenických spacerech (IGS-TH a IGS-HZ) a v genu pro PTP (polar tube protein), což umožnilo popsání nových genotypů (Haro et al. 2003, Xiao et al. 2001a). Jasný důkaz vnitrodruhové variability poskytl Xiao a kol. (2001a). Analýzou nukleotidových sekvencí genu pro PTP rozdělili 24 lidských izolátů *E. hellem* do čtyř genotypů. V další studii byl mezi sedmi *E. hellem* izoláty získanými z HIV-pozitivních pacientů analýzou genu pro PTP objeven další, pátý genotyp. Na základě typu repetice se rozlišují dvě alelické rodiny. První (genotyp 1A, 1C a 1D) má pouze 60 bp dlouhé repetice, druhá (genotyp 2B a 2C) má navíc i 66 bp repetice (Haro et al. 2003). Ze sedmi izolátů *E. hellem* získaných z HIV-pozitivních pacientů byl v šesti z nich (španělského, italského a amerického původu) identifikován ITS genotyp 1A (Haro et al. 2003), stejně jako v izolátech z holubů domácích ve Španělsku (Haro et al. 2005). ITS genotyp 1 byl rovněž identifikován v izolátech z lorihlo rudočelého odchyceného z volné přírody v Indonésii (Suter et al. 1998), z agapornise různohrdlého z USA (Snowden et al. 2000) a z kolibříků (Snowden et al. 2001).

Encephalitozoon cuniculi

U druhu *E. cuniculi* byly popsány 3 genotypy založené na počtu 5'-GTTT-3' opakování v ITS rRNA. Genotyp I (z králíků) obsahuje 3 taková opakování, genotyp II (z myší) obsahuje 2 opakování a genotyp III (ze psů) obsahuje 4 opakování (Didier et al. 1995). Genetická diverzita *E. cuniculi* byla dále analyzována na genech kódujících PTP a SWP-1 (spore wall protein 1). Analýza nukleotidové sekvence genu pro PTP rozdělila 11 *E. cuniculi* izolátů do 3 genotypů v souladu s výsledky analýzy ITS rRNA genu. Podobných výsledků bylo dosaženo i analýzou SWP-1 genu. U některých genotypů a mezi různými kopiemi SWP-1 genu bylo pozorováno kolísání v délce, které pramenilo z množství 15- a 36-bp opakování a rozdělilo genotypy I a III na několik subgenotypů (Xiao et al. 2001b). Takovéto genotypové rozčlenění pomohlo vyhodnotit složitou

epidemiologickou situaci infekcí *E. cuniculi* v různých hostitelích a v různých částech světa. Doposud byly u lidí nalezeny genotypy I a III, což poukazuje na to, že lidská infekce *E. cuniculi* by mohla být zoonotického původu (Deplazes et al. 1996, Didier et al. 1996a, Rinder et al. 1998, Rossi et al. 1998, Snowden et al. 1999, Tosoni et al. 2002). Navíc jediná doposud známá sekvence získaná z ptáka (korely chocholaté) byla zařazena do genotypu III a byla identická se sekvencemi pocházejících ze psů a člověka, což rovněž podporuje možnost zoonotického potenciálu této mikrosporidie (Kašičková et al. 2007).

Encephalitozoon intestinalis

Narozdíl od jiných druhů mikrosporidií rodu *Encephalitozoon*, pro které byly identifikovány různé genotypy s rozdíly v jejich biologii a epidemiologii, se *E. intestinalis* jeví jako velmi homogenní druh a nebyly pozorovány žádné rozdíly v ITS sekvencích 16 izolátů (Didier et al. 1996b, Liguory et al. 2000). To, že u *E. intestinalis* doposud nebyla nalezena žádná genetická heterogenita vypovídá o tom, že zde nejsou žádné přenosové bariéry mezi doposud identifikovanými druhy hostitelů a je potřeba nalézt vhodné genetické markery (Haro et al. 2005).

Enterocytozoon bieneusi

Analýzy ITS rRNA genů odhalily, že zde jsou výrazné rozdíly mezi lidskými a zvířecími izoláty *E. bieneusi* a doposud bylo popsáno více než 50 genotypů založených na jemných rozdílech uvnitř 243 bp ITS sekvence. Narozdíl od situace u rodu *Encephalitozoon* zde nejsou dostupné žádné jiné genetické markery (Mathis et al. 2005). Z více než 50 dostupných genotypů byly některé izolovány pouze z lidí (jako genotypy A, B a C), některé byly nejdříve identifikovány u lidí, ale později i u jiných zvířat (genotypy Q, Peru-3, Peru-6, Peru-7, Peru-8, Peru-10, Peru-11, R, S, T, U, V, W, UG2145, typ III a typ V) a další (genotypy D, E, K, O a *PigEBITS7*) byly nejprve popsány u různých hostitelů kromě člověka (hlavně prasat), ale byly později zaznamenány i u lidí (Dengjel et al. 2001, Sulaiman et al. 2003a, Leelayoova et al. 2006). Přestože se některé z genotypů nalezených ve volně žijících savcích zdají být rozdílné, hostitelsky adaptované a pravděpodobně neschopné infikovat člověka (Sulaiman et al. 2003b), výsledky fylogenetické analýzy odhalily blízký vztah mezi mnoha dalšími genotypy s žádnými zřejmými transmisními bariérami (Dengjel et al. 2001, Sulaiman et al. 2003a, Leelayoova et al. 2006). Z ptáků bylo prozatím genotypizováno 38 vzorků. Dva vzorky z kuřat z Německa obsahovaly *E. bieneusi* genotypu J, jeden z několika hostitelsky adaptovaných

genotypů nalezených u skotu (Reetz et al. 2002). Devět dalších vzorků z holubů ze Španělska se lišilo od doposud popsáných genotypů (Haro et al. 2005, Haro et al. 2006). V jiné studii bylo genotypizováno 21 vzorků, z nichž 16 vzorků z holubů a 1 vzorek z agapornise bylo možno zařadit do genotypu Peru-6 dříve popsáného z AIDS pacienta (Sulaiman et al. 2003a), vzorky z tří holubů a jednoho papouška byly identifikovány jako *E. bieneusi* genotypy velmi podobné genotypu Peru-6 (Lobo et al. 2006). Nově byl v 6 analyzovaných vzorcích ze sokolů popsán genotyp D, který už byl dříve izolován z člověka, makaka a prasete (Müller et al. 2008).

2. Cíle práce

1. Optimalizovat detekci mikrosporidií pomocí PCR a následně vyšetřit vzorky trusu různých druhů exotických ptáků chovaných v zajetí.
2. V případě pozitivního nálezu genotypizace mikrosporidií.
3. Sledovat vylučování spór mikrosporidií u přirozeně infikovaných ptáků a následně detekovat lokalizaci mikrosporidií v jejich tkáních.
4. Na základě výsledků a literárních údajů zhodnotit význam ptáků jako zdroje oportunních infekcí mikrosporidiemi.

Tato práce navazuje na výsledky bakalářské práce, kde byly na přítomnost mikrosporidií vyšetřovány vzorky trusu volně žijících a v zajetí chovaných ptáků.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Materiálem pro vyšetření na přítomnost mikrosporidií byl trus různých druhů exotických ptáků chovaných v zajetí. Vzorky trusu pocházely od soukromých chovatelů z celé České republiky, z výstavy exotického ptactva Exota 2007, ze ZOO Monkey Town v Republice Jižní Afrika a ze čtyř českobudějovických zverimexů. Celkem bylo v období březen 2007 až září 2008 pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) vyšetřeno 336 vzorků trusu exotických ptáků z řádů Anseriformes, Ciconiiformes, Columbiformes, Cuculiformes, Galliformes, Gruiformes, Charandriiformes, Passeriformes a Psittaciformes (Tab. 1 a 2).

Navíc byl v období od 11.8.2008 do 9.9.2008 každodenně vyšetřován trus (celkem 240 vzorků) pocházející z 9 (později 7, viz níže) mikrosporidiemi přirozeně infikovaných andulek vlnkovaných (*Melopsittacus undulatus*). Byly použity dvě diagnostické metody pro zachycení spór mikrosporidií v trusu, PCR a prohlížení nátěrů trusu barvených Calcofluorem pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Pokud nebylo možné materiál vyšetřit ihned, byly vzorky trusu uchovávány v mrazničce při teplotě -20 °C.

Tab. 1: Seznam vyšetřených druhů ptáků z území České republiky.

Český název ptáka	Latinský název ptáka	Původ ptáka	Počet vz.
Papoušci	Psittaciformes		
Agapornis Fischerův	<i>Agapornis fischeri</i>	chov. č. 2 (2), 8, 22, 39, 53 (2)	7
Agapornis hnědohlavý	<i>Agapornis nigrigenis</i>	chov. č. 8	1
Agapornis růžohlavý	<i>Agapornis lilianae</i>	chov. č. 37	1
Agapornis růžohrdlý	<i>Agapornis roseicollis</i>	chov. č. 2, 14 (2), 23 (2), 24, 42	7
Agapornis šedohlavý	<i>Agapornis cana</i>	chov. č. 8	1
Agapornis škraboškový	<i>Agapornis personata</i>	chov. č. 22	1
Agapornis škraboškový	<i>Agapornis personata</i>	chov. č. 3, 8, zv. č. 2, 3	4
Alexander čínský	<i>Psittacula derbiana</i>	chov. č. 17, 34	2
Alexander malý	<i>Psittacula krameri</i>	chov. č. 2, 3, 4, 12, zv. č. 2, 3	6
Alexander rudohlavý	<i>Psittacula cyanocephala</i>	chov. č. 2, 3	2
Alexander růžový	<i>Psittacula alexandri</i>	chov. č. 26	1
Alexander šedý	<i>Psittacula columboides</i>	chov. č. 25	1
Alexander velký	<i>Psittacula eupatria</i>	chov. č. 2, 26	2
Amazoňan běločelý	<i>Amazona albifrons</i>	chov. č. 5	1
Amazoňan černouchý	<i>Amazona xantholora</i>	chov. č. 44	1
Amazoňan fialovoprký	<i>Amazona vinacea</i>	chov. č. 45	1
Amazoňan fialovotemenný	<i>Amazona finschi</i>	chov. č. 42	1
Amazoňan kubánský	<i>Amazona leucocephala</i>	chov. č. 5 (2), 45	3
Amazoňan modrobradý	<i>Amazona festiva</i>	chov. č. 23, 38	2
Amazoňan modročelý	<i>Amazona aestiva</i>	chov. č. 17, 24	2
Amazoňan oranžovokřídý	<i>Amazona amazonica</i>	chov. č. 21	1
Amazoňan pomoučený	<i>Amazona farinosa</i>	chov. č. 35	1
Amazoňan rudočelý	<i>Amazona autumnalis</i>	chov. č. 42, 45	2
Amazoňan tukumanský	<i>Amazona tucumana</i>	chov. č. 46	1
Amazoňan vějířový	<i>Deropterus accipitrinus</i>	chov. č. 23	1
Amazoňan zelenolící	<i>Amazona viridigenalis</i>	chov. č. 45	1
Amazoňan žlutohlavý	<i>Amazona ochrocephala</i>	chov. č. 42	1
Amazoňan žlutoramenný	<i>Amazona barbadensis</i>	chov. č. 47	1
Amazónek bělobřichý	<i>Pionites leucogaster</i>	chov. č. 43	1
Amazónek bronzovokřídý	<i>Pionus chalcopterus</i>	chov. č. 44	1
Amazónek černotemenný	<i>Pionites melanocephalus</i>	chov. č. 43	1
Amazónek modrohlavý	<i>Pionus menstruus</i>	chov. č. 42	1
Amazónek šupinkový	<i>Pionus maximiliani</i>	chov. č. 24	1
Amazónek tmavý	<i>Pionus fuscus</i>	chov. č. 42	1
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	chov. č. 2 (3), 3 (3), 4, 6 (4), 7, 8, 14 (2), zv. č. 1, 2 (3), 3	20
Ara ararauna	<i>Ara ararauna</i>	chov. č. 5	1
Ara šedolící	<i>Primolius couloni</i>	chov. č. 47	1
Ara vojenský	<i>Ara militaris</i>	chov. č. 48	1
Aratinga dlouhoocasý	<i>Aratinga acuticaudata</i>	chov. č. 8	1
Aratinga jendaj	<i>Aratinga jendaya</i>	chov. č. 23	1
Aratinga spp.	<i>Aratinga spp.</i>	chov. č. 23	1
Aratinga škraboškový	<i>Aratinga mitrata</i>	chov. č. 8	1
Aratinga zlatohlavý	<i>Aratinga auricapilla</i>	chov. č. 8	1
Aymara citronový	<i>Psilopsiagon aurifrons</i>	chov. č. 37	1
Aymara pruhovaný	<i>Bolborhynchus lineola</i>	chov. č. 41	3
Aymara šedoprký	<i>Psilopsiagon aymara</i>	chov. č. 37	1
Barnand límcový	<i>Barnardius zonarius</i>	chov. č. 9, 45	2

Český název ptáka	Latinský název ptáka	Původ ptáka	Počet vz.
Papoušci	Psittaciformes		
Barnard zelený	<i>Barnardius barnardi</i>	chov. č. 45	1
Eklektus různobarvý	<i>Eclectus roratus</i>	chov. č. 33	1
Kakadu bílý	<i>Cacatua alba</i>	chov. č. 33	1
Kakadu Goffinův	<i>Cacatua goffini</i>	chov. č. 23	1
Kakadu inka	<i>Cacatua leadbeateri</i>	chov. č. 33	1
Kakadu molucký	<i>Cacatua moluccensis</i>	chov. č. 33	1
Kakadu naholíci	<i>Cacatua sanguinea</i>	chov. č. 33	1
Kakadu růžový	<i>Eolophus roseicapillus</i>	chov. č. 5	3
Kakadu šalamounský	<i>Cacatua ducorpsii</i>	chov. č. 35	1
Kakadu žlutočelatý	<i>Cacatua galerita</i>	chov. č. 35	1
Kakariki rudočelý	<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>	chov. č. 3, 23, 53 (2)	4
Kakariki spp.	<i>Cyanoramphus</i> spp.	chov. č. 3	1
Korela chocholatá	<i>Nymphicus hollandicus</i>	chov. č. 1, 3 (3), 4, 6, 8, 9, zv. č. 1, 2	10
Lori tmavý	<i>Pseudeos fuscata</i>	chov. č. 16	1
Nandej černohlavý	<i>Nandayus nenday</i>	chov. č. 8	1
Neoféma Bourkova	<i>Neopsephotus bourkii</i>	chov. č. 26, 50	2
Neoféma modrohlavá	<i>Neophema splendida</i>	chov. č. 26, 27, 31	3
Neoféma ozdobná	<i>Neophema elegans</i>	chov. č. 27	1
Neoféma tyrkysová	<i>Neophema pulchella</i>	chov. č. 3, 10, 12, 14, 23, 27, 31	7
Papoušek alexandřin	<i>Polytelis alexandrae</i>	chov. č. 52	1
Papoušek ambonský	<i>Alisterus amboinensis</i>	chov. č. 25	1
Papoušek červenobřichý	<i>Poicephalus rufiventris</i>	chov. č. 2, 28	2
Papoušek karmínový	<i>Alisterus chloropterus</i>	chov. č. 25	1
Papoušek konžský	<i>Poicephalus gularis</i>	chov. č. 21	3
Papoušek kouřový	<i>Polytelis anthopeplus</i>	chov. č. 10, 28	2
Papoušek královský	<i>Alisterus scapularis</i>	chov. č. 2, 5, 31, 33	4
Papoušek mniší	<i>Myiopsitta monachus</i>	chov. č. 3, 7, 17, zv. č. 3	4
Papoušek mnohobarvý	<i>Psephotus varius</i>	chov. č. 3	1
Papoušek nádherný	<i>Polytelis swainsonii</i>	chov. č. 2, 3, zv. č. 2	3
Papoušek patagonský	<i>Cyanoliseus patagonus</i>	chov. č. 23, 32	2
Papoušek senegalský	<i>Poicephalus senegalus</i>	chov. č. 2, 13, 21 (2), 36	5
Papoušek zpěvavý	<i>Psephotus haematonotus</i>	chov. č. 23 (2), 24 (3), 28, 51 (2), zv. č. 1	9
Papoušek žlutotemenný	<i>Poicephalus meyeri</i>	chov. č. 24	1
Papoušíček Sclaterův	<i>Forpus modestus</i>	chov. č. 40	1
Papoušíček šedokřídlý	<i>Forpus coelestis</i>	chov. č. 39	1
Papoušíček žlutolíci	<i>Forpus xanthops</i>	chov. č. 37	1
Pyrura perlový	<i>Pyrrhura perlata</i>	zv. č. 3	1
Pyrura spp.	<i>Pyrrhura</i> spp.	chov. č. 2, 9	2
Rosela modrokřídla	<i>Northiella haematogaster</i>	chov. č. 27	1
Rozela adelaidská	<i>Platycercus adelaidae</i>	chov. č. 30	1
Rozela penant	<i>Platycercus elegans</i>	chov. č. 2, 9 (2), 11, 12, 18 (4), 28, 31 (2), 42 (2), 45, zv. č. 2	16
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	chov. č. 3 (2), 4, 7, 8, 9 (2), 23 (2), 28, 29, 31 (4), zv. č. 2	16
Rozela slámožlutá	<i>Platycercus flaveolus</i>	chov. č. 30	1
Rozela žltobřichá	<i>Platycercus caledonicus</i>	chov. č. 9, 32	2
Rozela žlutohlavá	<i>Platycercus adscitus</i>	chov. č. 29	1
Rozela žlutolíci	<i>Platycercus icterotis</i>	chov. č. 28, 29, 42, zv. č. 3	4
Žako šedý	<i>Psittacus erithacus</i>	chov. č. 3, 5, 19, 21, 23, 53 (2)	7

Český název ptáka	Latinský název ptáka	Původ ptáka	Počet vz.
Pěvci	Passeriformes		
Amarant malý	<i>Lagonosticta senegala</i>	chov. č. 16	2
Drozd plavý	<i>Turdus obscurus</i>	chov. č. 23	1
Chůvička japonská	<i>Lonchura striata domestica</i>	zv. č. 3	1
Kanár divoký	<i>Serinus canaria</i>	chov. č. 3, 12, 23 (2), zv. č. 1 (2), 2 (2), 4	9
Leskoptev dlouhoocasá	<i>Lamprotornis caudatus</i>	chov. č. 3	1
Leskoptev kovová	<i>Lamprotornis chalybaeus</i>	chov. č. 3	2
Leskoptev malá	<i>Lamprotornis chloropterus</i>	chov. č. 3	1
Motýlek rudouchý	<i>Uraeginthus bengalus</i>	chov. č. 49	1
Pásovník dlouhoocasý	<i>Poephila acuticauda</i>	chov. č. 3	1
Rýžovník šedý	<i>Padda oryzivora</i>	zv. č. 3	1
Špaček pagodový	<i>Temenuchus pagodarum</i>	chov. č. 23	1
Zebříčka pestrá	<i>Taeniopygia guttata</i>	chov. č. 3, 12, 14, zv. č. 2 (2), 3	6
Měkkozobí	Columbiformes		
Holoubek diamantový	<i>Geopelia cuneata</i>	chov. č. 3, 14	2
Holub bronzovokřídlý	<i>Phaps chalcoptera</i>	chov. č. 20	4
Holub horský	<i>Otidiphaps nobilis</i>	chov. č. 20	1
Holub chocholatý	<i>Ocyphaps lophotes</i>	chov. č. 3, 20	2
Holub olivový	<i>Columba arquatrix</i>	chov. č. 20	4
Holub purpurový	<i>Columba punicea</i>	chov. č. 20	2
Holub rudoprsý	<i>Gallicolumba crinigera</i>	chov. č. 20	1
Holub wonga	<i>Leucosarcia melanoleuca</i>	chov. č. 20	2
Holub zelenokřídlý	<i>Chalcophaps indica</i>	chov. č. 20	5
Hrdlička chechtavá	<i>Streptopelia roseogrisea</i>	chov. č. 20	2
Hrdlička kapská	<i>Oena capensis</i>	chov. č. 20	1
Hrdlička kropenatá	<i>Streptopelia chinensis</i>	chov. č. 20	1
Vrubozobí	Anseriformes		
Berneška bělolící	<i>Branta leucopsis</i>	chov. č. 15	1
Berneška havajská	<i>Branta sandvicensis</i>	chov. č. 15	2
Husa indická	<i>Anser indicus</i>	chov. č. 15	1
Husa velká	<i>Anser anser</i>	chov. č. 15	1
Husice andská	<i>Chloephaga melanoptera</i>	chov. č. 15	1
Husice rezavá	<i>Tadorna ferruginea</i>	chov. č. 15	1
Husička vdovka	<i>Dendrocygna viduata</i>	chov. č. 15	1
Hrabaví	Galliformes		
Bažant zlatý	<i>Chrysolophus pictus</i>	chov. č. 3	1
Křepelka japonská	<i>Coturnix japonica</i>	chov. č. 12	1
Páv korunkatý	<i>Pavo cristatus</i>	chov. č. 3, 15	2
Brodiví	Ciconiiformes		
Čáp bílý	<i>Ciconia boyciana</i>	chov. č. 15	1
Ibis bílý	<i>Eudocimus albus</i>	chov. č. 15	1
Ibis posvátný	<i>Threskiornis aethiopicus</i>	chov. č. 15	1
Ibis žlutokrký	<i>Threskiornis spinicollis</i>	chov. č. 15	1
Dlouhokřídlí	Charadriiformes		
Pisila karibská	<i>Himantopus mexicanus</i>	chov. č. 15	1
Tenkozobec opačný	<i>Recurvirostra avosetta</i>	chov. č. 15	1
Kukačky	Cuculiformes		
Banánovec obecný	<i>Musophaga violacea</i>	chov. č. 3	1
Turako chocholatý	<i>Tauraco persa</i>	chov. č. 3	1

Vysvětlivky:

vz. = vzorek, **chov.** = chovatel, **zv.** = zverimex

Poznámka: Od chovatelů č. 23-51 byly vzorky odebrány v rámci výstavy Exota 2007.

Tab. 2: Vyšetřené druhy ptáků ze ZOO Money Town (Afrika).

Český název ptáka	Latinský název ptáka	Počet vzorků
Amazoňan modročelý	<i>Amazona aestiva</i>	2
Amazoňan žlutohlavý	<i>Amazona ochrocephala</i>	1
Ara arakanga	<i>Ara macao</i>	1
Ara ararauna	<i>Ara ararauna</i>	2
Ara zelenokřídlý	<i>Ara chloroptera</i>	3
Husice egyptská	<i>Alopochen aegyptiacus</i>	1
Jeřáb rajský	<i>Anthropoides paradisea</i>	1
Kakadu bílý	<i>Cacatua alba</i>	1
Kakadu žlutolící	<i>Cacatua sulphurea</i>	1
Lori červený	<i>Eos bornea</i>	3
Lori mnohobarvý	<i>Trichoglossus haematodus</i>	2
Lori zelenoocasý	<i>Lorius chlorocercus</i>	2
Lori žlutohřbetý	<i>Lorius garrulus</i>	2
Nandej černohlavý	<i>Nandayus nenday</i>	2
Žako šedý	<i>Psittacus erithacus</i>	4

3.2. Metody

3.2.1. Barvení spór pomocí Calcofluoru White M2R (Vávra and Chalupský 1982)

Vzorky trusu rozetřené na podložním sklíčku byly fixovány methanolem a ponechány zaschnout asi 2 minuty. Následovalo barvení 1% Calcofluorem White M2R v PBS (fosfátový pufr, pH 7,2-7,4) po dobu 10 minut. Poté byla podložní sklíčka opláchnuta PBS a dobarvena 0,5% Evansovou modří ve vodě po dobu 30 sekund. Podložní sklíčko bylo opět opláchnuto PBS a ponecháno zaschnout. Takto obarvené vzorky trusu byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX70) při zvětšení $1000 \times$ s olejovou imerzí při vlnové délce 490 nm. Obarvené spóry mikrosporidií svítí jasně modrobíle.

Jako pozitivní kontrola byly použity obarvené spóry *E. hellem* v koncentraci 10^7 spór na ml. Jednalo se o izolát z AIDS pacienta (Didier et al. 1991) udržovaný ve tkáňové kultuře buněk Vero E6 ve sbírce laboratoře lékařské a veterinární parazitologie Parazitologického ústavu BC AVČR, v.v.i. v Českých Budějovicích.

3.2.2. Extrakce DNA ze vzorků trusu

K 180-200 mg trusu bylo přidáno 200 μ l ASL pufru a 150 mg skleněných partikulí o průměru 0,5 mm. Poté bylo provedeno rozbíjení potenciálně přítomných spór v beadbeateru (FastPrep[®]-24, M.P. Biomedicals, CA, USA) po dobu 1 minuty při maximální rychlosti (6,5 rpm). Dále bylo postupováno podle návodu výrobce komerčně dodávaného izolačního kitu QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). Získaná DNA byla uchovávána při teplotě $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3. Výběr primerů pro PCR

Výběr primerů proběhl na základě předpokusu, kdy byly porovnávány 2 druhy primerů. První dvojice s názvem Micro-F a 300R (viz Tab. 3) amplifikuje ribozomální DNA části malé podjednotky (SSU rDNA) lidských mikrosporidií, což zahrnuje druhy *E. bienersi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *Vittaforma corneae* a rod *Pleistophora* (Thurston-Enriquez et al. 2002). Tyto primery byly porovnávány s primery MSP pro nested PCR amplifikující ribozomální DNA části malé podjednotky (SSU-rDNA), internal transcribed spacer (ITS) a části velké podjednotky (LSU-rDNA) níže zmíněných druhů

mikrosporidií. Jednalo se o 2 sady nested primerů, přičemž první (viz Tab. 4) byla určena pouze pro amplifikaci druhu *E. bienersi*, druhá sada (viz Tab. 5) byla využívána pro amplifikaci *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *Vairimorpha necatrix*, *V. lymantriae*, *Ameson michaelis* a *Ichthyosporidium giganteum* (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996).

Oba druhy primerů byly testovány na setu 33 náhodně vybraných vzorků DNA izolovaných z trusu ptáků a dle výsledků bylo rozhodnuto o výběru sady primerů.

Tab. 3: Primery pro *E. bienersi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *Vittaforma corneae* a rod *Pleistophora*.

Primery	Sekvence
Micro-F (21-mer)	5' - CAC CAG GTT GAT TCT GCC TGA - 3'
300R (21-mer)	5' - CCT CTC CGG AAC CAA ACC CTG -3'

Výsledný produkt byl dlouhý 279 bp.

Amplifikační program pro termocykler (Little Genius, BIOER) pro dvojici primerů MICRO-F a 300R byl následující - počáteční denaturace při 95 °C po dobu 10 min, denaturace při 94 °C po dobu 45 s, nasedání primerů při 58 °C po dobu 20 s, syntéza nového řetězce při 72 °C trávající 40 s, vše ve 40 cyklech a poté dosyntetizování nového řetězce při 72 °C po dobu 10 min.

Tab. 4: Primery pro *Encephalitozoon* spp., *Vairimorpha necatrix*, *V. lymantriae*, *Ameson michaelis* a *Ichthyosporidium giganteum*.

Primery	Sekvence
Primární PCR	
MSP-1 (15-mer)	TGA ATG (G,T)GT CCC TGT
MSP-2a (15-mer)	TCA CTC GCC GCT ACT
Sekundární PCR	
MSP-3 (24-mer)	GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G)(C,T) TAT
MSP-4a (27-mer)	CCA AGC TTA TGC TTA AGT (C,T)(A,C)A A(A,G)G GGT

Očekávaná délka výsledného produktu byla zhruba 0,3 kb (konkrétně 289 bp pro *E. intestinalis* a 305 bp pro *E. cuniculi*).

Tab. 5: Primery pro druh *E. bieneusi*.

Primery	Sekvence
Primární PCR	
MSP-1 (15-mer)	TGA ATG (G,T)GT CCC TGT
MSP-2b (16-mer)	GTT CAT TCG CAC TAC T
Sekundární PCR	
MSP-3 (24-mer)	GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G)(C,T) TAT
MSP-4b (26-mer)	CCA AGC TTA TGC TTA AGT CCA GGG AG

Očekávaná velikost výsledného produktu byla přibližně 0,5 kb (přesně 508 bp).

Amplifikační program pro termocykler (Little Genius, BIOER) pro nested primery MSP byl následující - počáteční denaturace při 94 °C po dobu 3 min, denaturace při 94 °C po dobu 45 s, nasedání primerů při 54 °C po dobu 45 s, syntéza nového řetězce při 72 °C trvající 1 min, vše ve 35 cyklech, a dosyntetizování nového řetězce při 72 °C po dobu 7 min.

3.2.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Celkový objem reakční směsi (viz Tab. 6) pro každou PCR byl 25 µl a součástí každé PCR reakce byla také pozitivní a negativní kontrola. Taq polymeráza byla vždy přidávána jako poslední.

Použité roztoky:

- 10× koncentrovaný kompletní pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, 15 mM MgCl₂)
- Taq purple DNA polymeráza (Top-Bio, 1 U/µl)
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP's; Top-Bio, 10 mM roztok - 2,5 mM každé báze)
- Primery (Generi Biotech, 10 pmol/µl)
- BSA (Sigma, 10mg/ml)
- MgCl₂ (Top-Bio, 25mM)

Tab. 6: Reakční směs pro PCR (pro 1 reakci).

Použitý roztok	Objem
pufř	2,5 μ l
dNTP's	0,5 μ l
MgCl ₂	1,5 μ l
primer 5'	0,5 μ l
primer 3'	0,5 μ l
Taq polymeráza	0,63 μ l
Deionizovaná H ₂ O (PCR H ₂ O)	13,87 μ l
templátová DNA	5,0 μ l
celkem	25,0 μl

V případě pozitivní kontroly bylo použito 1,5 μ l templátové DNA a 17,37 μ l PCR H₂O. Jako pozitivní kontrola byla pro rod *Encephalitozoon* použita DNA vyizolovaná z kultury *E. hellem* v koncentraci 3×10^7 spór na ml. Jednalo se o izolát z AIDS pacienta (Didier et al. 1991) udržovaný ve tkáňové kultuře buněk Vero E6 ve sbírce laboratoře lékařské a veterinární parazitologie Parazitologického ústavu BC AVČR, v.v.i. v Českých Budějovicích. Pro druh *E. bieneusi* byla použita DNA izolovaná ze spór získaných ze stolice *E. bieneusi*-pozitivního HIV-AIDS pacienta z Limy (Peru), které byly poskytnuty Dr. G. S. Visvesvarou, CDC Atlanta, GA, USA.

3.2.5. Gelová elektroforéza

Délka DNA fragmentů byla ověřována gelovou elektroforézou na 1,5% gelu obarveným ethidium bromidem (Sigma) při 70 V (EC300XL, Thermo Scientific) po dobu 60 minut. Výsledné produkty byly vizualizované pomocí UV transiluminátoru (Electronic UV transilluminator, Ultra-Lum, Inc.) při vlnové délce 312 nm. Jako DNA marker byl použit 100 bp DNA ladder (Fermentas).

3.2.6. Příprava vzorků pro sekvenaci a sekvenace

Extrakce DNA z gelu

Vzorky pozitivní při gelové elektroforéze byly z gelu vyříznuty a byla z nich izolována DNA pomocí komerčně dostupného izolačního kitu QIAquick[®] Gel Extraction

Kit (QIAGEN). Vyizolovaná DNA byla vysušena ve vakuovém evaporizátoru (DyNA Vap, Labnet) a poté do doby sekvenace uskladněna při teplotě +4 °C.

Sekvenace

Vysušený vzorek DNA byl zaslán ke zpracování do laboratoře Macrogen Inc. (Soul, Korea). Sekvenace byla provedena na sekvenátoru (ABI3730XL). Výsledné sekvence byly vyhodnoceny pomocí programů Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd), ClustalX (Larkin et al. 2007), BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences) a porovnány se sekvencemi v GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

3.2.7. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

PCR produkty některých vzorků byly analyzovány metodou RFLP (restriction fragment length polymorphism).

Celková PCR-RFLP reakce (30 µl) byla namíchána z 20 µl PCR produktu, 3 µl pufru (Fermentas, 10× koncentrovaný pufr pro enzym MboI, s BSA), 0,2 µl SAM (BioLabs, S-adenosylmethionine 32mM, 10% ethanol, 5 mM H₂SO₄), 0,5 µl MboI (Fermentas, 10 U/1 µl) a 6,3 µl PCR vody. Poté byly vzorky inkubovány při 37 °C po dobu 12 hodin. Výsledky restrikce byly vyhodnoceny gelovou elektroforézou v 2% agarózovém gelu.

Restrikční enzym MboI štěpí DNA v sekvenci SSU-rDNA, konkrétně v případě *E. hellem* (313 bp nebo 317bp) na dva fragmenty dlouhé 121 bp a 192 nebo 196 bp v závislosti na genotypu, *E. intestinalis* (294 bp) na fragmenty dlouhé 123 bp a 171 bp a *E. cuniculi* (307 bp) na 3 fragmenty dlouhé 46 bp, 76 bp a 185 bp.

3.2.8. Sledování vylučování spór mikrosporidií

Během třicetidenního sledování byl denně odebrán trus 9 andulkám vlnkovým pořízeným z jednoho českobudějovického zverimexu, odkud byly odkoupeny po předchozím vyšetření vzorku trusu s pozitivním výsledkem. Ptáci byli umístěni každý do jedné klece a byli krmeni běžně dostupným komerčním krmivem pro andulky. Andulky nevykazovaly žádné klinické příznaky onemocnění. Trus byl vyšetřován jak pomocí nested PCR, tak pomocí nátěrů trusu barvených Calcofluorem a prohlížených fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX70).

Šestnáctý den sledování byly usmrceny a vypitvány 2 infikované andulky vlnkované (andulky č. 3 a 5). Části orgánů (tenké střevo, slepé střevo, tlusté střevo, ledviny, játra a plíce) byly zpracovány za účelem histologického vyšetření, pro transmisní elektronovou mikroskopii a na izolaci DNA ze tkání. Po ukončení pokusu byly vypitvány další 2 andulky vlnkované (andulky č. 2 a 8) a odebrané orgány byly zpracovány stejným způsobem jako v předchozím případě.

3.2.9. Extrakce DNA z tkání

Pro izolaci DNA z tkání andulek vlnkovaných byl využit komerčně dodávaný izolační kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). První krok návodu byl mírně modifikován, neboť bylo potřeba nejprve rozbít potenciálně přítomné spóry mikrosporidií ve tkáni. Do mikrozkušavky bylo nastříháno 10 mg tkáně, poté bylo přidáno 150 mg skleněných partikulí o průměru 0,5 mm a 1 skleněná partikule o průměru 5 mm. Nakonec byl přidán pufr ATL a bylo provedeno rozbíjení v beadbeateru (FastPrep[®]-24, M.P. Biomedicals, CA, USA) po dobu 1 minuty při maximální rychlosti (6,5 rpm). Dále bylo postupováno podle návodu výše zmíněného komerčního izolačního kitu.

3.2.10. Histologické zpracování

Vzorky tkání byly fixovány ve fixačním roztoku Davitson (9 dílů zásobního roztoku a 1 díl kyseliny octové) po dobu 24 hodin a poté přemístěny do zásobního roztoku Davitson (400 ml glycerinu, 800 ml koncentrovaného formolu, 1200 ml 96% alkoholu a 1200 ml destilované vody), v němž byly skladovány do dalšího zpracování. Vzorky byly dále odvodněny ve stoupající řadě alkoholů, po odvodnění byl alkohol z tkáně odstraněn a tkáň byla nasycena xylenem. Po nasycení byl materiál přenesen do tekutého parafínu. Nakonec byly vzorky zality do přefiltrovaného parafínu a zhotoveny bločky. Z bloček byly nakrájeny na mikrotomu histologické řezy tenké 4-6 μm . Před barvením byly řezy odparafínovány v xylenu a postupnou alkoholovou řadou převedeny do vody. Připravené řezy byly barveny Calcofluorem M2R (Vávra and Chalupský 1982), Gramovým modifikovaným barvením (Brown and Brenn 1931) a barvením chromotropem podle Webera (Weber et al. 1992). Po obarvení byly řezy barvené Calcofluorem pozorovány fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX70) při zvětšení 1000 \times s olejovou imerzí při

vlnové délce 490 nm. Řezy barvené zbývajícími dvěma metodami byly zamontovány do kanadského balzámu a prohlíženy světelným mikroskopem.

Barvení Calcofluorem White M2R (Vávra and Chalupský 1982)

Histologické vzorky byly barveny stejnou metodou jako nátěry (viz. 3.2.1).

Gramovo modifikované barvení (Brown and Brenn 1931)

Použité roztoky:

1. 1% krystalová violet (1 g violeti ve 100 ml destilované vody).
2. 5% hydrogenuhličitan sodný (5 g hydrogenuhličitanu ve 100 ml destilované vody).
3. Gramův jódový roztok (1g jódu, 2 g jodidu draselného, 300 ml vody).
4. Nasycený roztok basického fuchsinu (0,25 g fuchsinu ve 100 ml destilované vody), pracovní roztok fuchsinu (nasycený roztok ředěný vodou 1:1000).
5. 0,1% roztok kyseliny pikrové (0,1 g kyseliny pikrové ve 100 ml acetonu).

Postup:

1. Řezy byly odparafinovány a převedeny do vody.
2. Na vzorky byl nanesen 1 ml krystalické violeti a 50 µl hydrogenuhličitanu na 1 min.
3. Poté byly opláchnuty vodou.
4. Vzorky byly ponořeny do roztoku jódu na 1 min.
5. Následně opět opláchnuty vodou.
6. Odbarvování v roztoku aceton-éter 1:1 probíhalo, dokud se nesmyla modrá barva.
7. V roztoku fuchsinu byly vzorky barveny po dobu 1 min.
8. Následovalo opláchnutí vodou a ponoření do acetonu.
9. Vzorky byly ihned diferencovány v roztoku kyseliny pikrové, dokud se řezy neodbarvily do žlutavě růžova.
10. Poté byly řezy rychle opláchnuty v acetonu a následně ve směsi aceton-xylen 1:1.
11. Na závěr byly řezy projasněny promytím v xylenové řadě a zamontovány do kanadského balzámu.

Mikrosporidie se při tomto barvení jeví tmavě fialově, gram-pozitivní bakterie modře, gram-negativní bakterie červeně, jádra buněk červeně a ostatní tkáňové elementy žlutě. Vzorky byly prohlíženy pod olejovou imerzí při zvětšení 1000 ×.

Barvení chromotropem podle Webera (Weber et al. 1992)

Použité roztoky:

- Chromotrop (6 g Chromotropu 2R; 0,15 g Fast green a 0,7 g kyseliny wolframové se smíchá, přidají se 3 ml kyseliny octové a nechá se stát 30 min, poté se roztok zředí 100 ml destilované vody).
- Kyselý 90% alkohol (0,45 ml kyseliny octové; 93,3 ml 96% alkoholu; 6,25 ml destilované vody).
- Kyselý 96% alkohol (0,45 ml kyseliny octové; 99,55 ml 96% alkoholu).

Postup:

1. Odparafinované řezy byly fixovány metanolem po dobu 5 min.
2. Dále byly 90 min barveny v roztoku chromotropu.
3. Následovalo opláchnutí v kyselém 90% alkoholu 10 s.
4. Poté byly vzorky opláchnuty v kyselém 96% alkoholu.
5. Odvodnění proběhlo následující řadou: 96% alkohol 5 min, 100% alkohol 10 min, xylen 10 min.

Vzorky byly prohlíženy pod olejovou imerzí při zvětšení 1000 ×. Toto barvení je primárně určeno pro vzorky stolic a duodenálních aspirátů. Mikrosporidie se barví červeně.

3.2.11. Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

Vzorky tkání 4 andulek vlnkovaných byly pro TEM fixovány v 2,5% glutaraldehydu a do jejich zpracování byly uchovávány při teplotě +4 °C. Polotenské a ultratenké řezy tkání byly zhotoveny laboratoří elektronové mikroskopie BC AVČR, v.v.i. v Českých Budějovicích. Polotenské řezy obarvené toluidinovou modří byly prohlíženy světelným mikroskopem (OLYMPUS IX70). Ultratenké řezy tenkého a tlustého střeva andulky č. 3 a jater a tlustého střeva andulky č. 5 byly prohlíženy transmisním elektronovým mikroskopem (JEOL JEM 1010).

4. Výsledky

4.1. Optimalizace metody předběžným pokusem

Pomocí PCR byl za použití dvou druhů primerů vyšetřen set 33 vzorků DNA. Primery Micro-F a 300R zachytily mikrosporidie ve 3 vzorcích DNA při celkové prevalenci 9,1 %, zatímco nested primery MSP detekovaly mikrosporidie ve 20 vzorcích v celkové prevalenci 60,6 %. Na základě těchto výsledků byly dále pro detekci mikrosporidií v trusu ptáků používány primery MSP.

4.2. Vyšetření exotických ptáků na výskyt mikrosporidií

4.2.1. Zachycené druhy mikrosporidií a jejich prevalence

Pomocí PCR, sekvenace nebo RFLP bylo celkem 148 vzorků trusu pozitivních na mikrosporidie v celkové prevalenci 44,1 % (viz Tab. 7). Byly zachyceny 3 druhy mikrosporidií, konkrétně *E. hellem* v 4,5 % (15 z 336), *E. cuniculi* v 11,6 % (39 z 336), *E. bienersi* v 16,4 % (55 z 336), smíšená infekce *E. hellem* a *E. bienersi* v 3,3 % (11 z 336) a smíšená infekce *E. cuniculi* a *E. bienersi* v 5,1 % (17 z 336). Ve 2,1 % (7 z 336) byly vzorky PCR pozitivní na rod *Encephalitozoon*, ovšem druh se z důvodu nekvalitní sekvenace nepodařilo určit, a v 1,2 % (4 z 336) byly vzorky pozitivní zároveň na rod *Encephalitozoon* i na *E. bienersi*.

Všichni vyšetření ptáci byli v dobrém zdravotním stavu kromě 4 jedinců. V rámci výstavy Exota 2007 byli 3 jedinci umístěni mimo vystavovací plochu vzhledem k vysoké stresovanosti a nepříznivému zdravotnímu stavu (neoféma Bourkova - soukromý chovatel č. 50, papoušek zpěvavý - soukromý chovatel č. 51, motýlek rudouchý - soukromý chovatel č. 49) a jeden vzorek byl odebrán od uhynulého ptáka (agapornis Fischerův - soukromý chovatel č. 39). Jeřáb rajský ze ZOO Monkey Town měl zraněné křídlo a byla mu podávána antibiotika. Z těchto ptáků byli na mikrosporidie pozitivní jeřáb rajský a uhynulý agapornis Fischerův.

Tabulka č. 8 ukazuje prevalence nalezených druhů mikrosporidií u chovatelů, od kterých bylo získáno 6 a více vzorků a byl u nich nalezen alespoň jeden pozitivní vzorek. Pomocí ANOVA (R - language for statistical computing; R Development Core Team 2008) byl proveden rozbor variancí, ze kterého plyne, že variance v prevalenci je značně

vyšší pro interakci faktoru chovatel:druh ($d.f.=36$, MSS 18390.9), než pro samotný faktor chovatel ($d.f.=17$, MSS=4673) [$d.f.$ - stupně volnosti, MSS - model sum of squares].

Tab. 7: Druhy ptáků se zachycenými druhy mikrosporidií.

Český název ptáka	Latinský název ptáka	Původ ptáka	<i>E</i>	<i>E. h</i>	<i>E. c</i>	<i>E. b</i>
Papoušci	Psittaciformes					
Agapornis Fischerův	<i>Agapornis fischeri</i>	chov. č. 2	N			
Agapornis Fischerův	<i>Agapornis fischeri</i>	chov. č. 2			S	
Agapornis Fischerův	<i>Agapornis fischeri</i>	chov. č. 8				S
Agapornis Fischerův	<i>Agapornis fischeri</i>	chov. č. 22			S	
Agapornis Fischerův	<i>Agapornis fischeri</i>	chov. č. 39		R		
Agapornis hnědohlavý	<i>Agapornis nigrigenis</i>	chov.l č. 8				S
Agapornis růžohrdlý	<i>Agapornis roseicollis</i>	zv. č. 2		S		S
Agapornis růžohrdlý	<i>Agapornis roseicollis</i>	zv. č. 2			S	S
Agapornis růžohrdlý	<i>Agapornis roseicollis</i>	chov. č. 14			S	
Agapornis růžohrdlý	<i>Agapornis roseicollis</i>	chov. č. 23			S	
Agapornis růžohrdlý	<i>Agapornis roseicollis</i>	chov. č. 23			S	
Agapornis šedohlavý	<i>Agapornis cana</i>	chov. č. 8				S
Agapornis škraboškový	<i>Agapornis personata</i>	zv. č. 2		S		S
Agapornis škraboškový	<i>Agapornis personata</i>	zv. č. 3		R		
Agapornis škraboškový	<i>Agapornis personata</i>	chov. č. 3				X
Agapornis škraboškový	<i>Agapornis personata</i>	chov. č. 8				S
Agapornis škraboškový	<i>Agapornis personata</i>	chov. č. 22			S	
Alexander malý	<i>Psittacula krameri</i>	zv. č. 2		S		
Alexander malý	<i>Psittacula krameri</i>	chov. č. 3			S	X
Alexander malý	<i>Psittacula krameri</i>	chov. č. 4			S	
Alexander rudohlavý	<i>Psittacula cyanocephala</i>	chov. č. 3				X
Alexander velký	<i>Psittacula eupatria</i>	chov. č. 2	N			
Amazoňan kubánský	<i>Amazona leucocephala</i>	chov. č. 5				S
Amazoňan modrobradý	<i>Amazona festiva</i>	chov. č. 23		S		
Amazoňan modročelý	<i>Amazona aestiva</i>	ZOO MT			S	
Amazoňan pomoučený	<i>Amazona farinosa</i>	chov. č. 35			R	
Amazoňan rudočelý	<i>Amazona autumnalis</i>	chov. č. 42			R	
Amazoňan rudočelý	<i>Amazona autumnalis</i>	chov. č. 45		S		
Amazoňan tukumanský	<i>Amazona tucumana</i>	chov. č. 46			R	
Amazoňan vějířový	<i>Deropterus accipitrinus</i>	chov. č. 23			S	
Amazoňan zelenolící	<i>Amazona viridigenalis</i>	chov. č. 45			R	
Amazoňan žlutohlavý	<i>Amazona ochrocephala</i>	chov. č. 42		S		
Amazónek bronzovokřídlý	<i>Pionus chalcopterus</i>	chov. č. 44			R	
Amazónek šupinkový	<i>Pionus maximiliani</i>	chov. č. 24			R	
Amazónek tmavý	<i>Pionus fuscus</i>	chov. č. 42			R	
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	zv. č. 2			S	S
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	zv. č. 3			R	
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	chov. č. 3				X
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	chov. č. 3	N			X
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	chov. č. 3				X
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	chov. č. 6				S
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	chov. č. 6			R	S
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	chov. č. 6				S

Český název ptáka	Latinský název ptáka	Původ ptáka	E	E. h	E. c	E. b
Papoušci	Psittaciformes					
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	chov. č. 6				S
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	chov. č. 7			R	
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	chov. č. 8				S
Andulka vlnkovaná	<i>Melopsittacus undulatus</i>	zv. č. 2		S		
Ara arakanga	<i>Ara macao</i>	ZOO MT			S	
Ara ararauna	<i>Ara ararauna</i>	chov. č. 5				X
Aratinga dlouhoocasý	<i>Aratinga acuticaudata</i>	chov. č. 8				S
Aratinga škraboškový	<i>Aratinga mitrata</i>	chov. č. 8				S
Aratinga zlatohlavý	<i>Aratinga auricapilla</i>	chov. č. 8				S
Barnard límcový	<i>Barnardius zonarius</i>	chov. č. 9			R	S
Barnard límcový	<i>Barnardius zonarius</i>	chov. č. 45		S		
Kakadu bílý	<i>Cacatua alba</i>	chov. č. 33		S		
Kakadu Goffinův	<i>Cacatua goffini</i>	chov. č. 23			S	
Kakadu inka	<i>Cacatua leadbeateri</i>	chov. č. 33			R	
Kakadu naholící	<i>Cacatua sanguinea</i>	chov. č. 33		S		
Kakadu růžový	<i>Eolophus roseicapillus</i>	chov. č. 5		R		X
Kakadu růžový	<i>Eolophus roseicapillus</i>	chov. č. 5				X
Kakariki rudočelý	<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>	chov. č. 23			S	
Kakariki spp.	<i>Cyanoramphus</i> spp.	chov. č. 3				S
Korela chocholátá	<i>Nymphicus hollandicus</i>	chov. č. 1			S, R	
Korela chocholátá	<i>Nymphicus hollandicus</i>	zv. č. 2				S
Korela chocholátá	<i>Nymphicus hollandicus</i>	chov. č. 3				X
Korela chocholátá	<i>Nymphicus hollandicus</i>	chov. č. 3				X
Korela chocholátá	<i>Nymphicus hollandicus</i>	chov. č. 4			S	
Korela chocholátá	<i>Nymphicus hollandicus</i>	chov. č. 6				S
Korela chocholátá	<i>Nymphicus hollandicus</i>	chov. č. 3				S
Korela chocholátá	<i>Nymphicus hollandicus</i>	chov. č. 8				S
Korela chocholátá	<i>Nymphicus hollandicus</i>	chov. č. 9			R	S
Lori mnohobarvý	<i>Trichoglossus haematodus</i>	ZOO MT				N
Nandej černohlavý	<i>Nandayus nenday</i>	chov. č. 8				S
Neoféma modrohlavá	<i>Neophema splendida</i>	chov. č. 31				S
Neoféma ozdobná	<i>Neophema elegans</i>	chov. č. 27		S		
Neoféma tyrkysová	<i>Neophema pulchella</i>	chov. č. 3	N			X
Neoféma tyrkysová	<i>Neophema pulchella</i>	chov. č. 10				S
Neoféma tyrkysová	<i>Neophema pulchella</i>	chov. č. 12			S	
Neoféma tyrkysová	<i>Neophema pulchella</i>	chov. č. 14			S	
Neoféma tyrkysová	<i>Neophema pulchella</i>	chov. č. 23		S		
Papoušek alexandřin	<i>Polytelis alexandrae</i>	chov. č. 52				S
Papoušek královský	<i>Alisterus scapularis</i>	chov. č. 2	N			S
Papoušek královský	<i>Alisterus scapularis</i>	chov. č. 5				X
Papoušek mniší	<i>Myiopsitta monachus</i>	zv. č. 3			R	
Papoušek mniší	<i>Myiopsitta monachus</i>	chov. č. 7				S
Papoušek mniší	<i>Myiopsitta monachus</i>	chov. č. 3				S
Papoušek mnohobarvý	<i>Psephotus varius</i>	chov. č. 3				X
Papoušek nádherný	<i>Polytelis swainsonii</i>	zv. č. 2				S
Papoušek nádherný	<i>Polytelis swainsonii</i>	chov. č. 3	N			X
Papoušek senegalský	<i>Poicephalus senegalus</i>	chov. č. 13			S	S
Papoušek zpěvavý	<i>Psephotus haematonotus</i>	chov. č. 23		S		
Pyrrura spp.	<i>Pyrrhura</i> spp.	zv. č. 2				S
Pyrrura spp.	<i>Pyrrhura</i> spp.	chov. č. 9			R	S

Český název ptáka	Latinský název ptáka	Původ ptáka	E	E. h	E. c	E. b
Papoušci	Psittaciformes					
Rozela penant	<i>Platycercus elegans</i>	zv. č. 2			S	S
Rozela penant	<i>Platycercus elegans</i>	chov. č. 9				S
Rozela penant	<i>Platycercus elegans</i>	chov. č. 9			R	S
Rozela penant	<i>Platycercus elegans</i>	chov. č. 11			S	
Rozela penant	<i>Platycercus elegans</i>	chov. č. 12				S
Rozela penant	<i>Platycercus elegans</i>	chov. č. 18				S
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	zv. č. 2			S	S
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	chov. č. 3				X
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	chov. č. 3		R		X
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	chov. č. 4			S	
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	chov. č. 8		R		S
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	chov. č. 9				S
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	chov. č. 9			R	S
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	chov. č. 23			S	
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	chov. č. 23		S		
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	chov. č. 31				S
Rozela pestrá	<i>Platycercus eximius</i>	chov. č. 31		S		S
Rozela žlutobřichá	<i>Platycercus caledonicus</i>	chov. č. 9			R	S
Rozela žlutolící	<i>Platycercus icterotis</i>	chov. č. 28				N
Žako šedý	<i>Psittacus erithacus</i>	chov. č. 3				X
Žako šedý	<i>Psittacus erithacus</i>	chov. č. 5	N			
Žako šedý	<i>Psittacus erithacus</i>	chov. č. 19			S	S
Žako šedý	<i>Psittacus erithacus</i>	ZOO MT			R	
Pěvci	Passeriformes					
Amarant malý	<i>Lagonosticta senegala</i>	chov. č. 16			S	
Chůvička japonská	<i>Lonchura striata domestica</i>	zv. č. 3		R		
Kanár divoký	<i>Serinus canaria</i>	chov. č. 23			S	
Kanár divoký	<i>Serinus canaria</i>	chov. č. 23		S		S
Kanár divoký	<i>Serinus canaria</i>	chov. č. 12				S
Kanár divoký	<i>Serinus canaria</i>	chov. č. 3	N			
Kanár divoký	<i>Serinus canaria</i>	zv. č. 2			S	N
Leskoptev dlouhoocasá	<i>Lamprotornis caudatus</i>	chov. č. 3				X
Leskoptev kovová	<i>Lamprotornis chalybaeus</i>	chov. č. 3				X
Leskoptev kovová	<i>Lamprotornis chalybaeus</i>	chov. č. 3		R		X
Rýžovník šedý	<i>Padda oryzivora</i>	zv. č. 3		R		
Špaček pagodový	<i>Temenuchus pagodarum</i>	chov. č. 23			S	S
Zebříčka pestrá	<i>Taeniopygia guttata</i>	chov. č. 14			S	
Zebříčka pestrá	<i>Taeniopygia guttata</i>	chov. č. 12			S	
Zebříčka pestrá	<i>Taeniopygia guttata</i>	chov. č. 3		R		X
Zebříčka pestrá	<i>Taeniopygia guttata</i>	zv. č. 3		R		
Zebříčka pestrá	<i>Taeniopygia guttata</i>	zv. č. 2			S	N
Vrubozobí	Anseriformes					
Berneška bělolící	<i>Branta leucopsis</i>	chov. č. 15				S
Berneška havajská	<i>Branta sandvicensis</i>	chov. č. 15				S
Husice andská	<i>Chloephaga melanoptera</i>	chov. č. 15				S
Husice egyptská	<i>Alopochen aegyptiacus</i>	ZOO MT	N			
Krátkokřídli	Gruiformes					
Jeřáb rajský	<i>Anthropoides paradisea</i>	ZOO MT	N			
Měkkozobí	Columbiformes					
Holoubek diamantový	<i>Geopelia cuneata</i>	chov. č. 14				S

Český název ptáka	Latinský název ptáka	Původ ptáka	<i>E</i>	<i>E. h</i>	<i>E. c</i>	<i>E. b</i>
Měkkozobí	Columbiformes					
Holoubek diamantový	<i>Geopelia cuneata</i>	chov. č. 3	N			
Holub chocholatý	<i>Ocyphaps lophotes</i>	chov. č. 3				S
Brodiví	Ciconiiformes					
Ibis žlutokrký	<i>Threskiornis spinicollis</i>	chov. č. 15			S	
Dlouhokřídli	Charadriiformes					
Pisila karibská	<i>Himantopus mexicanus</i>	chov. č. 15			S	
Tenkozobec opačný	<i>Recurvirostra avosetta</i>	chov. č. 15			S	
Hrabaví	Galliformes					
Bažant zlatý	<i>Chrysolophus pictus</i>	chov. č. 3				S
Křepelka japonská	<i>Coturnix japonica</i>	chov. č. 12			S	
Páv korunkatý	<i>Pavo cristatus</i>	chov. č. 3				S
Kukačky	Cuculiformes					
Banánovec obecný	<i>Musophaga violacea</i>	chov. č. 3				X

Vysvětlivky:

E: *Encephalitozoon* spp.

E. h: *Encephalitozoon hellem*

E. c: *Encephalitozoon cuniculi*

E. b: *Enterocytozoon bieneusi*

chov. = chovatel, **zv.** = zverimex, **ZOO MT** = ZOO Monkey Town

Druhy mikrosporidií byly určeny pomocí:

R: RFLP

S: sekvenace

N: PCR, neúspěšná sekvenace

X: PCR (s druhově specifickými primery), bez sekvenace.

Tab. 8: Chovatelé a prevalence detekovaných druhů.

Původ ptáka	Počet vzorků	<i>E. h</i> %	<i>E. c</i> %	<i>E. b</i> %
chov. č. 12	6	0,0	50,0	33,3
chov. č. 14	7	0,0	42,9	14,3
chov. č. 15	15	0,0	20,0	20,0
chov. č. 2	13	3,8	7,7	3,8
chov. č. 23	19	23,7	39,5	5,3
chov. č. 24	7	0,0	14,3	0,0
chov. č. 28	6	0,0	0,0	16,7
chov. č. 3	30	8,3	1,7	73,3
chov. č. 31	9	5,6	0,0	27,8
chov. č. 33	6	33,3	16,7	0,0
chov. č. 42	9	11,1	22,2	0,0
chov. č. 45	7	28,6	14,3	0,0
chov. č. 5	9	5,6	11,1	50,0
chov. č. 8	11	4,5	0,0	95,5
chov. č. 9	8	0,0	37,5	62,5
ZOO MT	28	0,0	10,7	3,6
zv. č. 2	16	15,6	18,8	40,6
zv. č. 3	10	40,0	20,0	0,0

Vysvětlivky:

chov. = chovatel, **zv.** = zverimex, **ZOO MT** = ZOO Monkey Town

4.2.2. Vyhodnocení sekvencí a genotypizace zachycených mikrosporidií

Sekvenace byla neúspěšná v 15ti případech (11,9 %) ze 126, pravděpodobně z důvodu nekvalitní DNA. Byly detekovány 3 druhy mikrosporidií a 7 genotypů, jak je pro přehlednost uvedeno v tabulce 9. Získané sekvence byly 100% identické se sekvencemi daných genotypů v GenBank. V případě určení *E. cuniculi* genotypů I a II byla využita charakterizace ITS genotypů založená na počtu GTTT opakování (Didier et al. 1995), neboť zatím nejsou v GenBank žádné dostupné sekvence těchto dvou genotypů.

Tab. 9: Druhy mikrosporidií a počty nalezených genotypů

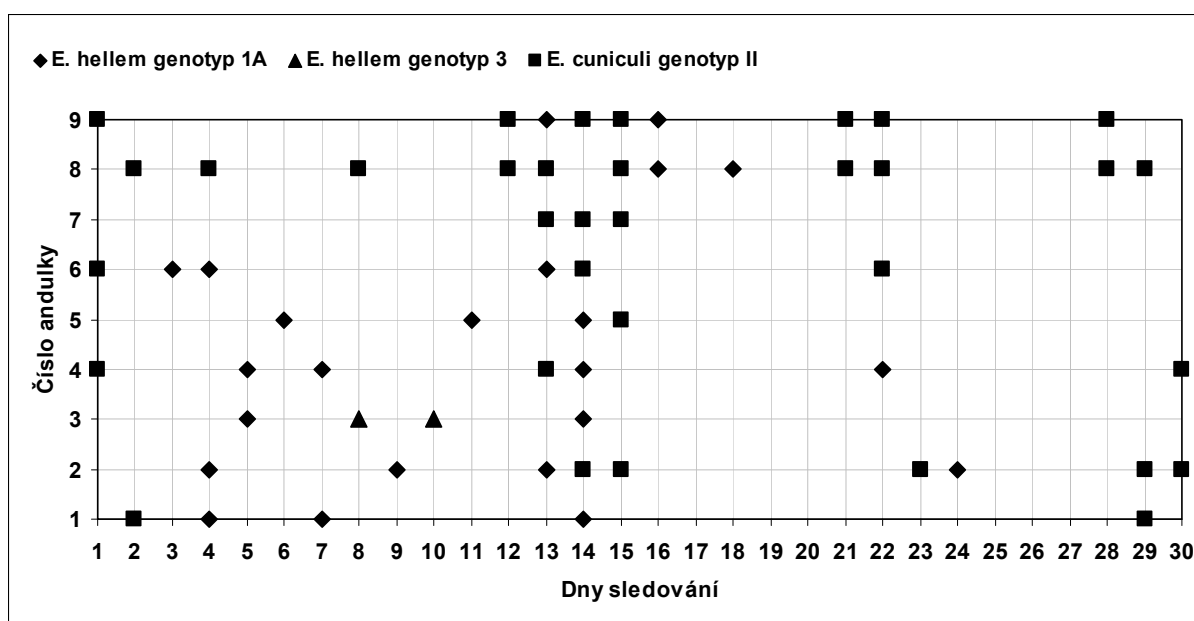
Druh mikrosporidie	Genotyp	Počet vzorků	Prevalence genotypu [%]	Číslo sekvence v GenBank
<i>E. hellem</i>	1A	15	4,5	AF338367
	3	1	0,3	AF110328
<i>E. cuniculi</i>	I (rabbit)	8	2,4	-
	II (murine)	27	8,0	-
	III (dog)	2	0,6	EU001242
<i>E. bieneusi</i>	genotyp A	26	7,7	DQ683750
	genotyp F	32	9,5	AF135833

4.3. Sledování vylučování spór mikrosporidií

4.3.1. Dynamika vylučování spór mikrosporidií v trusu andulek vlnkovaných

Během 30 denního sledování 9 andulek vlnkovaných bylo odebráno a vyšetřeno 240 individuálních vzorků trusu. Mikroskopicky byly spóry mikrosporidií detekovány v 10 případech (2,4 %) u šesti různých ptáků. PCR byly mikrosporidie zachyceny v 59 vzorcích (24,6 %) u všech 9 ptáků. Všechny mikroskopicky pozitivní vzorky byly zároveň pozitivní za pomoci PCR. Všech 9 sledovaných jedinců andulky vlnkované vylučovalo spóry přerušovaně v nepravidelných intervalech, jak lze vyčíst z grafu 1. Andulky č. 3 a 5 byly 15. den sledování usmrceny a vypitvány.

Graf 1: Sledování vylučování mikrosporidií 9 andulkami vlnkovanými.



4.3.3. Vyhodnocení sekvencí

Během sledovacího období byly detekovány 2 druhy mikrosporidií. *Encephalitozoon hellem* genotypu 1A a 3 a *E. cuniculi* genotypu II. U 7 jedinců andulky se jednalo o smíšenou infekci *E. hellem* genotypu 1A a *E. cuniculi* genotypu II (andulky č. 1, 2, 4, 5, 6, 8 a 9), u jednoho jedince o smíšenou infekci *E. hellem* genotypu 1A a genotypu 3 (andulka č. 3) a u jednoho jedince byl detekován pouze *E. cuniculi* genotypu II (andulka č. 7) (viz Graf 1).

4.3.2. PCR z tkání andulek vlnkovaných

Tkáně 4 jedinců andulky vlnkované (konkrétně tenké střevo, slepé střevo, tlusté střevo, ledviny, játra a plíce) byly vyšetřeny na přítomnost mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* pomocí PCR. Výsledky vyšetření jsou pro přehlednost znázorněny v tabulce 10.

Andulky během sledovacího období nejevily žádné klinické příznaky onemocnění a během pitvy nebyly na orgánech pozorovány žádné patologické změny.

Tab. 10: Výsledky vyšetření orgánů 4 andulek na rod *Encephalitozoon* pomocí PCR.

	andulka č. 2	andulka č. 3	andulka č. 5	andulka č. 8
tenké střevo	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
slepé střevo	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní
tlusté střevo	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní
ledviny	negativní	negativní	pozitivní	pozitivní
játra	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
plíce	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní

4.3.4. Histologické zpracování a TEM

Histologickému vyšetření byly podrobeny tkáně 4 andulek vlnkovaných, konkrétně tenké střevo, slepé střevo, tlusté střevo, ledviny; játra a plíce. Nebyly pozorovány žádné patologické změny ani na jednom z odebraných orgánů. Histologické řezy byly barveny chromotropem podle Webera, Gramovým modifikovaným barvením a pomocí Calcofluoru White M2R, ani jedno barvení však neodhalilo přítomnost spór mikrosporidií. Při prohlížení polotenkých řezů byly nalezeny podezřelé struktury v tenkém a tlustém střevu andulky č. 3 a v játrech a tlustém střevu andulky č. 5. Byly proto zhotoveny ultratenké řezy, kde se však přítomnost spór mikrosporidií neprokázala. Podezřelá struktura v tlustém střevu andulky č. 3 byla v TEM identifikována jako blíže neurčená houbová infekce.

5. Diskuse

Mikrosporidie, jako oportunní paraziti, představují poměrně závažné původce komplikací u imunodeficitních jedinců, zejména AIDS pacientů. Jsou kosmopolitně rozšířené a tvoří odolné spóry, které zůstávají ve vnějším prostředí relativně dlouho infekční. Proto identifikování všech možných zdrojů mikrosporidiové infekce je důležité z hlediska zavedení účinných preventivních opatření.

Ptáci se pravděpodobně podílí na roznášení spór mikrosporidií do vnějšího prostředí, neboť u nich mikrosporidie byly už mnohokrát zaznamenány (Reetz 1993, Tociłowski et al. 1997, Reetz 1999, Reetz et al. 2002, Snowden and Phalen 2004, Haro et al. 2005, Haro et al. 2006, Lobo et al. 2006, Slodkiewicz-Kowalska et al. 2006, Graczyk et al. 2007, Kašičková et al. 2007, Bart et al. 2008, Müller et al. 2008). Spektrum ptačích hostitelů se stále rozrůstá. Pouze v rámci této práce jsem zachytila 73 nových ptačích hostitelů z 9 různých řádů. Ve vyšetřených vzorcích trusu exotických ptáků jsem detekovala 3 druhy mikrosporidií, které jsou schopny infikovat člověka, a to v celkové prevalenci 44,1 % (148 z 336). To je zatím u ptáků nejvyšší zaznamenaná prevalence mikrosporidií. Ve Španělsku byly u holubů mikrosporidie diagnostikovány v 29 % (Haro et al. 2005), v Portugalsku u holubů a exotických ptáků v 28,9 % (Lobo et al. 2006), v USA u agapornisů v 25 % (Barton et al. 2003) a u kolibříků v 19 % (Snowden et al. 2001), v Holandsku u holubů v 11 % (Bart et al. 2008) a v Polsku u ptáků volně žijících, chovaných v zajetí a hospodářsky chovaných v 3,7 % (Slodkiewicz-Kowalska et al. 2006). Nejprekvapivější bylo zachycení druhu *E. cuniculi* v poměrně vysoké prevalenci (11,6 %). Tento druh byl u ptáků dosud detekován jen u holubů domácích v 1,8 % prevalenci (Bart et al. 2008), kura domácího (Reetz 1993), u 40 % kuřecích embryí (Reetz 1999) a korely chocholaté (Kašičková et al. 2007). Nejčastějším druhem mikrosporidie detekované u ptáků je bezesporu *E. hellem* a ptáci jsou považováni za primárního hostitele této mikrosporidie. Proto jsem očekávala, že *E. hellem* bude také nejčastější mikrosporidií v mnou vyšetřovaných vzorcích. Ve skutečnosti ovšem byla zachycena v pouze 4,5 % a byla naopak nejméně frekventovanou mikrosporidií. Nejčastěji jsem detekovala *E. bieneusi*, a to v 16,4 %. Dále mělo 3,3 % ptáků smíšenou infekci *E. hellem* a *E. bieneusi* a 5,1 % smíšenou infekci *E. cuniculi* a *E. bieneusi*. Ve 2,1 % byly vzorky PCR pozitivní na rod *Encephalitozoon* a v 1,2 % byly vzorky pozitivní zároveň na rod *Encephalitozoon* i na *E. bieneusi*. Smíšené infekce jsem byla schopna rozpoznat pouze v kombinaci s druhem

E. bienersi, protože jsem pro něj měla druhově specifické primery. V případě použití primerů specifických pro rod *Encephalitozoon* se pravděpodobně namnoží nejvíce DNA toho druhu, který je v daném vzorku v převaze a následnou sekvenací tedy nebylo možné identifikovat smíšené infekce. Na základě výsledků sledování andulek vlnkovaných byla vyvinuta RFLP metoda, která by mohla v budoucnu sloužit k odhalení smíšených infekcí různými druhy mikrosporidií rodu *Encephalitozoon*. Druh *E. intestinalis* jsem nezachytila ani v jednom z vyšetřovaných vzorků, přestože již byl u ptáků detekován (Haro et al. 2005, Slodkovicz-Kowalska et al. 2006, Bart et al. 2008). Bylo to ovšem pouze ve třech případech u volně žijících ptáků a vždy ve velmi nízkých prevalencích. Podobné prevalence mikrosporidií byly zjištěny i ve Španělsku u holubů, kde nejčastější mikrosporidií byl také *E. bienersi* (9,7 %), dále *E. intestinalis* (4 %), *E. hellem* (0,8 %) a smíšené infekce *E. bienersi* a *E. hellem* (4,8 %), *E. bienersi* s *E. intestinalis* (0,8 %) a *E. hellem* s *E. intestinalis* (0,8 %) (Haro et al. 2005). Také v Holandsku byl u holubů *E. bienersi* jako nejčastější druh identifikován v 5,4 %, *E. hellem* v 3,3 %, *E. cuniculi* v 1,8 % a *E. intestinalis* v 0,3 % (Bart et al. 2008). Obě tyto studie se zaměřovaly na městské holuby domácí, kteří jsou v blízkém kontaktu s člověkem a u kterých je *E. bienersi* také nejčastějším druhem mikrosporidie.

Žádný z vyšetřovaných ptáků neměl zdravotní potíže kromě 4 jedinců různých druhů ptáků. Z nich byli na mikrosporidie pozitivní 2 ptáci, konkrétně jeřáb rajský na rod *Encephalitozoon* a uhynulý agapornis Fischerův na *E. hellem*. Klinické příznaky mikrosporidie jsou typicky nespecifické a většinou jsou pozorovány u mladých ptáků. Během 1 až 3 dnů nastává smrt (Novilla and Kwapien 1978, Black et al. 1997, Carlisle et al. 2002). U dospělých ptáků infekce probíhají většinou asymptomaticky (Snowden et al. 2000, Snowden et al. 2001, Haro et al. 2005) a k rozvoji klinických příznaků dochází, pokud má pták oslabenou imunitu (Black et al. 1997, Carlisle et al. 2002, Müller et al. 2008). Jeřáb rajský měl zraněné křídlo a byla mu podávána antibiotika, ale nebyly pozorovány žádné příznaky onemocnění. Jaký zdravotní stav předcházel uhynutí agapornise Fischerova se bohužel nepodařilo zjistit.

Sekvenací pozitivních vzorků bylo možné rozčlenit tři detekované druhy mikrosporidií do sedmi ITS genotypů. Genotyp 1A (4,5 %) *E. hellem* jednoznačně převažoval nad genotypem 3 (0,3 %), což je v souladu s literárními údaji. U ptáků byl zatím zachycen pouze *E. hellem* genotypu 1 (Suter et al. 1998, Snowden et al. 2000, Snowden et al. 2001, Haro et al. 2005). Při vyšetřování trusu holubů v několika městských parcích ve Španělsku byl u jednoho z *E. hellem*-pozitivních vzorků určen genotyp 1A,

který byl rovněž izolován z pacienta ze Španělska (Xiao et al. 2001a), což podporuje zoonotický potenciál této mikrosporidie (Haro et al. 2005). *Encephalitozoon hellem* genotypu 3 byl identifikován u HIV-pozitivního pacienta ze Švýcarska (Mathis et al. 1999) a nyní jsem tento genotyp poprvé našla u ptáků. Oba mnou zaznamenané genotypy *E. hellem* by tedy mohly být potenciálně infekční pro člověka, jestli však k takovému přenosu dochází je však stále nejasné. V případě *E. cuniculi* byly zachyceny všechny tři ITS genotypy. Nejčastější byl genotyp II (8 %), dále genotyp I (2,4 %) a nejméně genotyp III (0,6 %). Jediná doposud známá sekvence *E. cuniculi* z ptáků (korely chocholaté) patří do psího genotypu III (Kašičková et al. 2007). Genotyp III byl zaznamenán u lidí stejně jako genotyp I (králíci) (Deplazes et al. 1996, Didier et al. 1996a, Rinder et al. 1998, Rossi et al. 1998, Snowden et al. 1999, Tosoni et al. 2002). Je nepravděpodobné, že by *E. cuniculi* byl přirozený patogen člověka a jeho zoonotický původ je zřejmý. Jednotlivé genotypy *E. cuniculi* mají rozdílnou hostitelskou preferenci. Genotyp II (myši) byl identifikován v hlodavcích a liškách polárních. Všechny izoláty *E. cuniculi* z králíků byly doposud charakterizovány jako genotyp I (králíci) a všechny izoláty ze psů jako genotyp III (psí) (Mathis et al. 2005). Identifikování *E. cuniculi* u exotických ptáků rozšiřuje hostitelské spektrum této mikrosporidie. Pasáž spór trávicím traktem považuji za nepravděpodobnou zejména u ptáků chovaných ve vnitřních voliérách či v domácnosti, neboť ptáci jsou krmeni komerčním krmivem, kde kontaminaci mikrosporidiovými spórami nepředpokládám (na základě průkazu infekce ve tkáních andulek, viz níže) a nejsou v kontaktu s jinými zvířaty zejména hlodavci, jejichž genotyp II byl u ptáků nejčastěji. Nabízí se ještě opačná úvaha, spóry *E. cuniculi* v kontaminovaném komerčním krmivu hlodavčím trusem při jeho skladování před balením nebo přípravou krmných směsí by mohla být zdrojem infekce a přispívat k častějšímu zastoupení *E. cuniculi* genotypu II.

U *E. bienersi* bylo popsáno mnoho genotypů založených na jemných rozdílech v ITS sekvenci. V této práci byly detekovány pouze 2 genotypy, A a F. Genotyp A byl doposud nalezen pouze u lidí (Rinder et al. 1997, Leelayoova et al. 2005, Breton et al. 2007, Espern et al. 2007) a nyní jsem ho zachytila i u ptáků, a to v poměrně vysoké prevalenci (7,7 %). Druhým zaznamenaným byl genotyp F v prevalenci o něco vyšší než genotyp A (9,5 %). Genotyp F, původně izolovaný z prasat, byl identifikován nejen u prasat, ale také u skotu (Breitenmoser et al. 1999, Rinder et al. 2000, Dengjel et al. 2001, Sak et al. 2008). V ptácích byly zatím detekovány genotypy D, J, Peru-6 nebo genotypy podobné Peru-6 a několik nových doposud nepopsaných genotypů (Reetz et al. 2002, Haro et al. 2005, Haro et al. 2006, Lobo et al. 2006, Müller et al. 2008). Ani jeden z mnou detekovaných

genotypů nebyl ještě u ptáků zaznamenán. Nynější nález genotypu A u ptáků naznačuje, že by zde mohlo docházet k přenosu *E. bienersi* mezi lidmi a ptáky.

Sledované andulky vlnkované nevykazovaly žádné příznaky onemocnění a všechny vylučovaly spóry *E. hellem* a/nebo *E. cuniculi* přerušovaně v nepravidelných intervalech, což svědčí o dlouhodobé chronické infekci. Smíšené infekce u andulek mohly být způsobeny tím, že andulky pocházely z jednoho zverimexu, kde byly chovány ve společné voliéře a mohlo tak dojít k přenosu infekce mezi jednotlivými ptáky. Během pitvy 4 jedinců andulky vlnkované nebyly nalezeny žádné patologické změny na orgánech. PCR detekovala mikrosporidiovou DNA rodu *Encephalitozoon* v tenkém střevu, játrech a plicích všech 4 andulek, jeden jedinec (č. 5) měl negativní slepé střevo, další (č. 2) měl negativní ledviny, třetí (č. 3) měl negativní ledviny a tlusté střevo. Poslední vypitvaný jedinec andulky (č. 8) měl pozitivní všechny vyšetřované orgány a zároveň během sledovacího období nejvíce vylučoval spóry (12 ze 30 dnů), což by mohlo značit, že u něj byla infekce intenzivnější než u jedince (č. 2) s negativními ledvinami (9 ze 30 dnů). Srovnání se zbylými 2 andulkami (č. 3 a 5) je problematické, neboť byly vypitvány již 15 den sledování. Výše zmíněné orgány byly podrobeny také histologickému vyšetření. Řezy byly barveny 3 druhy barvení, ani jedno však nepomohlo odhalit přítomnost mikrosporidiových spór. V polotných řezech tenkého a tlustého střeva andulky č. 3 a jater a tlustého střeva andulky č. 5 byly nalezeny podezřelé struktury. Následná transmisní elektronová mikroskopie mikrosporidiovou infekci nepotvrdila, byly ovšem nalezeny útvary, které značí houbovou infekci blíže neurčeným organismem. To, že se nepodařilo prokázat mikrosporidiovou infekci v orgánech infikovaných ptáků histologickým vyšetřením přisuzují slabé infekci (malé procento infikovaných buněk) a dobrému imunitnímu stavu hostitelů. Podobně se nepodařilo prokázat mikrosporidiovou infekci v tkáních uhynulých sokolů za pomoci několika různých barvení i přestože byly na orgánech viditelné žlutavé léze a mikrosporidiová infekce byla následně potvrzena imunohistochemicky (Müller et al. 2008).

V případech, kdy nejsou k dispozici histologická vyšetření, výsledky experimentálního přenosu infekce nebo mikroskopický průkaz parazita v trusu a nálezy infekcí jsou podpořeny pouze na základě molekulárních metod, mohou být výsledky nesprávně interpretovány z důvodu pasáže spór zažívacím traktem zvířete. Vzhledem k tomu, že andulky byly zakoupeny již jako pozitivní a i po změně prostředí a krmné diety (krmení a napájení z jiného zdroje) byly prokazovány pozitivní nálezy mikrosporidií v trusu, považují pasáž spór trávicím traktem za nepravděpodobnou. Navíc byla pomocí

PCR prokázána přítomnost mikrosporidií ve tkáních infikovaných jedinců. Taktéž případnou kontaminaci komerčně dodávaného krmiva lze vyloučit, neboť prevalence jednotlivých druhů a genotypů mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* se u sledovaných ptáků výrazně lišila.

V případě prevalencí mikrosporidií ptáků vyšetřovaných přímo u chovatelů nebo ve zverimexech považují případnou kontaminaci vzorků za nepravděpodobnou na základě statistické analýzy variance. Bylo prokázáno, že variance v prevalenci je značně vyšší pro interakci faktoru chovatel:druh, než pro samotný faktor chovatel. Pokud by se v jednotlivých případech nejednalo o infekci, dalo by se očekávat, že prevalence jednotlivých druhů u jednotlivých chovatelů budou stejné nebo se budou podobat. Potom by variabilita vysvětlená interakcí chovatel:druh byla nulová, respektive nízká. Variabilita této interakce však byla vysoká a dokonce větší než variabilita prevalencí mezi chovateli. Z těchto výsledků vyplývá, že prevalence jednotlivých druhů mikrosporidií se u různých chovatelů značně lišily a nálezy jsou rozděleny nenáhodně

Záchytnost obou použitých diagnostických metod se výrazně lišila. Mikroskopicky jsem spóry zachytila v 2,4 % a pouze u šesti z devíti andulek, kdežto PCR jsem detekovala mikrosporidie ve 24,6 %, a to u všech devíti ptáků. Všechny mikroskopicky pozitivní vzorky byly zároveň PCR pozitivní. Z tohoto je zřejmé, že pro spolehlivou detekci spór mikrosporidií v trusu je nutné využití citlivější metody jako je například PCR. To podporují i výsledky jiných autorů. Studie, která se zabývala porovnáváním těchto dvou metod uvádí, že mikroskopická detekce spór *E. hellem* v koncentraci 10^4 spór na gram trusu kuřete byla pouze v 50 % pozitivní ve srovnání s PCR detekcí. Spóry *E. hellem* v koncentraci 10^3 spór na gram trusu kuřete byly detekovatelné pouze pomocí PCR (Fayer et al. 2003). V jiné studii byly spóry *E. intestinalis* o různých koncentracích přidávány do lidské stolice. Úspěšnost detekce za pomoci světelné mikroskopie kolísala mezi koncentracemi 10^4 a 10^6 spór na gram stolice, ale spolehlivá byla pouze při koncentraci 10^6 spór na gram stolice. Tak malou koncentraci jako 10^2 spór na gram stolice bylo možno zachytit pouze metodou PCR, a to ve všech zkoumaných vzorcích (Müller et al. 1999).

Zdroje a způsoby přenosu většiny mikrosporidií infikujících člověka jsou stále nejasné. Protože spóry mikrosporidií jsou uvolňovány do vnějšího prostředí se stolicí, močí nebo v respiračních sekretech, možné zdroje infekce mohou představovat osoby nebo zvířata infikovaná mikrosporidii. Mezi nejvíce diskutované způsoby přenosu mikrosporidií patří požití kontaminovaného jídla nebo vody, zoonotický přenos, kontakt s kontaminovanou vodou, inhalace kontaminovaného aerosolu, přenos přes vektory

a vertikální přenos (Bryan and Schwartz 1999, Didier et al. 2004). Ptáci mohou být zdrojem mikrosporidií pro lidi, neboť u nich byly zaznamenány druhy, které infikují člověka. Ovšem jestli k takovému přenosu skutečně dochází doposud potvrzeno nebylo. Za zmínku stojí, že někteří pacienti s oční mikrosporidíózou vlastnili nebo byli v kontaktu s doma chovanými ptáky (Friedberg et al. 1990, Yee et al. 1991). Spojitost mezi kontaktem s kachnami a kurem a rizikem infekce genotypem Peru-1 *E. bienersi* byla nalezena při vyšetřování HIV-pozitivního pacientu ze 2 nemocnic v Peru (Bern et al. 2005). Výsledky studií, provedených převážně na městských holubech, také naznačují, že zde není bariéra, která by bránila přenosu mikrosporidií mezi ptáky a lidmi. Navíc navštěvníky městských parků jsou hlavně děti a staří lidé, kteří patří do rizikové skupiny pro mikrosporidiové infekce (Haro et al. 2005, Lobo et al. 2006, Bart et al. 2008). Velká skupina blízce příbuzných genotypů *E. bienersi* nemá striktní hostitelskou specifitu a jsou často nalézány jak u lidí tak zvířat (Sulaiman et al. 2003b). Například *E. bienersi* genotyp Peru-6 detekovaný v holubech a agapornisovi byl shodný s genotypem získaným z AIDS pacientů z Peru (Lobo et al. 2006). Nově byl v 6 analyzovaných vzorcích ze sokolů popsán genotyp D, který už byl také dříve izolován z člověka, makaka a prasete (Müller et al. 2008). Také výzkum provedený v Polsku poukazuje na možnost zoonotického přenosu mikrosporidií. Byly vyšetřovány různé druhy volně žijících, hospodářsky významných i v zajetí chovaných ptáků. Opět byla potvrzena přítomnost lidských druhů mikrosporidií v trusu ptáků. Největší prevalence byla u ptáků vodních, což by mohlo značit možnost přenosu spór mikrosporidií z ptáků na lidi prostřednictvím vody (Slodkiewicz-Kowalska et al. 2006). Další výzkum prokázal, že osoby vystavené 30 minutovému kontaktu s městskými holuby, jako například při čištění povrchů kontaminovaných holubím trusem, mohou inhalovat přibližně $3,5 \times 10^3$ spór *E. bienersi*. Spóry z trusu holubů mohou být rozptýleny v aerosolu, mohou být inhalovány lidmi a mohou také sloužit jako zdroj kontaminace vody (Graczyk et al. 2007). U exotických ptáků chovaných v zajetí jsem prokázala výskyt 3 různých druhů mikrosporidií infikujících člověka a u každého druhu jsem zaznamenala alespoň jeden genotyp dříve zachycený u člověka. Chovatelé jsou s chovaným ptactvem v blízkém kontaktu při péči, krmení a uklízení jejich voliér. Přitom se mohou infikovat inhalací, přímým kontaktem se sliznicí nebo požitím spór rozptýlených v prachu, který vzniká při třepotání křídel nebo při úklidu a zametání voliery. Ptáci chovaní doma jsou navíc často po určitou dobu necháváni volně poletovat po místnosti a mohou tak svým trusem kontaminovat různé povrchy, nábytek, stoly atd., kde může docházet ke zkontaminování jídla. Na mikrosporidie pozitivního ptáka je možné zakoupit jak od

soukromého chovatele tak ze zverimexů, neboť i tam jsem detekovala mikrosporidie. Navíc chovatelé se často schází na různých výstavách exotického ptactva, často si vyměňují ptáky na chov a někdy i na poměrně velké vzdálenosti, zvláště pokud se jedná o vzácnější a cennější druhy. V Polsku byli vyšetřováni volně žijící i v zajetí chovaní ptáci na přítomnost spór mikrosporidií. Prevalence u vodního ptactva byla signifikantně vyšší než prevalence u ostatních ptáků, navíc trus vodního ptactva obsahoval prokazatelně více spór (v průměru $3,6 \times 10^5$ spór/gram) než trus ostatních ptáků (v průměru $4,4 \times 10^4$ spór/gram). Jediná návštěva hejna vodního ptactva může vnést do povrchových vod přibližně $9,1 \times 10^8$ spór mikrosporidií, které jsou schopny infikovat člověka. Vodní ptactvo se obvykle sdružuje ve velkých hejnech a má neomezený přístup k povrchovým vodám včetně rekreačních vod a vod využívaných k produkci pitné vody (Slodkowicz-Kowalska et al. 2006).

Výsledky získané v této studii prokázaly, že mikrosporidie schopné infikovat savece včetně člověka jsou patrně běžně přítomny v malém a pravděpodobně neškodném množství ve tkáních exotických ptáků. K vylučování jejich spór do prostředí však dochází nespojitě, v podstatě zřídka. Tato skutečnost má závažné důsledky pro epidemiologické rozvahy. Skutečné počty infikovaných ptáků jsou jistě mnohem vyšší, než by se dalo usuzovat z koprologických vyšetření. Ptáci mohou významně tyto agens přenášet jednak z přírody do lidských příbytků a jednak na velké vzdálenosti z jedné geografické oblasti do jiné. Exotičtí ptáci jsou předmětem legálního obchodu i pašování a jsou tedy převáženi na velké vzdálenosti a dostávají se nakonec do lidských příbytků. Na druhou stranu, pokud jde o množství spór kontaminujících prostředí, nejsou ptáci jejich významným zdrojem (pokud z nějakého důvodu klinicky onemocní).

Největší riziko představují infikovaní ptáci hlavně pro imunosuprimované lidi jako jsou pacienti s AIDS a pacienti po transplantaci, ovšem cestovatelé, děti, nositelé kontaktních čoček a starší lidé také patří mezi rizikové skupiny. Výsledky mé práce podporují hypotézu, že ptáci mohou sloužit jako zdroje lidské mikrosporidiové infekce.

6. Závěry

1. U exotických ptáků na území České republiky byly zaznamenány 3 druhy mikrosporidií schopné infikovat člověka v poměrně vysoké prevalenci (44,1 %) a bylo identifikováno několik desítek nových ptačích hostitelů.
2. Druh *E. cuniculi* byl překvapivě druhou nejčastější mikrosporidií hned po *E. bienensi*. Ptáci jsou považováni za primárního hostitele druhu *E. hellem*, ten jsem však zaznamenala v nejnižší prevalenci. U všech zachycených druhů jsem detekovala genotypy, které byly rovněž identifikovány u lidí.
3. Sledování vylučování spór mikrosporidií v trusu 9 přirozeně infikovaných andulek vlnkovaných pomocí molekulárních metod odhalilo jejich inaparentní infekci a nepravidelné vylučování spór. Mikrosporidie byly identifikovány v orgánech infikovaných andulek pomocí molekulárních metod. Histologické vyšetření ani TEM však mikrosporidie v tkáních nepotvrdila, zřejmě kvůli nízkému procentu infikovaných buněk.
4. Vlastní nálezy i literární údaje podporují hypotézu o významné roli ptáků jako zdrojů infekce mikrosporidií nikoliv z hlediska množství produkovaných spór, ale jejich šíření do blízkosti člověka, a to i na poměrně velké vzdálenosti. Reálné riziko představují zejména exotičtí ptáci chovaní v zajetí, neboť jejich chovatelé jsou s nimi ve velmi úzkém kontaktu.

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala každému, kdo mi jakýmkoliv způsobem pomohl. Zvláštní dík patří mému školiteli za odborné vedení, všem zaměstnancům laboratoře lékařské parazitologie za cenné rady, obrovskou trpělivost a za vytvoření přátelské atmosféry, ale také všem, kteří mi poskytli materiál nebo mi pomohli s jeho sběrem.

7. Literatura

- Achbarou A., Ombrouck C., Gneragbe T., Charlotte F., Renia L., Desportes Livage I., Mazier D., 1996:** Experimental model for human intestinal microsporidiosis in interferon gamma receptor knockout mice infected by *Encephalitozoon intestinalis*. Parasite Immunol. 18: 387-392.
- Bart A., Wentink-Bonnema E.M., Heddema E.R., Buijs J., van Gool T., 2008:** Frequent occurrence of human-associated microsporidia in fecal droppings of urban pigeons in Amsterdam, the Netherlands. Appl. Environ. Microbiol. 74: 7056-7058.
- Barton C.S., Phalen D.N., Snowden K.F., 2003:** Prevalence of microsporidian spores shed by asymptomatic lovebirds: evidence for a potential emerging zoonosis. J. Avian. Med. Surg. 17: 197-202.
- Bern C., Kawai V., Vargas D., Rabke-Verani J., Williamson J., Chavez-Valdez R., Xiao L., Sulaiman I., Vivar A., Ticona E., Navincopa M., Cama V., Moura H., Secor W.E., Visvesvara G., Gilman R.H., 2005:** The epidemiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima, Peru. J. Infect. Dis. 191: 1658-1664.
- Black S.S., Steinohrt L.A., Bertucci D.C., Rogers L.B., Didier E.S., 1997:** *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Vet. Pathol. 34: 189-198.
- Breitenmoser A., Mathis A., Bürgi E., Weber R., Deplazes P., 1999:** High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. Parasitology. 118: 447-453.
- Breton J., Bart-Delabesse E., Biligui S., Carbone A., Seiller X., Okome-Nkoumou M., Nzamba C., Kombila M., Accoceberry I., Thellier M., 2007:** New highly divergent rRNA sequence among biodiverse genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. J. Clin. Microbiol. 45: 2580-2589.
- Brown J. H., Brenn L., 1931:** A method for the differential and gram negative bacteria in tissue sections. Bull. Johns Hopkins Hosp. 48:69.
- Bryan R.T., Schwartz D.A., 1999:** Epidemiology of microsporidiosis. p. 502-516, in Wittner M., Weiss L. (eds.): The microsporidia and microsporidiosis. Am. Soc. Microbiol., Washington DC, 553 pp.
- Carlisle M.S., Snowden K., Gill J., Jones M., O'Donoghue P., Prociv P., 2002:** Microsporidiosis in a Gouldian finch (*Erythrura [Chloebia] gouldiae*). Aust. Vet. J. 80: 41-44.
- Cox J.C., Hamilton R.C., Attwood H.D., 1979:** An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. J. Protozool. 26: 260-265.

- Dengjel B., Zahler M., Hermanns W., Heinritzi K., Spillmann T., Tomschke A., Loscher T., Gothe R., Rinder H., 2001:** Zoonotical potencial of *Enterocytozoon bieneusi*. J. Clin. Microbiol. 39: 4495-4499.
- Deplazes P., Mathis A., Muller C., Weber R., 1996:** Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. J. Eukaryot. Microbiol. 43: 93S.
- Didier E.S., 2005:** Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta Trop. 94: 61-76.
- Didier E.S., Didier P.J., Friedberg D.N., Stenson S.M., Orenstein J.M., Yee R.W., Tio F.O., Davis R.M., Vossbrinck C., Millichamp N., Shadduck J.A., 1991:** Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. J. Infect. Dis. 163: 617-621.
- Didier E.S., Rogers L.B., Orenstein J.M., Baker M.D., Vossbrinck C.R., van Gool T., Hartskeerl R., Soave R., Beaudet L.M., 1996b:** Characterization of three *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. J. Eukaryot. Microbiol. 43: 34-43.
- Didier E.S., Stovall M.E., Green L.C., Brindley P.J., Sestak K., Didier P.J., 2004:** Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Vet. Parasitol. 126: 145-166.
- Didier E.S., Visvesvara G.S., Baker M.D., Rogers L.B., Bertucci D.C., de Groote M.A., Vossbrinck C.R., 1996a:** A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. J. Clin. Microbiol. 34: 2835-2837.
- Didier E.S., Vossbrinck C.R., Baker M.D., Rogers L.B., Bertucci D.C., Shadduck J.C., 1995:** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology. 111: 411-421.
- Ergens R., Lom J., 1970:** Původci parazitálních nemocí ryb. Praha, Academia 1970: 383 pp.
- Esporn A., Morio F., Miegville M., Illa H., Abdoulaye M., Meyssonier V., Adehossi E., Lejeune A., Cam P.D., Besse B., Gay-Andrieu F., 2007:** Molecular study of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. J. Clin. Microbiol. 45: 2999-3002.
- Fayer R., Santin M., Palmer R., 2003:** Comparison of microscopy and PCR for detection of three species of *Encephalitozoon* in feces. J. Eukaryot. Microbiol. 50 (Suppl.): 572-573.
- Fischer W.M., Palmer J.D., 2005:** Evidence from small-subunit ribosomal RNA sequences for a fungal origin of microsporidia. Mol. Phylog. Evol. 36: 606-622.

- Friedberg D.N., Stenson S.M., Orenstein J.M., Tierno P.M., Charles N.C., 1990:** Microsporidial keratoconjunctivitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 108: 504-508.
- Gill E.E., Fast N.M., 2006:** Assessing the microsporidia-fungi relationship: Combined phylogenetic analysis of eight genes. *Gene.* 375: 103-109.
- Graczyk T.K., Sunderland D., Rule A.M., da Silva A.J., Moura I.N.S., Tamang L., Girouard A.S., Schwab K.J., Breyse P.N., 2007:** Urban feral pigeons (*Columba livia*) as a source for air- and waterborne contamination with *Enterocytozoon bieneusi* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4357-4358.
- Gray M.L., Puette M., Latimer K.S., 1998:** Microsporidiosis in a young ostrich (*Struthio camelus*). *Avian Dis.* 42: 832-836.
- Haro M., del Águila C., Fenoy S., Henriques-Gil N., 2003.:** Intraspecies genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4166-4171.
- Haro M., Henriques-Gil N., Fenoy S., Izquierdo F., Alonso F., del Águila C., 2006:** Detection and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in pigeons. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: S58-S60.
- Haro M., Izquierdo F., Henriques-Gil N., Andrés I., Alonso F., Fenoy S., del Águila C., 2005:** First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3153-3157.
- Kašičková D., 2007:** Mikrosporidiové infekce ptáků: prevalence u volně žijících, synantropních a v zajetí chovaných druhů. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta, 48 pp.
- Kašičková D., Sak B., Kváč M., Ditrich O., 2007:** Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host-cockateel (*Nymphicus hollandicus*) using molecular methods. *Parasitol. Res.* 101: 1685-1688.
- Katzwinkel-Wladarsch S., Lieb M., Heise W., Löscher T., Rinder H., 1996:** Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health.* 1: 373-378.
- Keeling P.J., 2003:** Congruent evidence from α -tubulin and β -tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genet. Biol.* 38: 298-309.
- Keeling P.J., Fast N.M., 2002:** Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Ann. Rev. Microbiol.* 56: 93-116.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G., 2007:** ClustalW2 and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lee S.C., Corradi N., Byrnes E.J. 3rd, Torres-Martinez S., Dietrich F.S., Keeling P.J., Heitman J., 2008:** Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr. Biol.* 18: 1675-1679.

- Leelayoova S., Subrungruang I., Rangsin R., Chavalitshewinkoon-Petmitr P., Worapong J., Naaglor T., Mungthin M., 2005:** Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* genotype a in a Thai orphanage. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73: 104-107.
- Leelayoova S., Subrungruang I., Suputtamongkol Y., Worapong J., Petmitr P.C., Mungthin M., 2006:** Identification of genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* from stool samples from human immunodeficiency virus-infected patients in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3001-3004.
- Liguory O., Fournier S., Sarfati C., Derouin F., Molina J.M., 2000:** Genetic homology among thirteen *Encephalitozoon intestinalis* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected patients with intestinal microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2389-2391.
- Lobo M.L., Xiao L., Cama V., Magalhães N., Antunes F., Matos O., 2006:** Identification of potentially human pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in various birds. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7380-7382.
- Mathis A., Tanner I., Weber R., Deplazes P., 1999:** Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *Int. J. Parasitol.* 29: 767-770.
- Mathis A., Weber R., Deplazes P., 2005:** Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 423-445.
- Müller A., Stellermann K., Hartmann P., Schrappe M., Fätkenheuer G., Salzberger B., Diehl V., Franzen C., 1999:** A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6: 243-246.
- Müller M.G., Kinne J., Schuster R.K., Walochnik J., 2008:** Outbreak of microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bieneusi* in falcons. *Vet. Parasitol.* 152: 67-78.
- Novilla M.N., Kwapien R.P., 1978:** Microsporidian infection in the pied peach-faced lovebird (*Agapornis roseicollis*). *Avian Dis.* 22: 198-204.
- Peer Y.V., Ali A.B., Meyer A., 2000:** Microsporidia: accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene.* 246: 1-8.
- Peyretailade E., Broussolle V., Peyret P., Méténier G., Gouy M., Vivares C.P., 1998:** Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Mol. Biol. Evol.* 15: 683-689.
- Phalen D.N., Logan K.S., Snowden K.F., 2006:** *Encephalitozoon hellem* infection as the cause of a unilateral chronic keratoconjunctivitis in an umbrella cockatoo (*Cacatua alba*). *Vet. Ophthalmol.* 9: 59-63.
- Poonacha K.B., William P.D., Stamper R.D., 1985:** Encephalitozoonosis in a parrot. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186: 700-702.

- Pulparampil N., Graham D., Phalen D., Snowden K., 1998:** *Encephalitozoon hellem* in two eclectus parrots (*Eclectus roratus*): identification from archival tissues. J. Euk. Microbiol. 45: 651-655.
- R Development Core Team, 2008:** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Reetz J., 1993:** Naturally-acquired microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) infections in hens. Tierarztl. Prax. 21: 429-435.
- Reetz J., 1999:** Natural transmission of microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) by way of the chicken egg. Tierarztl. Prax. 22: 147-150.
- Reetz J., Rinder H., Thomschke A., Manke H., Schwebs M., Bruderek A., 2002:** First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). Int. J. Parasitol. 32: 785-787.
- Rinder H., Katzwinkel-Wladarsch S., Löscher T., 1997:** Evidence for the existence of genetically distinct strains of *Enterocytozoon bieneusi*. Parasitol. Res. 83: 670-672.
- Rinder H., Katzwinkel-Wladarsch S., Thomschke A., Löscher T., 1998:** Strain differentiation in microsporidia. Tokai J. Exp. Clin. Med. 23: 433-437.
- Rinder H., Thomschke A., Dengjel B., Gothe R., Löscher T., Zahler M., 2000:** Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. J. Parasitol. 86: 185-188.
- Rossi P., la Rosa G., Ludovisi A., Tamburrini A., Gomez Morales M.A., Pozio E., 1998:** Identification of human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. Int. J. Parasitol. 28: 1361-1366.
- Sak B., Kváč M., Hanzlíková D., Cama V., 2008:** First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. Vet. Parasitol. 153: 220-224.
- Saková K., Sak B., Ditrich O., Kváč M., 2006:** Humoral response of chicken infected with the microsporidium *Encephalitozoon hellem*. Parasitol. Res. 98: 488-492.
- Ślodka-Kowalska A., Graczyk T.K., Tamang L., Jedrzejewski S., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A.S., Majewska A.C., 2006:** Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: implications for transmission via water? Appl. Environ. Microbiol. 72: 4540-4544.
- Snowden K., Daft B., Nordhausen R.W., 2001:** Morphological and molecular characterization of *Encephalitozoon hellem* in hummingbirds. Avian Pathol. 30: 251-255.
- Snowden K., Logan K., 1999:** Molecular identification of *Encephalitozoon hellem* in an ostrich. Avian Dis. 43: 779-782.
- Snowden K., Logan K., Didier E.S., 1999:** *Encephalitozoon cuniculi* strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. J. Infect. Dis. 180: 2086-2088.

- Snowden K., Logan K., Phalen D.N., 2000:** Isolation and characterization of an avian isolate of *Encephalitozoon hellem*. Parasitology. 121: 9-14.
- Snowden K., Phalen D.N., 2004:** *Encephalitozoon* infection in birds. Sem. Avian Exotic Pet Med. 13: 94-99.
- Sulaiman I.M., Bern C., Gilman R., Cama V., Kawai V., Vargas D., Ticona E., Vivar A., Xiao L., 2003a:** A molecular biologic study of *Enterocytozoon bieneusi* in HIV-infected patients in Lima, Peru. J. Eukaryot. Microbiol. 50: S591-596.
- Sulaiman I.M., Fayer R., Lal A.A., Trout J.M., Schaefer F.W. 3rd, Xiao L., 2003b:** Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4495-4501.
- Suter C., Mathis A., Hoop R., Deplazes P., 1998:** *Encephalitozoon hellem* infection in a yellow-streaked lory (*Chalcopsitta scintillata*) imported from Indonesia. Vet. Rec. 143: 694-695.
- Thomarat F., Vivarès Ch.P., Gouy M., 2004:** Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. J. Mol. Evol. 59: 780-791.
- Thurston-Enriquez J.A., Watt P., Dowd S.E., Enriquez R., Pepper I.L., Gerba CH.P., 2002:** Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. J. Food Protect. 65: 378-382.
- Tocidlowski M.E., Cornish T.E., Loomis M.R., Stoskopf M.K., 1997:** Mortality in captive wild-caught horned puffin chicks (*Fratercula corniculata*). J. Zoo. Wildl. Med. 28: 298-306.
- Tosoni A., Nebuloni M., Ferri A., Bonetto S., Antinori S., Scaglia M., Xiao L., Moura H., Visvesvara G.S., Vago L., Costanzi G., 2002:** Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* III (dog type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study. Mod. Pathol. 15:577-583.
- Vávra J., 1976:** The structure of microsporidia. Bulla L.A., Cheng, T.C. (eds.): Comparative Pathobiology. Vol. 1. Biology of the microsporidia. Plenum Press, N.Y., London, pp. 1-86.
- Vávra J., Chalupský J., 1982:** Fluorescence staining of microsporidian spores with the brightener "Calcofluor White M2R". J. Protozool. 29 (Suppl.): 503.
- Vávra J., Larsson J.I.R., 1999:** Structure of the microsporidia, p. 7-84, Wittner M., Weiss L. (eds.): The microsporidia and microsporidiosis. Am. Soc. Microbiol., Washington DC, 553 pp.
- Waller R.F., Jabbour C., Chan N.C., Celik N., Likic V.A., Mulhern T.D., Lithgow T., 2008:** Evidence of a reduced and modified mitochondrial protein import apparatus in microsporidian mitosomes. Eukaryot. Cell. in press.

- Weber R., Bryan R.T., Owen R.L., Wilcox C.M., Gorelkin L., Visvesvara G.S., 1992:** Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N. Engl. J. Med.* 326: 161-166.
- Weiss L.M., 2003:** IWOP-8. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50 (Suppl.): 566-568.
- Williams B.A.P., Hirt R.P., Lucocq J.M., Embley T.M., 2002:** A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature.* 418: 865-869.
- Wittner M., 1999:** Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. p. 1-6, in Wittner M., Weiss L. (eds.): *The microsporidia and microsporidiosis.* Am. Soc. Microbiol., Washington DC, 553 pp.
- Xiao L., Li L., Moura H., Sulaiman I., Lal A.A., Gatti S., Scaglia M., Didier E.S., Visvesvara G.S., 2001a:** Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2191-2196.
- Xiao L., Li L., Visvesvara G.S., Moura H., Didier E.S., Lal A.A., 2001b:** Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2248-2253.
- Yee R.W., Tio F.O., Martinez J.A., Held K.S., Shaddock J.A., Didier E.S., 1991:** Resolution of microsporidial epithelial keratopathy in a patient with AIDS. *Ophthalmology.* 98: 196-201.