

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vnímavost vybraných hostitelů k infekci *Cryptosporidium avium*

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

Školitel specialista: Ing. Nikola Holubová

Autor bakalářské práce: Zuzana Reifová

České Budějovice, 2016

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: „**Vnímavost vybraných hostitelů k infekci *Cryptosporidium avium***“ vypracovala na základě vlastních zjištění, poznatků a materiálů uvedených v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 19. 4. 2016

.....  
Zuzana Reifová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Martinu Kváčovi Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Děkuji také mé školitelce specialistece, Ing. Nikole Holubové, za pomoc při práci se zvířaty, laboratorními vyšetřeními a především za předání rad a zkušeností. Dále děkuji všem pracovníkům laboratoře Veterinární a humánní protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za ochotnou pomoc při práci v laboratoři a jejich přátelské jednání.

Tato práce vznikala za finanční podpory grantového projektu GAČR 15-01090S.

## **Abstrakt**

Byly provedeny experimentální infekce *Cryptosporidium avium* u třech různých druhů ptáků (kur domácí, bažant obecný a kachna domácí) rozdělených do 3 věkových kategorií (1-denní, 21-denní a dospělí ptáci). Ptáci byli per orálně infikováni dávkou 380 tis. oocyst v 1 ml. Vzorky trusu byly odebírány denně po dobu 30 dnů pro mikroskopické a molekulární vyšetření. Zatímco všechny věkové kategorie bažanta obecného (*Phasianus colchicus*) byly nevnímavé k infekci *C. avium*, u všech věkových kategorií kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*) a kachny domácí (*Anas platyrhynchos f. domestica*) byla prokázána vnímavost k *C. avium*. Prepatentní perioda u kura domácího se pohybovala v rozmezí 9 – 11 dnů v závislosti na věkové kategorii a u kachny domácí 4 – 6 dnů. Patentní doba u obou druhů vnímavých hostitelů byla delší než 30 dnů. Na základě výsledků experimentálních infekcí je kachna domácí a kur domácí vhodným modelovým hostitelem *Cryptosporidium avium*.

**Klíčová slova:** *Cryptosporidium avium*; experimentální infekce; věková specifita; vnímavost

## **Abstract**

Experimental infections with *Cryptosporidium avium* were carried in three different species of birds (chicken, duck and pheasant) divided into three age categories (1-day-old, 21-day-old and adult). The birds were infected perorally using intragastric gavage with a dose of 380 thousand of oocysts in 1 ml. Faecal samples were collected daily for 30 days for a microscopic and molecular examination. While all age categories of pheasant (*Phasianus colchicus*) were not susceptible to *C. avium* infection, all age groups of domestic fowl (*Gallus gallus f. domestica*) and white ducks (*Anas platyrhynchos f. domestica*) were susceptible. Prepatent period in domestic fowl ranged from 9 to 11 days depending on the age category, in white ducks from 4 to 6 days. Patent period for both susceptible host species was longer than 30 days. Based on the results of experimental infections domestic fowl and white duck are proposed as a suitable model hosts for *Cryptosporidium avium*.

**Keywords:** *Cryptosporidium avium*; experimental infection; age-related susceptibility

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>8</b>
2.1	Historie .....	8
2.2	Taxonomie.....	8
2.3	Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků .....	9
2.4	Druhy a genotypy infikující ptáky.....	9
2.4.1	<i>Cryptosporidium meleagridis</i> .....	9
2.4.2	<i>Cryptosporidium baileyi</i> .....	11
2.4.3	<i>Cryptosporidium galli</i> .....	12
2.4.4	<i>Cryptosporidium avium</i> .....	13
2.4.5	Ostatní ptačí genotypy .....	14
<b>3</b>	<b>Cíle práce.....</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>Materiál a metodika.....</b>	<b>17</b>
4.1	Materiál .....	17
4.1.1	Paraziti .....	17
4.1.2	Experimentální zvířata.....	17
4.1.3	Chov zvířat.....	17
4.2	Metodika.....	18
4.2.1	Purifikace oocyst.....	18
4.2.2	Barvení oocyst .....	19
4.2.3	Morfologie oocyst <i>Cryptosporidium avium</i> .....	19
4.2.4	Ověření životaschopnosti oocyst .....	20
4.2.5	Design experimentálních infekcí .....	20
4.2.6	Hodnocení intenzity infekce .....	21
4.2.7	Izolace DNA .....	21

4.2.8	Genotypizace izolátů <i>Cryptosporidium avium</i> .....	22
4.2.9	Gelová elektroforéza.....	23
4.2.10	Sekvenace vzorků .....	24
4.2.11	Fylogenetická analýza.....	24
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>25</b>
5.1	Mikroskopické a molekulární vyšetření experimentálních zvířat ....	25
5.2	Hostitelská specifita <i>Cryptosporidium avium</i> .....	26
5.3	Věková specifita .....	26
5.4	Intenzita infekce .....	27
5.5	Klinické příznaky .....	28
5.6	Morfologie oocyst <i>Cryptosporidium avium</i> .....	29
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>30</b>
<b>7</b>	<b>Závěry .....</b>	<b>32</b>
<b>8</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>33</b>

## 1 Úvod

Již před více než sto lety Tyzzer popsal první druh kryptosporidií; *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). Od té doby bylo popsáno mnoho druhů a genotypů rodu *Cryptosporidium* infikujících široké spektrum hostitelů zahrnujících ryby, obojživelníky, plazy, ptáky a savce včetně člověka (O' Donghue 1995, Ziegler a kol. 2007). Studií, které se snaží tyto protozoální parazity detailně prozkoumat a popsat, stále přibývá.

Zatímco kryptosporidie savců jsou ve středu zájmu mnoha výzkumných týmů a jsou velmi podrobně prostudovány, u dalších obratlovců včetně ptáků, zůstává výzkum upozaděn.

Přestože třída ptáků je velice rozmanitá a počet druhů ptáků je téměř dvojnásobný v porovnání se savci, za posledních 50 let byly popsány pouze 4 platné druhy ptačích kryptosporidií: *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955), *Cryptosporidium baileyi* (Current a kol. 1986), *Cryptosporidium galli* (Pavlásek 1999, Ryan a kol. 2003b) a *Cryptosporidium avium* (dříve známo jako *Cryptosporidium avian* genotype V; Holubová a kol. 2016). S rozvojem molekulárních metod na konci 20. století došlo k výraznému posunu našich znalostí v rámci diverzity kryptosporidií na základě molekulárních odlišností. Mimo výše uvedených druhů bylo u ptáků popsáno dalších 11 genotypů ptačích kryptosporidií. Nicméně řada z nich byla popsána pouze na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku rRNA (Abe a Iseki 2004, Jellison a kol. 2004, Ng a kol. 2006, Chelladurai a kol. 2016) a u většiny chybí základní informace o jejich biologii. Tento nedostatek se však netýká pouze genotypů, ale i platně popsaných druhů (Holubová a kol. 2016). V řadě případů nebyl podrobně prozkoumán vývojový cyklus, tkáňový tropizmus nebo věková specifita (Slavin 1955, Ryan a kol. 2003b).

Cílem této práce bylo doplnit informace o věkové a hostitelské specifitě *C. avium* a tak přidat další dílek do skládky informací o rozmanitosti kryptosporidií.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Historie

Ernest Edward Tyzzer jako první našel parazita, který infikoval žaludeční epitel laboratorních myší (*Mus musculus*), zdokumentoval jeho vývojový cyklus a popsal toho parazita jako platný druh *C. muris* rodu *Cryptosporidium* (Tyzzer 1907, 1910). V roce 1912 byl Tyzzerem popsán další druh kryptosporidií parazitujících tentokrát v tenkém střevě myší. Tento druh pojmenoval *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912).

V dalších letech až do současnosti byla popsána řada dalších střevních i žaludečních druhů. V současné době je všeobecně uznáváno 30 druhů kryptosporidií (Ryan a kol. 2015, Holubová a kol. 2016, Kváč a kol. 2016).

Do počátku 70. let nebyla kryptosporidiím věnována velká pozornost. To se změnilo roku 1971, kdy byly popsány první případy kryptosporidie skotu s chronickými průjmy (Panciera a kol. 1971, Meutin a kol. 1974). Roku 1976 byly hlášeny první dva případy kryptosporidie u lidí (Meisel a kol. 1976, Nime a kol. 1976).

V roce 1993 v Milwaukee byla popsána masivní kontaminace pitné vody kryptosporidiemi. Kryptosporidiazou bylo postiženo více než 400 000 lidí (MacKenzie a kol. 1994). Široká veřejnost, zdravotní úřady, ekologické a zemědělské skupiny i dodavatelé pitné vody vyjádřili své znepokojení a iniciovali tak řadu studií, které se týkaly hlavně základní biologie rodu *Cryptosporidium* s důrazem na metody detekce oocyst, prevence a léčby kryptosporidie.

### 2.2 Taxonomie

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou jednobuněční epicelulární paraziti patřící do kmene Apicomplexa. Pro zástupce tohoto kmene je charakteristická přítomnost organel tzv. apikálního komplexu, které slouží k infekci hostitelské buňky. Na základě podobnosti vývojového cyklu s kokcidiemi, byly kryptosporidie dlouhou dobu nesprávně řazeny mezi kokcidie (Fayer a kol. 1997). Díky molekulárním analýzám bylo potvrzeno, že kryptosporidie jsou příbuzné s gregarinami (Carreno a kol. 1999). Zajímavostí je, že na odlišnost kryptosporidií od kokcidií upozornil již



Tyzzer při svém prvním popisu, přestože kryptosporidie ke kokcidiím přiřadil (Tyzzer 1907).

### 2.3 Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků

Ptačí kryptosporidie byly poprvé nalezeny Tyzzerem v roce 1929 ve slepém střevě kuřat. Tyto kryptosporidie však nebyly popsány jako samostatný druh, protože připomínaly již dříve popsány druh *C. muris* u myši (Tyzzer 1907, 1910, 1929). Od té doby byly doposud popsány pouze 4 samostatné druhy kryptosporidií infikující ptáky. Každý z nich infikuje široké spektrum ptačích hostitelů a liší se velikostí oocyst i místem infekce. Mimo tyto probádané druhy existuje mnoho genotypů kryptosporidií infikujících ptáky.

Kryptosporidióza se u ptáků projevuje ve třech orgánových formách: i) onemocnění dýchacího aparátu, ii) střevního aparátu nebo iii) onemocnění ledvin. Obvykle se objevuje jen jedna forma (Fayer a Xiao 2007).

V současné době není účinná léčba nejen pro ptačí, ale obecně žádnou kryptosporidiózu (Lindsay a Blackburn 1990, Ryan a Xiao 2008).

### 2.4 Druhy a genotypy infikující ptáky

#### 2.4.1 *Cryptosporidium meleagridis*

Tento druh je jediným známým druhem infikující ptačí i savčí hostitele a je také odpovědný za přibližně 10 % lidských kryptosporidióz (Wang a kol. 2014).

**Historie:** *Cryptosporidium meleagridis* bylo popsáno v roce 1955 u krůt (*Meleagris gallopavo* f. *domestica*) (Slavin 1955). Jak již bylo zmíněno, v roce 1929 Tyzzer popsal první případ ptačí kryptosporidiózy; řada autorů je přesvědčena, že Tyzzer popsal infekci *C. meleagridis* (Tyzzer 1929), ale s ohledem na velikost oocyst a hostitele, v kterém byla infekce detekována, se lze domnívat, že se mohlo jednat i o infekci vyvolanou druhem *C. galli*.

**Vývojový cyklus:** O vývojovém cyklu *C. meleagridis* je známo velmi málo.

**Morfologie:** Oocysty měří  $5,20 \times 4,60 \mu\text{m}$  a jsou téměř nerozeznatelné od oocyst druhu *C. parvum* (Slavin 1955).

**Hostitelé:** Infekce *C. meleagridis* postihuje mnoho druhů ptačích hostitelů, ale i některé druhy savců včetně člověka.

Přirozená infekce *C. meleagridis* byla zaznamenána u papoušků, pěvců a ptáků hrabavých, měkkozobých a vrubozobých (Morgan a kol. 2000, 2001, Ryan a kol. 2003a, Huber a kol. 2007, Baroudi a kol. 2013, Wang a kol. 2012, 2014, Máca a Pavlásek 2015, Li a kol. 2015).

V České republice byl zaznamenán jediný případ spontánní infekce Orebice rudé (*Alectoris rufa*) z čeledi bažantovitých (Phasianidae) (Máca a Pavlásek 2015).

Experimentální studie prokázaly, že oocysty *C. meleagridis* jsou schopny infikovat brojlerová kuřata, kachny, krůty, telata, prasata, králíky, krysy a myši (O'Donoghue 1995, Akiyoshi a kol. 2003, Darabus a Olariu 2003, Huang a kol. 2003).

**Patogeneze:** Studie, jejímž předmětem byla přirozená infekce 30-denního krocana, prokázala největší přítomnost parazita na epiteliálních buňkách střeva a Fabriciově burze (Tacconi a kol. 2001). U experimentálně infikovaných kuřat byla zjištěna infekce v ileu, céku, kolonu, kloace a Fabriciově burze (Current a kol. 1986, Bermudez a kol. 1988, Lindsay a kol. 1989). U kuřat infikovaných *C. meleagridis* se projevíly změny na střevní sliznici v podobě nepatrného zkrácení střevních klků a nepravidelného povrchu výstelkové vrstvy (Akiyoshi a kol. 2003). Onemocnění způsobené kryptosporidii *C. meleagridis* je doprovázeno průjmami a hubnutím (Slavin 1955, Gharagozlou a kol. 2006).

**Zoonotický potenciál:** *Cryptosporidium meleagridis* je infekční pro člověka, je to třetí nejčastější kryptosporidie u lidí (McLauchlin a kol. 2000, Morgan a kol. 2000, Guyot a kol. 2001, Pedraza-Diaz a kol. 2001, Yagita a kol. 2001, Xiao a kol. 2001, Enemark a kol. 2002, Gatei a kol. 2002, Tiangtip a Jongwutiwes 2002, Cama a kol. 2003, Gatei a kol. 2003, Leoni a kol. 2003, Matos a kol. 2004, Xiao a kol. 2004, Coupe a kol. 2005, Gatei a kol. 2006a,b, Muthusamy a kol. 2006).

*Cryptosporidium meleagridis* infikuje u lidí nejčastěji trávicí soustavu a způsobuje průjmové onemocnění. Ve studii zahrnující molekulární epidemiologii bylo testováno více než 2000 lidí a u 22 (~1%) byla prokázána infekce *C. meleagridis* (Pedraza-Diaz a kol. 2001, Leoni a kol. 2006).

#### 2.4.2 *Cryptosporidium baileyi*

*Cryptosporidium baileyi* je pravděpodobně nejčastější druh ptačích kryptosporidií u ptáků (Fayer a Xiao 2008).

**Historie:** Tento druh byl popsán v roce 1986 poté, kdy ho Current a kol. (1986) vyizolovali z brojlerových kuřat.

**Vývojový cyklus:** Vývojový cyklus *C. baileyi* byl zaznamenán velmi podrobně v publikaci Current a kol. (1986). Pro přirozené infekce *C. baileyi* je charakteristický široký tkáňový tropismus. Infekce tímto druhem byly detekovány ve spojivkách, nosohltanu, průdušnici, vzdušných vacích, tenkém, slepém a tlustém střevě, kloace, Fabriciově burze, ledvinách a močovém aparátu (Lindsay a Blagburn 1990).

V prvních 3 dnech po infekci byla u kuřat většina vývojových stadií pozorována v kyčelníku a tlustém střevě. Už po 4. dni infekce byla většina parazitů na enterocytech kloaky a Fabriciově burze. Po orálním podání infekce byli dospělí meronti prvního typu s 8 merozoity detekováni po 12 hodinách a měřili  $5,00 \times 4,90$   $\mu\text{m}$ . Po 48 hodinách byli pozorováni dospělí meronti druhého typu se 4 merozoity a velké granulární zbytky, měřili  $5,10 \times 5,10$   $\mu\text{m}$ . Po 72 hodinách po podání orální infekce byli zaznamenáni meronti třetího typu s 8 krátkými merozoity o rozměrech  $5,20 \times 5,10$   $\mu\text{m}$ . Mikrogamonti o velikosti  $4,00 \times 4,00$   $\mu\text{m}$ , kteří produkovali přibližně 16 mikrogamet, dali vzniknout mikrogametám o rozměrech  $4,70 \times 4,70$   $\mu\text{m}$ . Z fertilních makrogamet vznikly dva typy oocyst, které sporulovaly v těle hostitele. Většina těchto oocyst byla silnostěnná, o rozměrech  $6,30 \times 5,20$   $\mu\text{m}$ . Oocysty byly odolné a z hostitele byly vylučovány trusem. Druhé, tenkostěnné oocysty, praskaly v těle hostitele a sporozoiti z nich napadaly další enterocyty (Current a kol. 1986).

**Morfologie:** Životoschopné oocysty měří  $6,30 - 5,20$   $\mu\text{m}$ , jsou tedy větší než oocysty *C. meleagridis*.

**Hostitelé:** Přirozená infekce byla popsána u mnoha druhů ptačích hostitelů, mezi které patří racek chechtavý (*Larus ridibundus*), jeřáb popelavý (*Grus grus*), kormoráni (*Phalacrocorax* spp.), tukan bělolící (*Ramphastos vitellinus*), snovač jacksonův (*Ploceus jacksoni*), bulbul šedobřichý (*Pycnonotus cyaniventris*), vlhovec červenohřbetý (*Cacicus haemorrhous*), vlhovec chocholatý (*Psarocolius decumanus*), korela chocholatá (*Nymphicus hollandicus*), amazoňan zelenolící

(*Amazona viridigenalis*), alexandr malý (*Psittacula krameri*), kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*), krocán domácí (*Meleagris gallopavo* f. *domestica*), koroptev polní (*Perdix perdix*), křepelka japonská (*Coturnix japonica*), kachna divoká (*Anas platyrhynchos*), husa domácí (*Anser anser* f. *domestica*) a pštros dvouprstý (*Struthio camelus*) (Lindsay a Blagburn 1990, Pavlásek 1993, Ryan a kol. 2003a, Abe a Iseki 2004, Jellison a kol. 2004, Kimura a kol. 2004, Chvala a kol. 2006). Experimentální infekce prokázaly vnímavost k infekci pro křepelku japonskou (*Coturnix japonica*), kachnu domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*), bažanta obecného (*Phasianus colchicus*) a orebici čukar (*Alectoris chukar*) (Current a kol. 1986, Lindsay a Blagburn 1990, Lindsay a kol. 1987, 1989, Gomez-Couso a kol. 2005).

**Patogeneze:** Vysoká morbidita a mortalita je spojována hlavně s onemocněním dýchacího aparátu (Lindsay a Blackburn 1990). Věková vnímavost k infekci *C. baileyi* byla sledována při experimentální infekci 1- a 9-týdenních kuřat. Prepatentní perioda byla značně kratší u starších kuřat a patentní perioda delší u mladších kuřat. Mladší kuřata vylučovala trojnásobný počet oocyst, než vylučovala kuřata infikovaná v 9. týdnu (Sréter a kol. 1995, 2000).

**Zoonotický potenciál:** *Cryptosporidium baileyi* není infekční pro člověka.

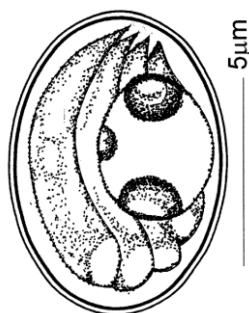
### 2.4.3 *Cryptosporidium galli*

**Historie:** Třetí druh ptačích kryptosporidií byl popsán Pavláskem v roce 1999. Tento druh popsal u kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*) a pojmenoval ho *Cryptosporidium galli* (Pavlásek 1999). Později byl tento druh důkladněji zkoumán a to na základě molekulárních a biologických rozdílů od ostatních druhů kryptosporidií infikujících ptáky (Ryan a kol. 2003b).

**Vývojový cyklus:** O vývojovém cyklu parazita je málo známo, byly pozorovány stadia od oocyst po trofozoity a makrogamonty.

**Morfologie:** Oocysty *C. galli* jsou velmi odlišné od oocyst *C. meleagridis* a *C. baileyi*. Měří  $8,25 \times 6,30 \mu\text{m}$  s indexem tvaru 1,30 (Pavlásek 2001). Kulovité reziduální tělísko oocysty obvykle obsahuje 3 granula. Jedno z těchto tří granul je značně menší ( $0,50 - 0,80 \mu\text{m}$ ) oproti zbylým dvěma ( $1,60 \mu\text{m}$ ), které jsou uloženy v pozici naproti sobě. Reziduální tělísko je obklopeno sporozoity ve tvaru banánu (velikosti přibližně  $12,80 - 14,40 \mu\text{m}$ ) (Obrázek 1).

**Obrázek 1.** Oocysta *Cryptosporidium galli*



**Hostitelé:** Je dokázáno, že *C. galli* může infikovat široké spektrum různých druhů ptačích hostitelů. Přirozená infekce byla zaznamenána u těchto druhů: pěnkava (*Fringilla*), kuře (*Gallus gallus f. domestica*), tetřev hlušec (*Tetrao urogallus*), hýl křivčí (*Pinicola enucleator*), neoféma tyrkysová (*Neophema pulchella*), plameňák růžový (*Phoenicopterus ruber*), kardinál dominikánský (*Paroaria dominicana*) a dvojjoborožec velký (*Buceros rhinoceros*) (Pavlásek 1999, 2001, Ryan a kol. 2003b, Ng a kol. 2006). Dále byly morfologicky podobné oocysty pozorovány u mnoha divokých a exotických ptáků zahrnující bažantovité (Phasianidae), pěvce (Passeriformes) a vlhovcovité (Icteridae) (Ryan a kol. 2003b). Určení přesného okruhu hostitelů bude vyžadovat ještě řadu studií.

**Patogeneze:** Kryptosporidioza způsobená *C. galli* je spojena, dle výzkumu, s klinickými příznaky a vysokou mortalitou (Blagburn a kol. 1990, Morgan a kol. 2001, Pavlásek 1999, 2001).

**Zoonotický potenciál:** *Cryptosporidium galli* není infekční pro člověka.

#### 2.4.4 *Cryptosporidium avium*

*Cryptosporidium avium* byl do roku 2016 znám jako *Cryptosporidium avian* genotyp V (Holubová a kol. 2016).

**Historie:** *Cryptosporidium avium* byl poprvé popsán u korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) v Japonsku (Abe a Makino 2010). Holubová a kol. (2016) tento nový druh morfologicky, geneticky a biologicky odlišili od ostatních druhů kryptosporidií a na základě těchto informací byl uznán jako nový druh.

**Vývojový cyklus:** O vývojovém cyklu není doposud mnoho známo.

**Morfologie:** Oocysty *Cryptosporidium avium* jsou vylučovány plně vysporulované o velikosti 5,30 – 6,90 × 4,30 – 5,50 µm (Holubová a kol. 2016).

**Hostitelé:** Typickým hostitelem parazita je kakariki rudočelý (*Cyanoramphus novozealandiae*). Dalšími hostiteli jsou kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*), agapornis růžohrdlý (*Agapornis roseicollis*), amazoňan modročelý (*Amazona aestiva*), kakadu inka (*Lophochroa leadbeateri*), korela chocholatá (*Nymphicus hollandicus*) a andulka vlnkovaná (*Melopsittacus undulatus*). Experimentálními hostiteli jsou kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*) a andulka vlnkovaná (*Melopsittacus undulatus*).

**Patogeneze:** K místům infekce patří kyčelník a slepé střevo (Holubová a kol. 2016). Curtiss a kol. (2015) zaznamenal infekci v játrech, močovodu a kloace. Onemocnění většinou probíhá bez vnějších příznaků a během pitvy ptáci nevykazují žádné makroskopické známky kryptosporidiózy. Elektronovou mikroskopií byla odhalena přítomnost *C. avium* na mikroklcích kyčelníku a slepého střeva bez známek patologických změn (Holubová a kol. 2016).

Dosud jen jedna studie prokázala klinické příznaky způsobené *C. avium*. Předmětem této studie byl 7 letý kakadu inka (*Lophochroa leadbeateri*). Papoušek byl letargický a jevil známky anorexie. Adspekci byla zjištěna slabá tělesná kondice a výhřez kloaky. Další vyšetření prokázala hyperuricemii a hyperfosfatémii. Byla provedena léčba příznaků, ale papoušek po pár dnech zemřel. Histopatologické vyšetření následně odhalilo chronický zánět ledvin, močovodu a kloaky ve spojení s protozoálním onemocněním a invazivní nádor kloaky. Molekulárními vyšetřeními byla zjištěna přítomnost *C. avium* (Curtiss a kol. 2015, Holubová a kol. 2016).

#### 2.4.5 Ostatní ptačí genotypy

##### ***Cryptosporidium* avian genotyp I–IV, VI**

U různých ptáků bylo identifikováno 5 genotypů ptačích kryptosporidií: *Cryptosporidium* avian genotyp I–IV a VI (Meireles a kol. 2006, Ng a kol. 2006, Chelladurai a kol. 2016).

***Cryptosporidium* avian genotyp I** byl identifikován pouze u kanára červeného (*Serinus canaria*) (Ng a kol. 2006).

***Cryptosporidium* avian genotyp II** byl nalezen u eklektuse různobarevného (*Eclactus roratus*), kakadu růžového (*Eolophus roseicapilla*), korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) a kakadu inka (*Lophochroa leadbeateri*) (Santos a kol. 2005, Meireles a kol. 2006, Ng a kol. 2006, Nakamura a kol. 2009, Sevá a kol. 2011,

Nguyen a kol 2013, Wang a kol. 2014). Na základě fylogenetické analýzy byla zjištěna podobnost *Cryptosporidium* avian genotypu I a II k *C. baileyi*. Experimentální infekcí byla zjištěna slabá infekce *Cryptosporidium* avian genotypu II v epitelu kloaky, konečníku a Fabriciovy burzy u pštrosa dvouprstého (*Struthio camelus*) (Santos a kol. 2005).

***Cryptosporidium* avian genotyp III** byl popsán u kakadu růžového (*Eolophus roseicapilla*), korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) a aratingy sluneční (*Aratinga solstitialis*) ze západní Austrálie (Ng a kol. 2006, Nakamura a kol. 2009, Abe a Makino 2010, Makino a kol. 2010, Qi a kol. 2011, Gomes a kol. 2012, Nakamura 2014, Ravich a kol. 2014). Zatím pouze jedna studie popsala klinické příznaky kryptosporidiozy zapříčiněné infekcí *Cryptosporidium* avian genotyp III, a to u jedinců druhu agapornis růžohrdlí (*Agapornis roseicollis*). U ptáků bylo popsáno chronické zvracení a hubnutí (Makino a kol. 2010).

***Cryptosporidium* avian genotyp IV** byl identifikován u kruhoočka japonského (*Zosterops japonicus*) z České Republiky (Ng a kol. 2006). S infekcí byl spojen průjem a anorexie. Oocysty *Cryptosporidium* avian genotypu IV měří stejně jako oocysty *C. galli*,  $8,25 \times 6,30 \mu\text{m}$ .

***Cryptosporidium* avian genotype VI** byl poprvé popsán u vlhovce červenokřídlého (*Agelaius phoeniceus*) v USA (Chelladurai a kol. 2016). Nebyly popsány klinické příznaky.

***Cryptosporidium* Woodcock genotyp** byl zaznamenán u sluky lesní (*Scolopax rusticola*). Klinické příznaky onemocnění kryptosporidiozou nebyly popsány. Pro další poznání tohoto genotypu bude potřeba mnoho dalších studií (Ryan a kol. 2003a, Ng a kol. 2006).

***Cryptosporidium* duck genotype** byl identifikován z trusu kachny černé (Morgan a kol. 2001) a později i z trusu husy kanadské (Zhou a kol. 2004). Klinické příznaky spojené s infekcí nebyly popsány.

#### ***Cryptosporidium* goose genotype I–IV**

Při studii, která proběhla na 13 místech v Ohiu a Illinois byly prokázány *Cryptosporidium* goose genotype I a II. Předmětem studie byly volně žijící husy kanadské (Zhou a kol. 2004). Další studií na huse kanadské v USA, byly detekovány *Cryptosporidium* goose genotypy III a IV (Jellison a kol. 2004).

### **3 Cíle práce**

- Na základě experimentálních infekcí různých věkových skupin vybraných hostitelů vyhodnotit jejich vnímavost k *Cryptosporidium avium*.
- Porovnat výsledky s předchozími pracemi zabývajícími se infektivitou vzhledem k věkové specifitě.



## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Paraziti

Pro experimentální infekce byl použit druh *Cryptosporidium avium* získaný z přirozeně infikovaného papouška kakarikiho rudočelého (*Cyanoramphus novaezealandiae*).

#### 4.1.2 Experimentální zvířata

K experimentům byla použita zvířata ve věkových kategoriích: 1-denní, 21-denní a dospělí (starší 1 roku): kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*); bažant obecný (*Phasianus colchicus*); kachna bílá (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*).

#### 4.1.3 Chov zvířat

**Kur domácí:** 1-denní a 21-denní kuřata byla chována v plastových chovných nádobách. Podestýlku tvořila savá podložka. Dospělé slepice byly chovány v chovných klecích, které byly vystlány slámou. Voda a krmení bylo k dispozici *ad libitum*. Chovné nádoby i klece byly 1× denně čištěny. Zvířata byla po celou dobu trvání pokusu umístěna ve zvěřinci Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.i.i.

**Kachna domácí:** 1-denní kachňata byla chována v plastových chovných nádobách ve zvěřinci Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.i.i. Podestýlku tvořila savá podložka. 21-denní a dospělé kachny byly umístěny v pokusné stáji Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Zde byla zvířata chována v kotcích s betonovou podlahou a dřevěnými zdmi. Podestýlku tvořila sláma. Voda a krmení bylo k dispozici *ad libitum*. Kotce byly 1× denně čištěny.

**Bažant obecný:** 1-denní a 21-denní kuřata bažantů byla chována v plastových chovných nádobách. Podestýlku tvořila savá podložka. Dospělí bažanti byli umístěni ve zvěřinci Parazitologického ústavu BC AVČR, v.v.i. Voda a krmení bylo k dispozici *ad libitum*. Prostor byl čištěn 1× denně.

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Purifikace oocyst

Vzorek trusu obsahující oocysty *C. avium* byl rozmělněn v deionizované vodě ve třecí misce, přefiltrován přes sítko (oka 200 µm) a poté mikrosítko (oka 70 µm) do 50 ml centrifugační zkumavky. Následně byla zkumavka s rozmělněným vzorkem centrifugována při 1350 g po dobu 20 minut. Supernatant byl odsán a sediment obsahující oocysty kryptosporidií následně přečištěn na cesium-chloridovém gradientu (Arrowood a Donaldson 1996).

#### Cesium chloridový gradient (Arrowood a Donaldson 1996)

Použité chemikálie:

Cesium chloridový roztok (hustota 1,15 g/ml)

PBS (0,025 M PBS; pH 7,2)

Postup:

1. Sediment obsahující oocysty resuspendovat v PBS.
2. Do 2 ml zkumavky napipetovat 1 ml CsCl.
3. Na něj opatrně navrstvit 0,5 ml suspenze oocyst v PBS.
4. Centrifugovat při 20 °C 3 minuty při 13 400 g.
5. Supernatant přepipetovat do 50 ml centrifugační zkumavky, sediment vyhodit.
6. Zkumavku doplnit deionizovanou vodou a při 20 °C centrifugovat 20 minut při 3500 g.
7. Odsát supernatant na 5 ml.
8. Zkumavku doplnit deionizovanou vodou, zvortexovat obsah a při 20 °C centrifugovat 20 minut při 3500 g. Tento krok opakovat 3 – 4×, aby se vymyl roztok CsCl.
9. Oocysty uchovávat při 4 °C.

#### 4.2.2 Barvení oocyst

#### Barvení oocyst kryptosporidií anilin-karbol-methyl-violetí dle Miláčka a Vítovce (1985)

Použité chemikálie:

##### **Roztok anilin-karbol-methyl-violeti**

- 0,6 g methyl violeti
- 1 ml anilinu
- 1 g fenolu
- 30 ml 96% alkoholu
- 70 ml deionizované vody

##### **Roztok 2% kyseliny sírové**

##### **Tartrazin**

- 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

Postup:

1. Provést tenký nátěr trusu na podložní sklo a po zaschnutí fixovat methanolem v plameni.
2. Zaschlý a fixovaný nátěr barvit v roztoku methylvioleti 30 minut.
3. Opláchnout pod tekoucí vodovodní vodou a 1 – 3 minuty diferencovat v 2% roztoku kyseliny sírové.
4. Znovu opláchnout pod tekoucí vodovodní vodou a dobarvit roztokem tartrazinu po dobu 5 minut.
5. Opláchnout pod tekoucí vodovodní vodou, osušit.
6. Na suchý, obarvený nátěr aplikovat kapku imerzního oleje a pozorovat mikroskopem (zvětšení 1000×).

Vyhodnocení: Oocysty kryptosporidií se barví temně fialově na hnědo oranžovém pozadí.

#### 4.2.3 Morfologie oocyst *Cryptosporidium avium*

Velikost oocyst *Cryptosporidium avium* byla měřena vždy u 100 ks purifikovaných oocyst pomocí digitální analýzy obrazu (software M.I.C. Quick Photo Pro v 2.0 software, Olympus Camedia C-5060 WIDEZOOM, 5.1 megapixels

digitální kamera; Mikroskop Olympus IX70; za použití imerzního objektivu - zvětšení 1000×). Byla měřena délka a šířka oocyst a byl vypočítán index tvaru.

#### **4.2.4 Ověření životaschopnosti oocyst**

Použité chemikálie:

Propidium jodid (PI)

1 mg PI v 1 ml 0,1 M PBS; pH 7,2

Postup:

1. Ke 100  $\mu$ l suspenze přečištěných oocyst přidat 10  $\mu$ l zásobního roztoku PI.
2. Směs promíchat a poté 30 minut barvit ve tmě při laboratorní teplotě.
3. Následně centrifugovat 3 minuty při 16 000 g, 20 °C.
4. Vzorek nakonec promýt ještě 2× v nadbytku dH<sub>2</sub>O centrifugací stejným postupem.
5. Oocysty pozorovat fluorescenčním mikroskopem s filtrem o vlnové délce 590 nm a zvětšením 1000× (Olympus IX 70).

Vyhodnocení:

Mrtvé oocysty při excitaci světlem o vlnové délce 590 nm emitují červenou fluorescenci.

#### **4.2.5 Design experimentálních infekcí**

##### **Infekce zvířat**

Každé zvíře bylo infikováno perorálně dávkou 380 tis. oocyst resuspendovaných v 1 ml deionizované vody. Jako kontrolní skupina byly použity 3 kusy zvířat stejného druhu a věkové kategorie. Kontrolní, nenainfikovaní jedinci, byli chováni za stejných podmínek odděleně od infikovaných zvířat. Vzorky trusu byly odebírány 1× denně. Všechny experimenty byly ukončeny po 30 dnech.

##### **Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření**

Odběry vzorků pro parazitologické vyšetření byly prováděny pravidelně po 24 hodinách po dobu 30 DPI (dny po infekci). Vzorky trusu byly odebírány bezprostředně po vykání zvířete do plastových beden a poté uloženy individuálně do 1,5 ml zkumavek. Každá zkumavka byla označena číslem zvířete a datem odběru. Po odběru byl prováděn nátěr trusu pro mikroskopické vyšetření a izolace DNA pro

molekulární ověření identity izolátu a přítomnosti specifické DNA. Zbylý materiál ze vzorků byl skladován v lednici při teplotě 4 °C.

#### **4.2.6 Hodnocení intenzity infekce**

U vzorků, které byly mikroskopicky pozitivní, byla odhadnuta intenzita infekce a vyjádřena jako počet oocyst na gram trusu (OPG) (Kváč a kol. 2007).

1. Zvážit podložní sklo s přesností na 3 desetinná místa.
2. Provést nátěr trusu na předem zváženém skle.
3. Znovu zvážit sklo s nátěrem trusu s přesností na 3 desetinná místa.
4. Vypočítat hmotnost nátěru.
5. Spočítat počet oocyst na skle.
6. Vypočíst počet oocyst na 1 gram trusu.

#### **4.2.7 Izolace DNA**

Izolace DNA byla provedena pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex).

##### **Postup:**

1. Celkem 200 mg trusu bylo vloženo do zkumavek (Safe Lock Tube; 2,5 ml), byly přidány skleněné (0,5 mm) a zirkonové kuličky (2 mm) a 0,8 – 1,2 ml Lysis Buffer P.
2. Vzorek byl zhomogenizován pomocí homogenizátoru Fast Prep 24 Instrument, MPBio po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s.
3. Dále byly vzorky inkubovány v termobloku po dobu 10 minut při teplotě 95 °C, během inkubace byly vzorky pravidelně vortexovány.
4. Následně byly vzorky centrifugovány 1 minutu při 11 000 g.
5. Veškerý supernatant byl převeden do InviAdvisorb-Tube, 15 s vortexován, 1 minutu inkubován při laboratorní teplotě a poté centrifugován 3 minuty při rychlosti 13 400 g.
6. Supernatant byl přepipetován do čistých 1,5 mikrozkušavek a centrifugován 3 minuty při 13 400 g.
7. Do čistých 1,5 ml mikrozkušavek bylo napipetováno 25 µl Proteinase K a přidáno 400 µl supernatantu. Celý obsah zkumavky byl zvortexován a inkubován v termobloku 10 minut při 70 °C. Během inkubace byly zkumavky vždy krátce vortexovány.

8. Do mikroskopavky bylo připipetováno 200 µl Binding Buffer A a z vortexováno.
9. Veškerý objem byl přepipetován do SpinFilter + Tube (kolona se sběrnou mikroskopavkou), inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugován 1 minutu při 11 000 g.
10. Odpad ze sběrných mikroskopavek byl vylit a na kolonu bylo připipetováno 500 µl Wash I, dále byly mikroskopavky s kolonami centrifugovány 1 minutu při 11 000 g.
11. Znovu byl odpad ze sběrných mikroskopavek vylit a na kolonu bylo připipetováno 700 µl Wash II, poté byly mikroskopavky s kolonami centrifugovány 1 minutu při 11 000 g.
12. Naposledy byl vylit odpad a mikroskopavky byly centrifugovány 4 minuty při 13 400 g.
13. Kolona byla přemístěna na čistou mikroskopavku a bylo připipetováno 200 µl Elution Buffer D (Elution Buffer byl předehřán na 70 °C). Mikroskopavky byly inkubovány 3 minuty při laboratorní teplotě a poté centrifugovány 1 minutu při 11 000 g.

#### **4.2.8 Genotypizace izolátů *Cryptosporidium avium***

Identita použitého izolátu byla ověřována na základě částečné sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku rRNA (Xiao a kol. 1999, Jiang a kol. 2005).

#### **Primery pro amplifikaci SSU genu**

##### **Primární reakce**

F1 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'

R1 3'-AGGACAAAGTTCCTTTACCC-5'

##### **Sekundární reakce**

F2 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

R2 3'-ATGAAGGTGACGTAGGATACTC-5'

**Tabulka 1.** Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu pro malou ribozomální podjednotku

Primární reakce (μl)			Sekundární reakce (μl)		
H <sub>2</sub> O	-----	<b>12,30</b>	H <sub>2</sub> O	-----	<b>11,90</b>
MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)	<b>1,20</b>	MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)	<b>1,20</b>
10Xbuffer	-----	<b>2,00</b>	10Xbuffer	-----	<b>2,00</b>
dNTP	10 mM	<b>0,40</b>	dNTP	10 mM	<b>0,40</b>
forward	10 μM	<b>0,40</b>	forward	10 μM	<b>0,60</b>
reverse	10 μM	<b>0,40</b>	reverse	10 μM	<b>0,60</b>
BSA	(10 mg/ml)	<b>0,80</b>	BSA	(10 mg/ml)	<b>0,80</b>
Taq	(1U/1μl)	<b>0,50</b>	taq	(1U/1μl)	<b>0,50</b>
DNA	-----	<b>2,00</b>	DNA	-----	<b>2,00</b>
<b>Celkem</b>	-----	<b>20,00</b>	<b>Celkem</b>	-----	<b>20,00</b>

**Amplifikační program pro termocykler (Bioer, KR) pro SSU primery (celkem 35 cyklů)**

Počáteční denaturace	94 °C po dobu 3 minut.
Denaturace	94 °C po dobu 45 sekund
Nasedání primerů	55 °C po dobu 45 sekund
Dosyntetizování nového řetězce	72 °C po dobu 60 sekund
Finální extenze	72 °C po dobu 7 minut

**4.2.9 Gelová elektroforéza**

Velikost PCR fragmentů byla ověřena gelovou elektroforézou. Na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium bromidu byl produkt PCR vizualizován pomocí UV záření (302 nm).

**Použité chemikálie:**

- TAE pufr
- Agaróza
- Ethidium bromid
- 100 bp DNA Ladder

**Postup:**

1. Smíchat agarózu a TAE pufr, nechat rozpustit v mikrovlnné troubě a pod tekoucí vodou zchladit na teplotu přibližně 50 °C.
2. Přidat ethidium bromid.
3. Takto připravený gel nalít do předem připravené formy velikostí odpovídající počtu ověřovaných vzorků, poté vložit hřeben a nechat ztuhnout.
4. Gel vložit do elektroforetického tanku s TAE puřem a do jamek po hřebenu nanést 10  $\mu$ l PCR sekundárního produktu a 2 $\times$ 10  $\mu$ l ladderu. Napětí nastavit na 70 V a spustit do doby separace fragmentů DNA.
5. Pro vizualizaci DNA fragmentů použít UV transiluminátor.

**4.2.10 Sekvence vzorků**

Nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí online dostupného programu Chromas Pro v 1.32 ([www.technilysium.com.au/chromas.html](http://www.technilysium.com.au/chromas.html)) a dále pomocí programů ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/SlustalIX/>) a BioEdit porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank.

**4.2.11 Fylogenetická analýza**

Metodou Neighbor-Joining byly vypočteny fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií (Saitou a Nei 1987). Byl použit dvouparametrový distanční model dle Kimury (1980). Na základě 1000 opakování byl získán bootstrapový konsenzus výsledných stromů. Ke konstrukci fylogenetických stromů byl použit program MEGA 6.



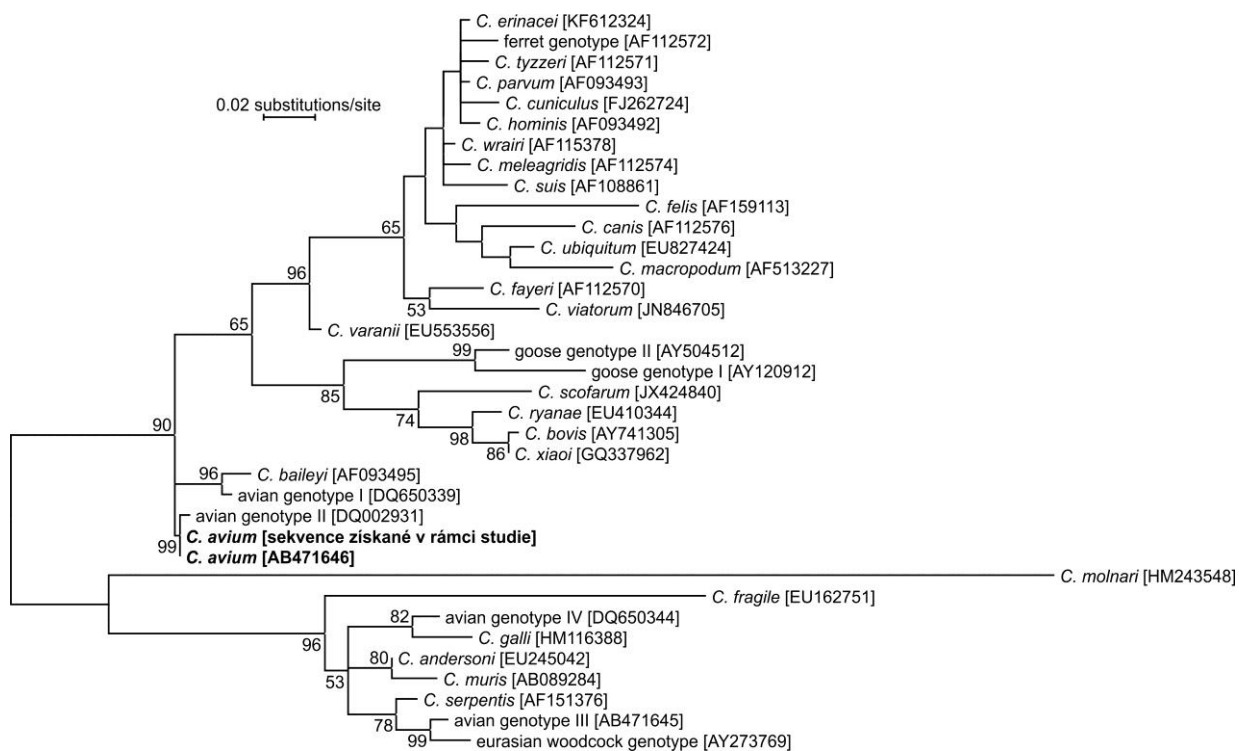
## 5 Výsledky

### 5.1 Mikroskopické a molekulární vyšetření experimentálních zvířat

Infekční dávka získaná z trusu kakarikiho rudočelého byla otestována, zda je 100% shodná s *C. avium*. Na základě fylogenetických výsledků byl tento izolát použit na připravené experimenty. V kladogramu je znázorněna 100% shoda infekční dávky s *C. avium* (Obrázek 2).

Všechna zvířata použitá pro experimentální pokusy byla před infekcí vyšetřena na přítomnost oocyst kryptosporidií detekovaných mikroskopicky, tak i na přítomnost specifické DNA kryptosporidií testovanou nested PCR za použití rodově specifických primerů amplifikujících část genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA). Na základě negativních výsledků byli vybraní ptáci zařazeni do pokusu.

**Obrázek 2.** Kladogram fylogenetických vztahů ptačích izolátů s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU), vytvořený metodou neighbor-joining (1000× bootstrap).



## **5.2 Hostitelská specifita *Cryptosporidium avium***

Na základě experimentální infekce bylo prokázáno, že *C. avium* získané z kakarikiho rudočelého bylo infekční pro kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*), kachnu domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) a nebylo infekční pro bažanta obecného (*Phasianus colchicus*).

## **5.3 Věková specifita**

### **Bažant obecný (*Phasianus colchicus*)**

Na základě mikroskopického a molekulárního vyšetření bylo prokázáno, že ani jedna z vyšetřovaných věkových kategorií bažanta obecného (*Phasianus colchicus*) nebyla vnímavá k infekci *C. avium*.

### **Kachna domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*)**

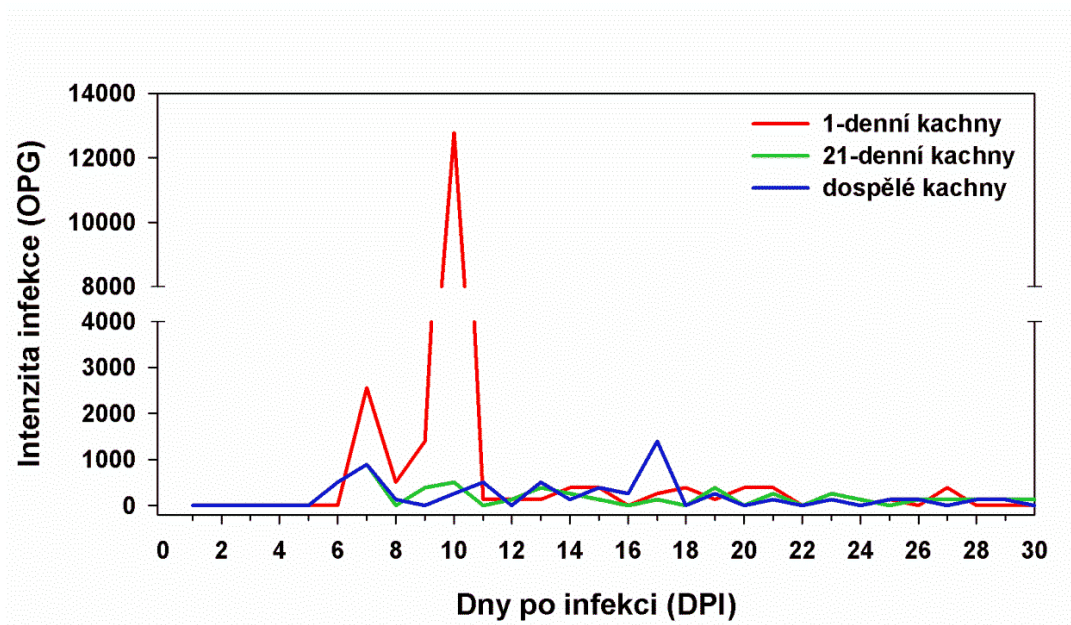
Kategorie, která začala oocysty vylučovat jako první, byla kategorie 1-denních kachňat, kde jsme molekulárními metodami detekovali oocysty již 4. DPI. U kategorie 21-denních kachňat a dospělých kachen jsme molekulárními metodami prokázali infekci *C. avium* 6. DPI. Mikroskopickým vyšetřením byly oocysty vždy identifikovány s několika denním zpožděním (Tabulka 1). Délka infekce u všech věkových kategorií kachny domácí byla delší než 30 DPI.

### **Kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*)**

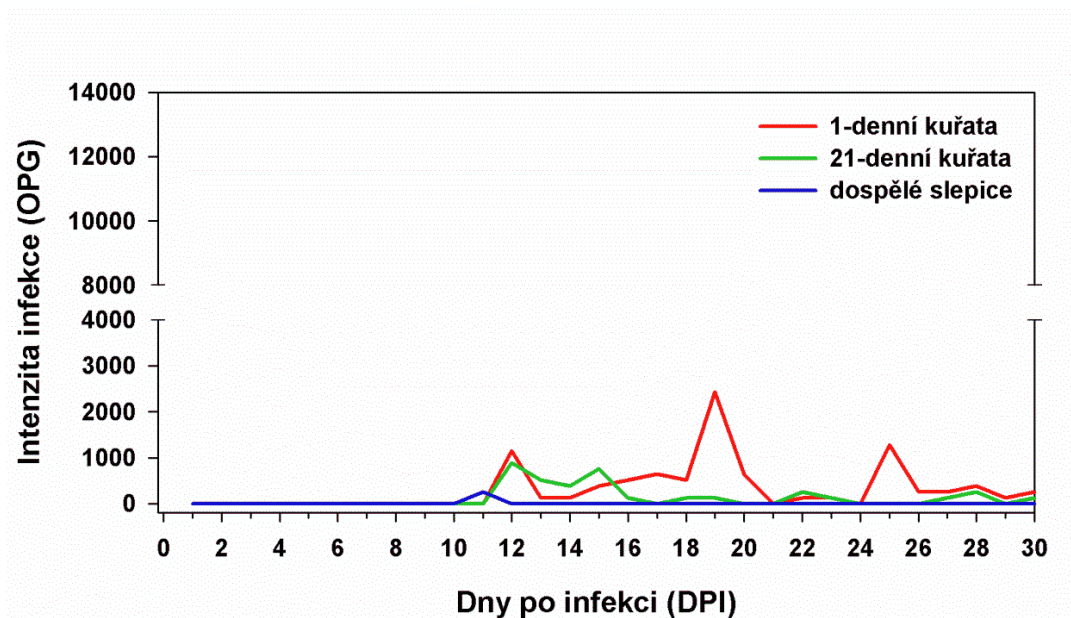
Na základě PCR detekce začala 1-denní kuřata vylučovat oocysty od 10. DPI. O jeden den dříve začala patentní perioda u 21-denních kuřat, dle PCR detekce od 9. DPI. Mikroskopické vyšetření prokázalo přítomnost oocyst později (Tabulka 1). Vylučování oocyst u kategorie dospělých jedinců započalo nejpozději, a to 11. DPI, kdy byla infekce prokázána molekulárními metodami. Mikroskopickým vyšetřením nebyly u dospělých jedinců kura domácího oocysty detekovány. Vylučování oocyst u všech věkových kategorií trvalo déle než 30 DPI.



**Graf 1.** Intenzita infekce *Cryptosporidium avium* věkových kategorií kachny domácí na základě mikroskopického vyšetření



**Graf 2.** Intenzita infekce *Cryptosporidium avium* věkových kategorií kura domácího na základě mikroskopického vyšetření



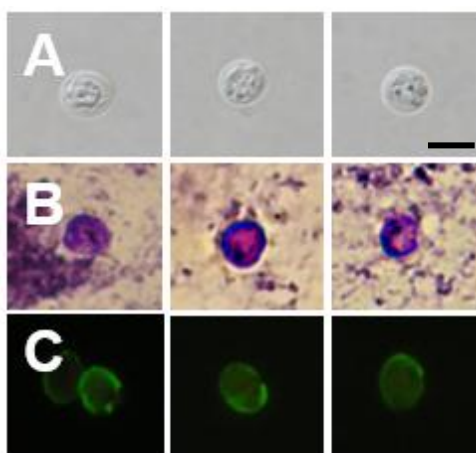
## 5.5 Klinické příznaky

U žádného ze zvířat, která byla vnímavá k infekci *C. avium*, jsme nezaznamenali klinické příznaky kryptosporidiózy. Zvířata nejevila známky anorexie, nebyla malátná a neprojevil se u nich průjem.

## 5.6 Morfologie oocyst *Cryptosporidium avium*

U všech vyšetřovaných druhů a věkových kategorií zvířat vnímavých k infekci *C. avium* jsme mikroskopicky pozorovali vylučované oocysty. Proměřením oocyst jsme získali rozměry, které se u všech vylučovaných oocyst téměř neměnily. Velikost oocyst *C. avium* dle našeho měření byla  $5,3 - 6,9 \times 4,3 - 5,5 \mu\text{m}$  (Obrázek 3).

**Obrázek 3.** Oocysty *Cryptosporidium avium* zobrazeny A) diferenciálním interferenčním kontrastem, B) barvení anilin-karbol methyl violetí a C) specifickými protilátkami proti stěně oocysty (Crypto Cel). Měřítko 5  $\mu\text{m}$ .



## 6 Diskuze

Ptačí kryptosporidie jsou schopné infikovat široké spektrum ptačích hostitelů (Fayer 2010). Díky naší studii, můžeme tuto hypotézu jedině podpořit, jelikož se nám podařilo infikovat izolátem získaným z papouška kakariki rudočelého (*Cyanoramphus novaezelandiae*) patřícího do řádu papouškovitých, kachnu domácí (*Anas platyrhynchos f. domestica*) patřící do řádu vrubozobých (Anseriformes) a kur domácí (*Gallus gallus f. domestica*) z řádu hrabavých (Galliformes). Vnímavost kura domácího k infekci *C. avium* byla popsána již v roce 2014 u brojlerových kuřat v Číně (Wang 2014). Infektivita ptačích kryptosporidií pro zástupce čeledi bažantovitých (Phasinidae) byla zaznamenána dosud pouze v 1 studii, která popsala spontánní infekci *C. meleagridis* u Orebice rudé (*Alectoris rufa*) (Máca a Pavlásek 2015). Oproti *C. meleagridis*, u kterého je popsána hostitelská vnímavost pro savce včetně myši, potkanů, králíků, skotu a člověka (Pedraza-Díaz 2001, Cama a kol. 2003, Darabus a Olariu 2003, Xiao a Ryan 2004, Elwin a kol. 2012), není infekce *C. avium* popsána u jiných než ptačích hostitelů.

Poznatky o průběhu kryptosporidiových infekcí, včetně věkové specifity hostitelů jsou chybějící částí biologie těchto parazitů a to nejenom druhů infikujících ptáky, ale i ostatní obratlovce. Prepatentní perioda *C. avium* u kachen domácích (4 – 6 dní) je podobná prepatentní periodě *C. baileyi* a *C. meleagridis* (4 – 8 dní; Lindsay a kol. 1988, Hornok a kol. 1998, Tůmová a kol. 2002).

Dosud bylo publikováno jen několik málo studií, které se zabývaly přímo věkovou specifikou kryptosporidií. Jednou z nich byla práce sledující věkově závislou vnímavost k infekci *C. baileyi*, kdy byla experimentální infekci podrobena 1- a 9-týdenní kuřata. Výsledky této studie prokázaly, že prepatentní perioda je značně kratší u starších kuřat, zatímco patentní perioda delší u mladších kuřat (Sréter a kol. 1995, 2000). Přestože, je *C. avium* fylogeneticky blízce příbuzné právě *C. baileyi* a mohli bychom očekávat obdobný průběh infekce, naše výsledky nekorrespondují s citovanou prací. Neproklázali jsme vliv věku na délku prepatentní a patentní periody. Přestože ptáci během experimentu vylučovali jen malé množství oocyst, délka infekce trvala po celou dobu experimentu. Lze předpokládat, že námi vyvolané infekce by pokračovaly v chronické formě několik měsíců. Toto tvrzení opíráme o fakt, že kakariki rudočelý, z kterého byl získán izolát pro naši studii

vylučoval oocysty *C. avium* více než 5 měsíců (Holubová a kol. 2016). Taktéž byla zjištěna infekce vyvolaná *C. avium* u 7 letého kakadu inka (*Lophochroa leadbeateri*) (Curtiss a kol. 2015). V souladu s předešlými studiemi jsme prokázali nízkou intenzitu infekce vyvolanou *C. avium* (Ng a kol. 2006, Curtiss a kol. 2015, Holubová a kol. 2016).

Na rozdíl od *C. scrofarum* infikující pouze starší prasata nebo *C. parvum*, které je infekční pouze pro selata do 2 měsíců věku, *C. avium* patří mezi druhy a genotypy kryptosporidií, u kterých nebyla popsána věková specifita (Kváč a kol. 2013).

V souladu s výsledky Srétera a kol. (1995), kteří popsali 3× vyšší intenzitu infekce *C. baileyi* u skupiny 1-týdenních kuřat v porovnání s 9-týdenními kuřaty, jsme pozorovali vyšší intenzitu infekce u mladších věkových kategorií. S ohledem na to, že všechna použitá zvířata byla kryptosporidií prostá a u většiny lze se 100% jistotou říci, že se s kryptosporidii nikdy v životě nesetkala lze předpokládat, že na intenzitu infekce bude mít vliv zralost imunitního systému.

Ptáci infikovaní *C. avium* nevykazovali známky kryptosporidiosis, což je v souladu s dříve publikovanými výsledky (Ng a kol. 2006, Holubová a kol. 2016).

Oocysty *C. avium* (5,30 – 6,90 × 4,30 – 5,50 μm) jsou morfologicky neodlišitelné od oocyst fylogeneticky příbuzných druhů a genotypů kryptosporidií: *C. baileyi* (6,3 × 4,6 μm; Current a kol. 1986) a *Cryptosporidium* avian genotype II (6,00 – 6,50 × 4,80 – 6,60 μm; Meireles a kol. 2006, Ng a kol. 2006, Qi a kol. 2011). Naopak jsou větší než oocysty *C. meleagridis* (5,00 × 4,30 μm, Slavin 1995) a menší než oocysty žaludečních druhů: *C. galli* (8,00 – 8,50 × 6,20 – 6,40 μm; Ryan a kol. 2003b), *Cryptosporidium* avian genotype III (7,50 × 6,30 μm; Meireles a kol. 2006, Ng a kol. 2006) a *Cryptosporidium* Woodcock genotype (8,50 × 6,40 μm; Ryan a kol. 2003a).

## 7 Závěry

- *Cryptosporidium avium* není infekční pro bažanty.
- *Cryptosporidium avium* je infekční pro všechny vyšetřované věkové kategorie kura domácího a kachny domácí.
- Prepatentní perioda u kura domácího je 9 – 11 DPI
- Prepatentní perioda u kachny domácí je 4 – 6 DPI.
- Nejvímavější k infekci *C. avium* jsou 1-denní kachňata.
- Patentní perioda *C. avium* u kura domácího a kachny domácí je delší než 30 DPI.
- Oocysty *C. avium* jsou morfologicky neodlišitelné od oocyst *C. baileyi*.



## 8 Použitá literatura

**ABE, N., ISEKI, M. 2004.** Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. *Parazitol. Res.* 92: 523–526.

**ABE, N., MAKINO, I. 2010.** Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels, Japan. *Parasitol. Res.* 106: 1491–1497.

**AKIYOSHI, D. E., DILO, J., PEARSON, C., CHAPMAN, S., TUMWINE, J., TZIPORI, S. 2003.** Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. *Infect. Immun.* 71: 1828–1832.

**ARROWOOD, M. J., DONALDSON, K. 1996.** Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43: 89S.

**BAROUDI, D., KHELEF, D., GOUCEM, R., ADJOU, K. T., ADAMU, H., ZHANG, H., XIAO, L. 2013.** Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. *Vet. Parasitol.* 196: 334–340.

**BERMUDEZ, A. J., LEY, D. H., LEVY, M. G., FICKEN, M. D., GUY, J. S., GERIG, T. M. 1988.** Intestinal and bursal cryptosporidiosis in turkeys following inoculation with *Cryptosporidium* sp. isolated from commercial poults. *Avian Dis.* 32: 445–450.

**CAMA, V. A., BERN, C., SULAIMAN, I. M., GILMAN, R. H., TICONA, E., VIVAR, A., KAWAI, V., VARGAS, D., ZHOU, L., XIAO, L. H. 2003** *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50: 531–533.

**CARRENO, R. A., SCHINITZLER, B. E., JEFFRIES, A. C., TENTER, A. M., JOHNSON, A. M., BARTA, J. R. 1999.** *Cryptosporidium* is more closely related to gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85: 899–904.

- COUPE, S., SARFATI, C., HAMANE, S., DEROUIN, F. 2005.** Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 43: 1017–1023.
- CURRENT, W. L., UPTON, S., HAYNES, T. B. 1986.** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool.* 33: 289–296.
- CURTISS, J. B., LEONE, A. M., WELLEHAN, J. F. JR, HOWERTH, E. W., FARINA L. L. 2015.** Renal and cloacal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* avian genotype V) in a Major Mitchell's cockatoo (*Lophochroa Leadbeateri*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 46: 934–937.
- DARABUS, G., OLARIU, R. 2003.** The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Pol. J. Vet. Sci.* 6: 225–228.
- ELWIN, K., ROBINSON, G., HADFIELD, S. J., FAIRCLOUGH, H. V., ITURRIZA-GÓMARA, M., CHALMERS, R. M. 2012.** A comparison of two approaches to extracting *Cryptosporidium* DNA from human stools as measured by a real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods.* 89: 38–40.
- ENEMARK, H. L., AHRENS, P., JUEL, C. D., PETERSEN, E., PETERSEN, R. F., ANDERSEN, J. S., LIND, P., THAMSBORG, S. M. 2002.** Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. *Parasitology* 125: 331–341.
- FAYER, R., SPEER, C., DUBEY, J. 1997.** The general biology of *Cryptosporidium* in *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, Fayer, R., Ed. CRC Press, Boca Raton, FL: 1–41pp.
- FAYER, R. 2007.** General biology. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R., Xiao L. (Eds.). Publishing CRC Press: 1–35pp.
- FAYER, R., XIAO, L. 2008.** Diagnostics. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2nd ed. Boca Raton, Publishing CRC Press: 192–200pp.
- FAYER, R. 2010.** Taxonomy and species delimitation *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124: 90–97.

- GATEI, W., SUPUTTAMONGKOL, Y., WAYWA, D., ASHFORD, R. W., BAILEY, J. W., GREENSILL, J., BEECHING, N. J., HART, C. A. 2002.** Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96: 797–802.
- GATEI, W., GREENSILL, J., ASHFORD, R. W., CUEVAS, L. E., PARRY, C. M., CUNLIFFE, N. A., BEECHING, N. J., HART, C. A. 2003.** Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1458–1462.
- GATEI, W., DAS, P., DUTTA, P., SEN, A., CAMA, V., LAL, A. A., XIAO, L. 2006a.** Multilocus sequence typik and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infect. Genet. Evol.* 7: 197–205.
- GATEI, W., WAMAE, C. N., MBAE, C., WARURU, A., MULINGE, E., WAITHERA, T., GATIKA, S. M., KAMWATI, S. K., REVATHI, G., HART, C. A. 2006b.** Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75: 78–82.
- GHARAGOZLOU, M. J., DEZFOULIAN, O., RAHBARI, S., BOKAIE, S., JAHANZAD, I., RAZAVI, A. N. 2006.** Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 53: 282–285.
- GOMEZ-COUSO, H., FREIRE-SANTOS, F., HERNANDEZ-CORDOVA, G. A., ARES- MAZAS, M. E. 2005.** A histological study of the transit of *Cryptosporidium parvum* oocysts through clams (*Tapes decussatus*). *Int. J. Food Microbiol.* 102: 57–62.
- HOLUBOVÁ, N., SAK, B., HORČIČKOVÁ, M., HLÁSKOVÁ, L., KVĚTOŇOVÁ, D., MENCHACA, S., MCEVOY, J., KVÁČ, M. 2016.** *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitol. Res. v tisku.*
- HORNOK, S., BITAY, Z., SZÉLL, Z., VARGA, I. 1998.** Assessment of maternal immunity to *Cryptosporidium baileyi* in chickens. *Vet. Parasitol.* 16: 203–212.

- HUBER, F., DA SILVA, S., BOMFIM, T. C., TEIXEIRA, K. R., BELLO, A. R. 2007.** Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Vet. Parasitol.* 150: 65–74.
- HUANG, K., AKIYOSHI, D. E., FENG, X. C., TZIPORI, S. 2003.** Development of patent infection in immunosuppressed C57BL/6 mice with a single *Cryptosporidium meleagridis* oocyst. *J. Parasitol.* 89: 620–622.
- CHELLADURAI, J. J., CLARK, M. E., KVÁČ, M., HOLUBOVÁ, N., KHAN, E., STENGER, B. L., GIDDINGS, C. W., McEVOY J. 2016.** *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium* avian genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Parasitol. Res.* v tisku.
- CHVALA, S., FRAGNER, K., HACKL, R., HESS, M., WEISSENBOCK, H. 2006.** *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser* f. *domestica*) detected by in situ hybridization. *J. Comp. Pathol.* 134: 211–218.
- JELLISON, K. L., DISTEL, D. L., HEMOND, H. F., SCHAUER, D. B. 2004.** Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 452–458.
- JIANG, J., ALDERISIO, K. A., XIAO, L. 2005.** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event. Water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4446–4454.
- KIMURA, A., SUZUKI, Y., MATSUI, T. 2004.** Identification of the *Cryptosporidium* isolate from chickens in Japan by sequence analyses. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 879–881.
- KVÁČ, M., ONDRÁČKOVÁ, Z., KVĚTOŇOVÁ, D., SAK, B., VÍTOVEC, J. 2007.** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 143: 229–233.
- KVÁČ, M., KESTŘÁNOVÁ, M., PINKOVÁ, M., KVĚTOŇOVÁ, D., KALINOVÁ, J., WAGNEROVÁ, P., KOTKOVÁ, M., VÍTOVEC, J., DITRICH, O., MCEVOY, J., STENGER, B., SAK, B. 2013.** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet. Parasitol.* 191: 218–227.

- KVÁČ, M., HAVRDOVÁ, N., HLÁSKOVÁ, L., DAŇKOVÁ, T., KANDĚRA, J., JEŽKOVÁ, J., VÍTOVEC, J., SAK, B., ORTEGA, Y., XIAO, L., MODRÝ, D., CHELLADURAI, J. R., PRANTLOVÁ, V., MCEVOY, J. 2016** *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. PLoS ONE 11: e0147090
- LEONI, F., GALLIMORE, C. I., GREEN, J., MCLAUCHLIN, J. 2003.** Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals by using a heteroduplex mobility assay and nucleic acid sequencing based on a small double-stranded RNA element. J. Clin. Microbiol. 41: 981–992.
- LEONI, F., AMAR, C., NICHOLS, G., PEDRAZA-DIAZ, S., MCLAUCHLIN, J. 2006.** Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. J. Med. Microbiol. 55: 703–707.
- LI, J., LIN, X., ZHANG, L., QI, N., LIAO, S., LV, M., WU, C., SUN, M. 2015.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in Guangdong Province, Southern China. Parasitol. Res. 114: 2237–2241.
- LINDSAY, D. S., BLAGBURN, B. L., HOERR, F. J., GIAMBRONE, J. J. 1987.** Experimental *Cryptosporidium baileyi* infections in chickens and turkeys produced by ocular inoculation of oocysts. Avian Dis. 31: 355–357.
- LINDSAY, D. S., BLAGBURN, B. L., SUNDERMANN, C. A., GIAMBRONE, J. J., 1988.** Effect of broiler chicken age on susceptibility to experimentally induced *Cryptosporidium baileyi* infection. Am. J. Vet. Res. 49: 1412–1414.
- LINDSAY, D. S., BLAGBURN, B. L., SUNDERMANN, C. A. AND HOERR, F. J. 1989.** Experimental infections in domestic ducks with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. Avian Dis. 33: 69–73.
- LINDSAY, D. S., BLAGBURN, B. L. 1990.** Cryptosporidiosis in birds In: Cryptosporidiosis in man and animals, Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R., (Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL: 133–148.

- MÁCA, O., PAVLÁSEK, I. 2015.** First finding of spontaneous infections with *Cryptosporidium baileyi* and *C. meleagridis* in the red-legged partridge *Alectoris rufa* from an aviary in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 209: 164–168.
- MacKENZIE, W. R., HOXIE, N. J., PROSTOR, M. E., GRADUS, M. S., BLAIR, K. A., PETERSON, D. E., KAZMIERCZAK, J. J., WEISS, D. G., FOX, K. R., ROSE, J. B., DAVIS, J. P. 1994.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infections transmitted through the public water supply. *Eng. J. Med.* 331: 161–167.
- MAKINO, I., ABE, N., REAVILL, D. R. 2010.** *Cryptosporidium* avian genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). *Avian Dis.* 54: 1102–1107.
- MATOS, O., ALVES, M., XIAO, L. H., CAMA, V., ANTUNES, F. 2004.** *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 2256–2257.
- McLAUHLIN, J., AMAR, C., PEDRAZA-DIAZ, S., NICHOLS, G. L. 2000.** Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3984–3990.
- MEISEL, J. L., PERERA, D. R., MELIGRO, C., RUBIN, C. E. 1976.** Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70: 1156–1160.
- MEIRELES, M. V., SOARES, R. M., DOS SANTOS, M. M. A. B., GENNARI, S. M. 2006.** Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). *J. Parasitol.* 92: 623–626.
- MEUTIN, D. J., VAN KRUININGEN, H. J., KEIN, D. H. 1974.** Cryptosporidiosis in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165: 914–917.
- MILÁČEK, P., VÍTOVEC, J. 1985.** Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32: 50.

- MORGAN, U. M., XIAO, L., LIMOR, J., GELIS, S., RAIDAL, S. R., FAYER, R., LAL, A., ELLIOT, A., THOMPSON, R. C. A. 2000.** *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). Aust. Vet. J 78: 182–183.
- MORGAN, U. M., MONIS, P. T., XIAO, L. H., LIMOR, J., SULAIMAN, I., RAIDAL, S., O'DONOGHUE, P., GASSER, R., MURRAY, A., FAYER, R., BLAGBURN, B. L., LAL, A. A., THOMPSON, R. C. A. 2001.** Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. Int. J. Parasitol. 31: 289–296.
- MUTHUSAMY, D., RAO, S. S., RAMANI, S., MONICA, B., BANERJEE, I., ABRAHAM, O. C., MATHAI, D. C., PRIMROSE, B., MULIYIL, J., WANKE, C. A., WARD, H. D., KANG, G. 2006.** Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* spp. isolates from human immunodeficiency virus infected individuals in South India. J. Clin. Microbiol. 44: 632–634.
- NAKAMURA, A. A., SIMÕES, D. C., ANTUNES, R. G., DA SILVA, D. C., MEIRELES, M. V. 2009.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. Vet. Parasitol. 166: 47–51.
- NAKAMURA, A. A., HOMEM, C. G., DA SILVA, A. M., MEIRELES, M. V. 2014.** Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. Vet. Parasitol. 205: 7–13.
- NG, J., PAVLÁSEK, I., RYAN, U. 2006.** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. Appl. Environ. Microbiol. 72: 7548–7553.
- NGUYEN, S. T., FUKUDA, Y., TADA, C., HUYNH, V. V., NGUYEN, D. T., NAKAI, Y. 2013.** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in ostriches (*Struthio camelus*) on a farm in central Vietnam. Exp. Parasitol. 133: 8–11.
- NIME, F. A., BUREK, J. D., PAGE, D. L., HOLSCHER, M. A., YARDERLY, J. H. 1976.** Acute enterocolitis in human being infected with protozoan *Cryptosporidium*. Gastroenterology 70: 592–598.
- O'DONOGHUE, P. J. 1995.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. Int. J. Parasitol. 25: 139–195.

- PANCIERA, R. J., THOMASSE, R. W., GARNER, F. M. 1971.** Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 479–584.
- PAVLÁSEK, I. 1993.** Black headed gull (*Larus ridibundus L*), a new host of *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae). *Vet. Med.* 38, 629–638.
- PAVLÁSEK, I. 1999.** Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Rem. Klin. Mikrobiol.* 3: 290–301.
- PAVLÁSEK, I. 2001.** Findings of cryptosporidia in the stomach of hens and of exotic and wild birds. *Veterinářství (Czech)* 51: 103–108.
- PEDRAZA-DÍAZ, S., AMAR, C. F., MCLAUCHLIN, J., NICHOLS, G. L., COTTON, K. M., GODWIN, P., IVERSEN, A. M., MILNE, L., MULLA, J. R., NYE, K., PANIGRAHL, H., VENN, S. R., WIGGINS, R., WILLIAMS, M., YOUNGS, E. R. 2001.** *Cryptosporidium meleagridis* from humans: molecular analysis and description of affected patients. *J. Infect.* 42: 243–250.
- QI, M., WANG, R., NING, C., LI, X., ZHANG, L., JIAN, F., SUN, Y., XIAO, L. 2011.** *Cryptosporidium* spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. *Exp. Parasitol.* 128: 336–340.
- RAVICH, M. L., REAVILL, D. R., HESS, L., CHILDRESS, A. L., WELLEHAN, J. F. Jr. 2014.** Gastrointestinal cryptosporidiosis in captive psittacine birds in the United States: a case review. *J. Avian. Med. Surg.* 28: 297–303.
- RYAN, U., XIAO L., READ, C., ZHOU, L., LAL, A. A., PAVLASEK, I. 2003a.** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4302–4307.
- RYAN, U. M., XIAO, L., READ, C., SULAIMAN, I. M., MONIS, P., LAL, A. A., FAYER, R., PAVLÁSEK, I. 2003b.** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J. Parasitol.* 89: 809–813.
- RYAN, U. M., POWER, M., XIAO, L. 2008.** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 55: 22–26.
- RYAN, U., PAPANINI, A., TONG, K., YANG, R., GIBSON-KUEH, S., O'HARA, A., LYMBERY, A., XIAO, L. 2015.** *Cryptosporidium huwi* n. sp.



(Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp. Parasitol.* 150: 31–35.

**SAITOU, N., NEI, M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.

**SANTOS, M. M., PIERO, J. R., MEIRELES, M. V. 2005.** *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: Clinical, morphological and molecular studies. *Braz. J. Poult. Sci.* 7: 109.

**SAUCH, J. F., FLANIGAN, D., GALVIN, M. L., BERMAN, D., JAKUBOWSKI, W. 1991.** Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3243–3247.

**SEVÁ, A. P., FUNADA, M. R., RICHTZENHAIN, L., GUIMARÃES, M. B., SOUZA, S. O., ALLEGRETTI, L., SINHORINI, J. A., DUARTE, V. V., SOARES, R. M. 2011.** Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. *Vet. Parasitol.* 175: 113–117.

**SLAVIN, D. 1995.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 65: 262–266.

**SRÉTER, T., VARGA, I., BEKESI, L. 1995.** Age-dependent resistance to *Cryptosporidium baileyi* infection in chickens. *J. Parasitol.* 81: 827–829.

**SRÉTER, T., VARGA, I. 2000.** Cryptosporidiosis in birds--a review. *Vet. Parasitol.* 87: 261–279.

**TACCONI, G., PEDINI, V., GARGIULO, A. M., COLETTI, M. AND PIERGILI-FIORETTI, D. 2001.** Retrospective ultramicroscopic investigation on naturally cryptosporidial infected commercial turkey poults. *Avian Dis.* 45: 688–695.

**TIANGTIP, R., JONGWUTIWES, S. 2002.** Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health* 7: 357–364.

**TŮMOVÁ, E., SKŘIVAN, M., MAROUNEK, M., PAVLÁSEK, I., LEDVINKA, Z. 2002.** Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Avian Dis.* 46: 203–207.

- TYZZER, E. E. 1907.** A sporozoon found in the peptic flanda of the common mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 5: 12–13.
- TYZZER, E. E. 1910.** An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. Et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. J. Med. Res. 23: 487–510.
- TYZZER, E. E. 1912.** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenkd. 26: 394–414.
- TYZZER, E. E. 1929.** Coccidiosis in gallinaceous birds. Am. J. Hygiene. 10: 269.
- WANG, R., WANG, F., ZHAO, J., QI, M., NING, C., ZHANG, L., XIAO, L. 2012.** *Cryptosporidium* spp. in quails (*Coturnix coturnix japonica*) in Henan, China: molecular characterization and public health significance. Vet. Parasitol. 187: 534–537.
- WANG, L., XUE, X., LI, J., ZHOU, Q., YU, Y., DU A. 2014.** Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. Parasite 21: 36.
- XIAO, L., MORGAN, U. M., LIMOR, J., ESCALANTE, A., ARROWOOD, M., SHULAW, W., THOMPSON, R. C., FAYER, R., LAL, A. A. 1999.** Genetic diverzity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptospodirium* species. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3386–3391.
- XIAO, L., BERN, C., LIMOR, J., SULAIMAN, I., ROBERTS, J., CHECKLEY, W., CABRERA, L., GILMAN, R. H., LAL, A. A. 2001.** Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. J. Infect. Dis. 183: 492–497.
- XIAO, L., RYAN, U. M. 2004.** Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. Curr. Opin. Infect. Dis. 17: 483–490.
- YAGITA, K., IZUMIYAMA, S., TACHIBANA, H., MASUDA, G., ISEKI, M., FURUYA, K., KAMEOKA, Y., KUROKI, T., ITAGAKI, T., ENDO, T. 2001.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. Parasitol. Res. 87: 950–955.
- ZHOU, L., KASSA, H., TISCHLER, M. L., XIAO, L. 2004.** Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). Appl. Environ. Microbiol. 70: 4211–4215.

**ZIEGLER, P. E., WADE, S. E., SCHAAF, S. L., STERN, D. A., NADARESKI, C. A., MOHAMMED, H. O. 2007.** Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. *Vet. Parasitol.* 147: 176–184.